

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALENKA ŽERJAL

**UGOTAVLJANJE PROTIMIKROBNE UČINKOVITOSTI NEKATERIH  
ENDOFITSKIH GLIV**

DIPLOMSKO DELO

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Andreja Umeka, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Damjana Janeša, mag. farm..

Hvala vsem, ki so prispevali k nastanku tega dela, še posebej mentorju doc. dr. Andreju Umeku, somentorju asist. dr. Damjanu Janešu in Boštjanu Kalamarju, mag. farm..

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Andreja Umeka, mag. farm. in somentorja asist. dr. Damjana Janeša, mag. farm..

# VSEBINA

|          |                                                                                                                                              |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>UVOD.....</b>                                                                                                                             | <b>5</b>  |
| 1.1      | NARAVNI PRODUKTI IN TRADICIONALNI PRISTOPI V MEDICINI.....                                                                                   | 5         |
| 1.2      | ENDOFITI KOT VIR BIOLOŠKO AKTIVNIH SPOJIN.....                                                                                               | 6         |
| 1.3      | TERENSKO DELO IN DELO V LABORATORIJU .....                                                                                                   | 11        |
| 1.4      | GLIVE.....                                                                                                                                   | 12        |
| 1.4.1    | Osnovne značilnosti in sistematika .....                                                                                                     | 12        |
| 1.4.2    | Glivna celica in njena fiziologija.....                                                                                                      | 13        |
| 1.4.3    | Endofitske glive .....                                                                                                                       | 18        |
| 1.5      | PROTIMIKROBNE UČINKOVINE .....                                                                                                               | 22        |
| 1.5.1    | Razdelitev .....                                                                                                                             | 22        |
| 1.5.2    | Rezistenca mikrobov proti protimikrobnim učinkovinam .....                                                                                   | 24        |
| 1.5.3    | Preizkušanje protimikrobnih učinkovin in vitro .....                                                                                         | 26        |
| <b>2</b> | <b>NAMEN DELA .....</b>                                                                                                                      | <b>27</b> |
| <b>3</b> | <b>MATERIALI IN METODE.....</b>                                                                                                              | <b>28</b> |
| 3.1      | REAGENTI .....                                                                                                                               | 28        |
| 3.2      | MATERIAL.....                                                                                                                                | 29        |
| 3.3      | GOJIŠČA .....                                                                                                                                | 29        |
| 3.4      | BIOLOŠKI MATERIAL .....                                                                                                                      | 30        |
| 3.5      | APARATURE .....                                                                                                                              | 33        |
| 3.6      | MIKRODILUCIJSKI TEST .....                                                                                                                   | 33        |
| <b>4</b> | <b>EKSPERIMENTALNI DEL .....</b>                                                                                                             | <b>34</b> |
| 4.1      | ZAČETNO GOJENJE GLIV .....                                                                                                                   | 34        |
| 4.1.1    | Gojenje na trdnem gojišču s krompirjevim izvlečkom in glukozo.....                                                                           | 34        |
| 4.1.2    | Priprava trajnih kultur .....                                                                                                                | 34        |
| 4.2      | PRIPRAVA IZVLEČKOV TRDNIH GOJIŠČ Z MICELIJEM Z RAZLIČNIMI TOPILI.....                                                                        | 35        |
| 4.3      | PRIPRAVA LURIA-BERTANI TRDNIH GOJIŠČ.....                                                                                                    | 35        |
| 4.4      | MIKRODILUCIJSKI TEST – PREIZKUŠANJE PROTIBAKTERIJSKEGA UČINKA IZVLEČKOV TRDNEGA GOJIŠČA Z MICELIJEM, PRIPRAVLJENIH Z RAZLIČNIMI TOPILI ..... | 36        |
| 4.5      | MIKRODILUCIJSKI TEST – PREIZKUŠANJE PROTIBAKTERIJSKEGA UČINKA IZVLEČKOV TRDNEGA GOJIŠČA Z MICELIJEM IN NJIHOVIH REDČITEV .....               | 38        |
| <b>5</b> | <b>REZULTATI.....</b>                                                                                                                        | <b>40</b> |
| 5.1      | ZAČETNO GOJENJE GLIV .....                                                                                                                   | 40        |
| 5.1.1    | Gojenje na trdnem gojišču s krompirjevim izvlečkom in glukozo.....                                                                           | 40        |
| 5.1.2    | Priprava trajnih kultur .....                                                                                                                | 45        |
| 5.2      | PRIPRAVA IZVLEČKOV TRDNIH GOJIŠČ Z MICELIJEM Z RAZLIČNIMI TOPILI.....                                                                        | 45        |
| 5.3      | MIKRODILUCIJSKI TEST – PREIZKUŠANJE PROTIBAKTERIJSKEGA UČINKA IZVLEČKOV TRDNEGA GOJIŠČA Z MICELIJEM, PRIPRAVLJENIH Z RAZLIČNIMI TOPILI ..... | 49        |
| 5.4      | MIKRODILUCIJSKI TEST – PREIZKUŠANJE PROTIBAKTERIJSKEGA UČINKA IZVLEČKOV TRDNEGA GOJIŠČA Z MICELIJEM IN NJIHOVIH REDČITEV .....               | 50        |
| <b>6</b> | <b>RAZPRAVA.....</b>                                                                                                                         | <b>51</b> |
| <b>7</b> | <b>SKLEP .....</b>                                                                                                                           | <b>53</b> |
| <b>8</b> | <b>LITERATURA.....</b>                                                                                                                       | <b>54</b> |

## POVZETEK

Človeštvo se v 21. stoletju sooča z rezistenco patogenih mikroorganizmov na некоč zelo uspešne protimikrobne učinkovine. Rezistenca je neizogiben odgovor evolucije na uporabo protimikrobnih učinkovin. Rezistentni sevi ogrožajo življenja bolnikov, še posebej tistih z oslabljenim imunskim sistemom.

Za uspešno terapijo je nujen konstanten razvoj novih protimikrobnih učinkovin, saj so dosedanje izkušnje pokazale, da so zaradi pojava vedno novih rezistentnih sevov tudi najnovejše učinkovine uspešne v zelo omejenem časovnem obdobju. Rezistenca se slej kot prej razvije proti vsaki učinkovini, zato moramo nujno uporabiti različne pristope, med katerimi je zelo pomembno iskanje spojin vodnic z rešetanjem različnih organizmov. Endofitske glive so zaradi svojega raznolikega metabolizma zanimiv vir potencialno uporabnih učinkovin. Ugotavljali smo protibakterijsko aktivnost izvlečkov kultur 27 glivnih sevov, ki smo jih izolirali kot endofite iz različnih delov rastlin, vzorčenih na zanimivih lokacijah po Sloveniji. Izvlečke smo pripravili z različno polarnimi topili (metanolom, etilacetatom in diklorometanom). Rešetanje smo izvedli z uporabo mikrodilucijskega testa, ki je primeren za preizkušanje izvlečkov. Kot testni mikroorganizem smo uporabili bakterijo *Escherichia coli* ER2738. 5 diklorometanskih izvlečkov je bilo učinkovitih proti testnemu organizmu. Cilj nadaljnjih raziskav je bil ugotoviti kateri izmed 5 učinkovitih glivnih sevov ima najmočnejši učinek. Ugotovili smo, da imata najmočnejši učinek glivna seva z oznakama 2 in 35, izolirana iz rastlin *Sambucus nigra* L. (črni bezeg) in *Pinus nigra* Arnold (črni bor). Vsi učinkoviti izvlečki so dovolj obetavni, zato so potrebne nadaljnje raziskave, čiščenje izvlečkov ter izolacija in karakterizacija aktivnih komponent.

# 1 UVOD

## 1.1 Naravni produkti in tradicionalni pristopi v medicini

Naravni produkti so naravno pridobljeni metaboliti in/ali stranski produkti iz mikroorganizmov, rastlin ali živali. Narava je že tisočletja vir zdravilnih učinkovin. Mnogo spojin, ki jih danes uporabljamo v terapevtske namene, so raziskovalci izolirali iz naravnih virov, pri tem pa so velikokrat sledili izkušnjam tradicionalne medicine. Danes so največji uporabniki tradicionalnih zdravil Kitajci z več kot 5000 rastlinami in rastlinskimi produkti v njihovi farmakopeji. Svetovno najbolj znana in vsesplošno uporabljana zdravilna učinkovina je acetilsalicilna kislina, ki ima naravni izvor v glikozidu salicinu. Tega najdemo v številnih vrstah iz rastlinskih rodov *Salix* in *Populus*. V majhnih populacijah domorodcev v številnih oddaljenih krajih na Zemlji, kot so nekatere plemenske skupine v Amazonski kotlini, gorjani v Papui Novi Gvineji in avstralski Aboridžini, je uporaba naravnih produktov za zdravljenje tudi danes pogosta. Uporabljajo predvsem rastline, ki pomagajo pri lajšanju znakov različnih zdravstvenih težav, kot so prehlad, težke rane in črevesne težave. Zgodovina kaže, da so tudi izumrle civilizacije odkrivale koristnost zdravilnih rastlin. Približno 3000 let nazaj so Maji za zdravljenje črevesnih težav uporabljali glive, ki so rasle na zeleni koruzi (1). Že stari Grki so uporabljali praproto (*Aspidium* sp.) kot antihelmintik, podobno kot Azteki metliko (*Chenopodium* sp.). Antični hindujci so zdravili gobavost s čolmugro (*Hydnocarpus* sp.). Stoletja so ljudje uporabljali različne plesni za zdravljenje okuženih ran (2). Benediktinski redovniki so okrog leta 800 začeli uporabljati mak (*Papaver somniferum* L.) kot anestetik in analgetik, kot so to počeli Grki pred njimi. V prejšnjih časih so številni ljudje spoznali, da jim mešanice listov, korenin in stebel lahko pomagajo. Ti rastlinski produkti so v splošnem izboljševali kakovost življenja, zmanjševali bolečino in trpljenje ter nudili olajšanje, čeprav je razumevanje kemijske narave biološko aktivnih spojin v teh kompleksnih zmesih in kako so te delovale ostalo skrivnost (1).

Šele ko je Pasteur odkril, da fermentacijo povzročajo žive celice, so ljudje resno začeli preiskovati mikroorganizme kot vir biološko aktivnih naravnih produktov. Flemingovo odkritje penicilina v glivi *Penicillium notatum* leta 1929 in prva širša terapevtska uporaba omenjenega antibiotika v 40. letih prejšnjega stoletja sta začela novo obdobje medicine, t.i. »zlato dobo antibiotikov«. Od takrat naprej se ljudje ukvarjajo z odkrivanjem in uporabo

biološko aktivnih metabolitov iz mikroorganizmov (1). Rezultati dolgoletnih raziskav so danes spojine, ki sodijo med najpomembnejše izdelke farmacevtske industrije: protibakterijske učinkovine kot so penicilini iz *Penicillium* sp., cefalosporini iz *Cephalosporium acremonium*, aminoglikozidi, tetraciklini in poliketidi iz *Streptomyces* sp., imunosupresivi, kot npr. ciklosporin in rapamicin iz *Streptomyces* sp., učinkovine za zniževanje koncentracije holesterola v krvi, kot sta npr. mevastatin in lovastatin iz *Penicillium* sp. ter antihelmintiki in učinkovine proti parazitom, npr. ivermektini iz *Streptomyces* sp. (2). Odkrivanje velikega števila mikroorganizmov, ki bi lahko bili vir potencialnih zdravilnih učinkovin, je sedaj izvedljivo zaradi razvoja novih in izpopolnjenih postopkov reševanja. Ti postopki uporabljajo posamezne organizme, celice, encime in tehnike, ki so velikokrat avtomatizirane, kar omogoča hitro detekcijo (1).

Naravni produkt pogosto služi kot spojina vodnica, katere aktivnost lahko izboljšamo z manipulacijo s pomočjo kombinatorne in sintezne kemije. Naravni produkti nudijo neizmerno raznovrstnost kemijskih struktur, ki je neprimerljiva celo z največjimi kombinatornimi knjižnicami (1).

## 1.2 Endofiti kot vir biološko aktivnih spojin

Pojav rezistence patogenih mikroorganizmov, kot so *Staphylococcus* sp., *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus* sp. in drugi, na protimikrobne učinkovine in prisotnost naravno odpornih mikroorganizmov sta spodbudila iskanje novih in boljših antibiotikov. Pojav novih bolezni v človeški populaciji, kot sta AIDS in akutni sindrom oteženega dihanja (SARS), zahteva odkritje in razvoj novih zdravil za boj proti njim. Bolezni kot je AIDS ne zahtevajo samo zdravila, ki ciljajo specifično na njih, pač pa tudi nove terapije za zdravljenje drugih infekcij, ki so posledica oslabljenega imunskega sistema. Tudi pri drugih imunokompromitiranih bolnikih (na primer pri bolnikih z rakom in bolnikih po presaditvah organov) je povečano tveganje za okužbe z oportunističnimi mikroorganizmi, kot so *Aspergillus* sp., *Cryptococcus* sp. in *Candida* sp., ki normalno ne povzročajo večjih težav v človeški populaciji. Tudi izbor učinkovin proti parazitom ni dovolj velik, da bi lahko uspešno zdravili protozojske parazitske infekcije kot so malarija, lišmanioza, tripanosomoza in filarioza, čeprav verjetno vsako leto terjajo več življenj kot katerakoli druga skupina infekcijskih bolezni. Endofiti, mikroorganizmi, ki živijo v tkivih živečih

rastlin, so razmeroma neraziskani in predstavljajo nov vir potencialno uporabnih zdravilnih učinkovin. Vsaka posamezna rastlina izmed približno 300000 rastlinskih vrst, ki obstajajo na Zemlji, je gostitelj enega ali več endofitov. Samo nekaj teh rastlin (nekatero vrste trav) so popolnoma raziskali v smislu njihove endofitske biologije. Posledično obstaja velika verjetnost, da bomo med velikim številom rastlin v različnih okoljih in ekosistemi našli nove in zanimive endofitske mikroorganizme. Ocene predvidevajo vsaj 1 milijon vrst endofitov (3).

Od Freemanovega odkritja endofitov v *Lolium temulentum* L. (omotna ljuljka) leta 1904 so različni raziskovalci definirali endofite na različne načine (1). Bacon in White podajata inkluzivno in široko sprejeto definicijo endofitov - "mikroorganizmi, ki kolonizirajo živa, notranja tkiva rastlin, ne da bi povzročali kakšne neposredne, očitne negativne posledice". Gre torej za mikroorganizme (predvsem glive in bakterije), ki asimptomsko živijo v medceličnih prostorih rastlinskih tkiv (4). Ponavadi gre za zapleten simbiozni odnos. Ti endofitski odnosi so se lahko začeli razvijati že v času, ko so se višje rastline prvič pojavile na Zemlji, stotine milijonov let nazaj. Dokaz z rastlinami združenih mikroorganizmov so odkrili v fosiliziranih tkivih stebel in listov (5).

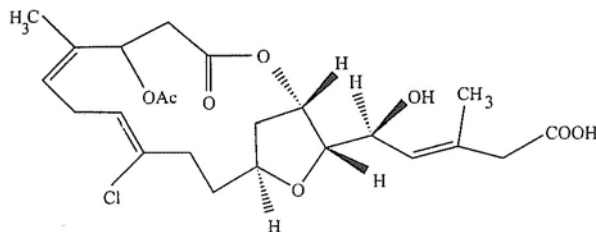
Nekateri endofiti lahko izdelujejo biološko aktivne spojine, sekundarne metabolite, ki so lahko vpleteni v odnos gostitelj-endofit. Sekundarni metaboliti so definirani kot spojine nizke molekulske mase, ki niso nujno potrebne za rast organizma. Organizmi jih izdelujejo zaradi adaptacije za specifične funkcije v naravi (1). Lahko se izkaže, da so zaradi vloge, ki jo lahko imajo v naravi, sekundarni metaboliti uporabni tudi kot zdravilne učinkovine. Po svetu vlagajo znanstvene napore v izolacijo endofitov in proučevanje njihovih naravnih produktov. Endofiti prispevajo k odnosu gostitelj-endofit, tako da izvajajo funkcije, kot je zaščita gostitelja pred vdirajočimi patogenimi glivami in bakterijami. Endofit lahko nudi rastlini zaščito s pomočjo protimikrobnih spojin, ki jih izdeluje. Nekatero od teh spojin so mogoče uporabne za zdravljenje, saj lahko imajo protiglivično, protibakterijsko, protimalarijsko in druge biološke aktivnosti. Glavna težava je toksičnost potencialnega zdravila za višje organizme kot so živali in človek. Ker je rastlina, v kateri je endofit, tudi evkariontski sistem, utegnejo imeti antibiotiki, ki jih izdeluje endofit, zmanjšano celično toksičnost. V nasprotnem primeru bi lahko prišlo do odmrta gostiteljskega tkiva. Rastlina je torej imela vlogo naravnega selekcijskega sistema za mikroorganizme, ki imajo biološko aktivne molekule z zmanjšano toksičnostjo za višje organizme (5).

Določeni metaboliti mikroorganizmov so značilni za določene biotope. Številni dejavniki, ki se v gostitelju spreminjajo glede na letni čas in starost, okolje in lokacijo, lahko vplivajo na biologijo endofita, saj med endofitom in gostiteljem stalno potekajo metabolne interakcije. Pri iskanju novih sekundarnih metabolitov bi se morali osredotočiti na organizme, ki naseljujejo unikatne biotope. Potrebno je previdno preučiti in izbrati biološki vir, ne pa imeti popolnoma naključen pristop pri izbiri materiala. Organizmi in njihovi biotopi, ki so podvrženi stalnim presnovnim in okoljskim interakcijam, bi morali izdelovati še več sekundarnih metabolitov. Nove in zanimive endofitske mikroorganizme običajno najdemo v rastlinah ekstremnih rastišč, v rastlinah, ki rastejo v unikatnem okolju, v tistih, ki imajo etnobotanično uporabo, so izjemno stare ali imajo zanimive endemske lokacije. Zato je potrebno zagotoviti enega ali več takih pogojev (1). V Sloveniji imamo zaradi geografske raznolikosti veliko rastlin, ki zadostijo tem pogojem. Ljubljansko barje, Sečoveljske soline, Lovrenško barje in pragozdovi so potencialno izjemno zanimivi. Ker je število rastlinskih vrst na svetu tako veliko, je potrebno uporabiti kreativne in domiselne strategije za hitro zožitev iskanja endofitov, ki kažejo biološko aktivnost. To strategijo izbora rastlin vodi nekaj smiselnih hipotez, in sicer naslednje:

- Preučiti je potrebno rastline iz unikatnega okolja, zlasti tiste z nenavadno biologijo in tiste z novimi strategijami za preživetje.
- Preučiti je potrebno rastline, ki imajo etnobotanično zgodovino (tiste rastline, ki so jih posamezna ljudstva uporabljala skozi zgodovino do danes) in so povezane s specifično uporabo. Lahko se izkaže, da zdravilna moč botaničnega vira dejansko nima nič opraviti z naravnimi produkti rastline, pač pa s produkti endofitov, ki v rastlini živijo.
- Verjetnost, da bomo našli endofite z aktivnimi naravnimi produkti, je večja tudi pri endemskih rastlinah in rastlinah, ki imajo nenavadno dolgo življenjsko dobo.
- V rastlinah, ki rastejo na področjih velike biodiverzitete, je večja verjetnost prisotnosti endofitov z veliko biodiverzitet (1).

Vodno rastlino *Rhyncholacis penicillata* Matthiesen so našli v rekah jugozahodne Venezuele, kjer je grobo vodno okolje podvrglo rastlino neprestanemu udarjanju deročih voda, drobirja in prodnikov. To je ustvarilo veliko vhodov, skozi katere bi pogoste fitopatogene oomicete lahko vstopile v rastlino. Vseeno je rastlinska populacija ostala zdrava, verjetno zaradi zaščite s pomočjo endofitskega produkta. Zato so to rastlino izbrali

za obširno raziskavo njenih endofitov. Iz *R. penicillata* so izolirali močan protiglivni sev *Serratia marcescens*, za katerega se je izkazalo, da izdeluje oocidin A, novo antioomicetno spojino, ki je kloriran makrociklični lakton (1).



**Slika 1:** Oocidin A (3).

Kot je bilo že omenjeno, je potrebno raziskati tudi rastline z etnobotanično zgodovino, saj je zdravilna uporaba rastline lahko bolj povezana z njeno populacijo endofitov kot pa s samo rastlinsko biokemijo. Tako so na primer rastlino *Kennedia nigriscans* iz severnega območja Avstralije izbrali za raziskavo, ker se njen sok tradicionalno uporablja kot zdravilo že vrsto let. Poleg tega pa so to območje izbrali za vzorčenje rastlin, ker tam živi dolgo obstoječa civilizacija - avstralski Aboridžini. Aboridžini rastlino zdrobijo in pripravijo prevretek, ki ga uporabljajo za zdravljenje ureznin, ran in okužb. Kot se je izkazalo, je rastlina vsebovala nov endofit, *Streptomyces* sp. sev NRRL 30562, ki izdeluje nove širokospektralne peptidne antibiotike, imenovane munumbicini (1). Prav tako so iz listov rastline *Desmodium uncinatum* (Jacq.) DC., ki jo domačini iz višavij Papue Nove Gvineje uporabljajo za zdravljenje ran, izolirali endofitsko glivo, ki izdeluje spojino s protiglivnim in protibakterijskim delovanjem (6).

Na območjih visokega endemizma rastlin lahko najdemo tudi specifične endofite, ki so se lahko razvili z endemskimi rastlinskimi vrstami (1).

Ekosistemi z največjo biodiverzitetjo imajo največje število endofitov in mikroorganizme z največjo biodiverzitetjo. Tropski in zmerni deževni gozdovi so najbolj biološko raznovrstni kopenski ekosistemi na Zemlji. Najbolj ogrožena izmed teh področij pokrivajo le 1,44 % površine kopnega, vendar je tam več kot 60 % kopenske biodiverzitete. Biološka raznovrstnost nakazuje kemijsko raznovrstnost zaradi stalnih kemijskih inovacij, ki obstajajo v ekosistemih, kjer je evolucijski boj za obstanek najbolj aktiven. Tropski deževni gozdovi so izreden primer tega tipa okolja. Tekmovalnost je velika, viri so omejeni in selekcijski pritisk je maksimalen. To povečuje verjetnost, da so deževni

gozdovi vir novih molekulskih struktur in biološko aktivnih spojin. Na osnovi statističnih podatkov, ki primerjajo število biološko aktivnih naravnih produktov, izoliranih iz endofitov tropskih območij s številom tistih, ki so jih izolirali iz endofitov zmernih območij, so ugotovili, da tropski endofiti izdelujejo več aktivnih naravnih produktov kot endofiti zmernih območij. Opazili pa so tudi, da je znatno večje število tropskih endofitov izdelalo večje število aktivnih sekundarnih metabolitov kot glive iz drugih tropskih substratov. To opažanje kaže na pomembnost gostiteljske rastline pri vplivanju na metabolizem endofitskih mikroorganizmov (1). S stališča velike biodiverzitete so zanimiva zlasti naslednja področja: mizaste gore (tepuji) v Venezueli, deževni gozdovi Srednje Amerike, monsunska območja Avstralije, otok Kawai v havajskem otočju, Zlati trikotnik, kjer se stikajo meje Mjanmara, Laosa in Tajske, višavje in obalna področja Papue Nove Gvineje, Madagaskar, območja gornje Amazonke itn. Največja težava za prihodnost endofitske biologije je problem hitro izginjajočih deževnih gozdov, ki predstavljajo največji možni vir mikroorganizmov in njihovih produktov. Ko izgine rastlinska vrsta, najbrž izginejo tudi vsi mikroorganizmi, ki v tej rastlinski vrsti živijo. To še zlasti velja za tiste mikroorganizme, ki so razvili specifične simbiotne odnose z njihovimi rastlinskimi gostitelji (5).

V rastlinah, ki izdelujejo biološko aktivne spojine v nekaterih primerih najdemo endofite, ki izdelujejo enake spojine. Tako je, na primer, s taksolom, diterpenoidom in znano protitumorno učinkovino, ki jo najdemo v vseh vrstah tise (*Taxus* sp.). Leta 1993 pa so iz tise *Taxus brevifolia* Nutt. izolirali in opisali novo glivo *Taxomyces andreanae*, ki izdeluje taksol. Tan in Zou (3) menita, da bi razlog, zakaj nekateri endofiti izdelujejo določene spojine, ki so značilne za gostitelja, lahko bil povezan z genetsko rekombinacijo endofita z gostiteljem, do katere pride v evolucijskem času. Ta koncept so predlagali kot mehanizem za razlago, zakaj endofitska gliva *T. andreanae* lahko izdeluje taksol. Možno je, da je prišlo do prenosa genske informacije iz drevesa na glivo ali obratno. Če endofiti lahko izdelujejo enake, redke in pomembne biološko aktivne spojine kot njihove gostiteljske rastline, to ne bi le zmanjšalo potrebo po uničevanju počasi rastočih in mogoče redkih rastlin, ampak bi tudi ohranilo biodiverzitetu. Poleg tega je mikrobní vir cenjenega produkta lažje in bolj ekonomično izdelati, kar učinkovito znižuje njegovo tržno ceno (3).

### 1.3 Terensko delo in delo v laboratoriju

Izberemo primeren habitat in rastlino ter izbrano rastlino identificiramo. Zapišemo natančno lokacijo. Pri tem si pomagamo z GPS sistemom (1). Vzorčimo liste, stebila, korenine in ostale rastlinske dele. Ker ne potrebujemo celih rastlin, z delom ne ogrozimo populacije redkih in zaščitениh rastlin. Vzorce shranimo v sterilnih epruvetah ali plastičnih vrečkah pri 4°C in čim prej prenesemo v laboratorij. Čeprav se rastlinski vzorec lahko izsuši, če ga shranjujemo več kot nekaj dni, endofiti, ki so v njem, lahko preživijo več tednov. V laboratoriju rastlinske vzorce površinsko steriliziramo s 70 % etanolom, da odstranimo vse epifite (mikroorganizme na površini vzorcev). Potem v sterilni komori z laminarnim pretokom zraka s sterilnim nožem odrežemo zunanja tkiva vzorca, da izpostavimo notranjo površino trdnemu gojišču s krompirjevim izvlečkom in glukozo (PDA) v pokriti petrijevki. Po približno enem tednu inkubacije pri sobni temperaturi lahko vidimo bakterijsko rast in hife gliv, ki izraščajo iz rastlinskega vzorca. V naslednji fazi endofite precepimo na novo gojišče. S precepljanji nadaljujemo, dokler ne dobimo čiste kulture. Razlike v morfologiji, obliki in barvi pomagajo pri razločevanju med različnimi mikroorganizmi. Čeprav veliko endofitov zapusti vzorec rastlinskega gostitelja in zraste na PDA ploščah, pa ni nujno, da bodo vsi endofiti zrasli na gojišču (6).

Endofite lahko identificiramo s pomočjo svetlobne mikroskopije. V ta namen opazujemo spore gliv, ki se od vrste do vrste razlikujejo. Sporulacijo endofita lahko induciramo s spremembo temperature, obsevanjem z UV svetlobo itd. Endofitske glive in bakterije lahko najbolj zanesljivo identificiramo z uporabo verižne reakcije s polimerazo (PCR) in določitvijo zaporedja (sekveniranjem) DNA. To je tudi edini možen način identifikacije tistih endofitskih gliv, ki nam jih ni uspelo pripraviti do sporulacije (*Mycelia sterilia*). PCR lahko izvajamo na gojenih endofitih z uporabo oligonukleotidnih začetnikov (primerjev), ki pomnožujejo DNA, ki kodira ribosomalno RNA (rRNA). S sekveniranjem pomnožene DNA in primerjavo s podatkovnimi bazami lahko ugotovimo, ali gre za novo vrsto ali ne. Če je zaporedje znano, lahko identificiramo vrsto (6).

Metabolne interakcije endofita z gostiteljem lahko favorizirajo sintezo biološko aktivnih sekundarnih metabolitov. Izolacija endofitov iz njihovega naravnega habitata zato lahko vpliva na njihov metabolizem (7). Določeni dejavniki lahko povzročijo produkcijo biološko aktivnih spojin v kulturi. Tako so ugotovili, da lahko produkcijo taksola izven rastline povečajo z dodatkom različnih spojin, med katerimi se je kot najbolj učinkovita

pokazala benzojska kislina (6). Poleg tega pogoji, kot so temperatura, sestava gojišča oz. količina hranil, stopnja prezračevanja, mešanje, vplivajo na rast in sintezo sekundarnih metabolitov (3). Prav tako na količino in vrsto spojin vpliva način fermentacije ter ekstrakcijske tehnike (7).

Preizkušanju biološke aktivnosti (največkrat protibakterijsko in protiglivično delovanje) sledi določevanje strukture aktivnih komponent. Dve glavni tehniki, ki ju uporabljamo za določevanje strukture, sta masna spektrometrija (MS) in jedrska magnetna resonanca (NMR). Poleg tega za določevanje strukture lahko uporabimo tudi rentgensko difrakcijo, če vzorec lahko kristaliziramo. Ne pripeljejo vse raziskave do odkritja novih spojin. Včasih določanje strukture razkrije že znano biološko aktivno spojino, čeprav je njen vir lahko nov (6).

## **1.4 Glive**

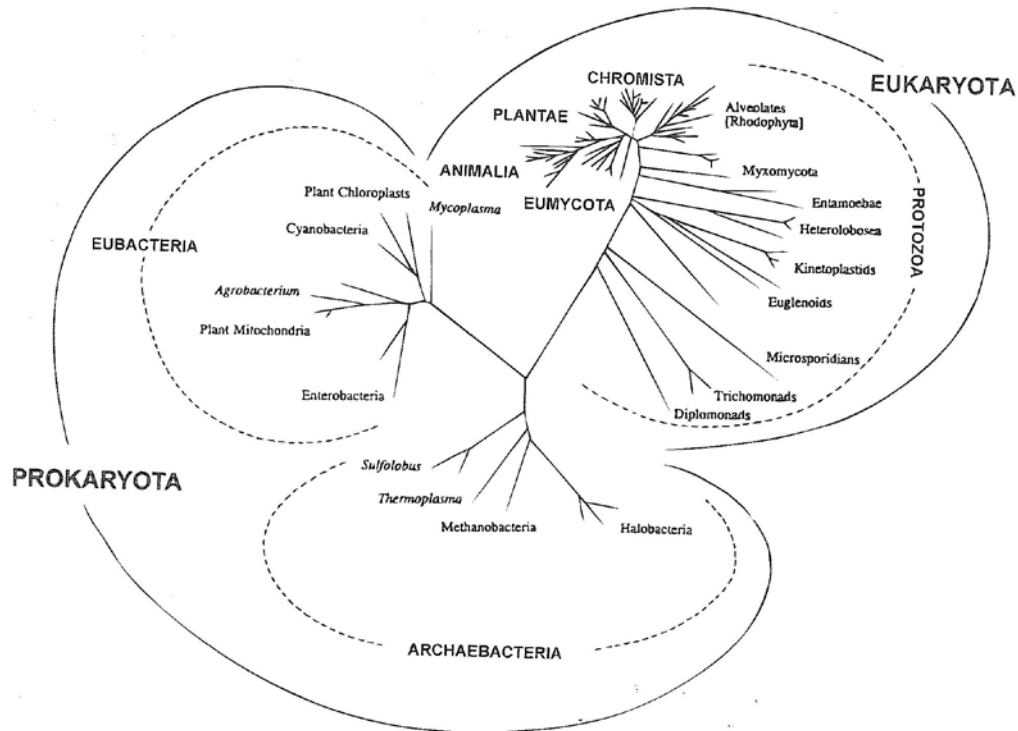
### **1.4.1 Osnovne značilnosti in sistematika**

Glive so posebna skupina živih bitij, bližje živalim kot rastlinam. Na prvi pogled so sicer glive zelo podobne rastlinam, saj imajo celično steno, se ne gibljejo in črpajo hranila iz substrata. Vendar se, če jih pogledamo bolj natančno, od rastlin v marsičem razlikujejo: imajo celično steno iz hitina (pri rastlinah je iz celuloze), nimajo klorofila, torej morajo organsko hrano sprejeti iz okolice - so heterotrofi (rastline so avtotrofi in fototrofi), rezervna hrana je glikogen (pri rastlinah je škrob). Glive so torej evkariontski, heterotrofni organizmi, ki se prehranjujejo z absorpcijo organskih snovi iz okolice. Glede na vire hrane jih delimo na: parazite (zajedalke), saprofite (gniloživke) in simbionte (soživke) (8).

Glive so izjemno raznolika in slabo znana skupina organizmov, kar potrjuje število znanih vrst v primerjavi z ocenjenim skupnim številom vrst gliv. Opisali so približno 100000 vrst gliv, celotno število vrst gliv na Zemlji pa naj bi bilo kar 1,5 milijona (9).

Glive imajo velik pomen v evoluciji, opravljajo ekosistemske funkcije in s tem tudi omogočajo obstoj človeka. Njihova vloga v ekosistemih je zelo pomembna, saj predstavljajo naravne mehanizme za recikliranje. To vlogo izvajajo tako, da se prehranjujejo z odmrliimi organizmi in razgrajujejo organske snovi. Kot razgrajevalci organskih snovi predstavljajo bistveni dejavnik kroženja hranil v ekosistemih (9).

Večino gliv uvrščamo v samostojno kraljestvo gliv (Eumycota), ki poleg živali (Animalia), rastlin (Plantae), alg in stramenopil (Chromista) ter protozojev (Protozoa) tvorijo sistem petih evkariontskih kraljestev (2).



**Slika 2:** Sistem prokariontov in evkariontov (9).

## 1.4.2 Glivna celica in njena fiziologija

### 1.4.2.1 Strukturne značilnosti

Glive so evkariontski organizmi. V vsaki celici najdemo najmanj eno jedro, obdano z jedrno membrano, endoplazemski retikulum, mitohondrije in celične vključke (npr. glikogenska zrna). Celično membrano obdaja rigidna celična stena. Celična stena daje glivam obliko in ščiti celice pred velikimi spremembami osmotskega tlaka v okolju. Sestavljena je pretežno iz ogljikovih hidratov, med njimi so najpomembnejši glukani beta, manani in hitin. Le 10 % tvorijo lipidi, proteini in glikoproteini. Pod celično steno leži dvoslojna celična membrana, ki ima podobno strukturo kot membrana višjih evkariontov. Rabi kot zaščita citoplazme in znotrajceličnih organelov, uravnava vnos in izločanje snovi

ter sodeluje pri sintezi celične stene. Glavna sestavina celične membrane so fosfolipidi, najpogostejša sta fosfatidilholin in fosfatidiletanolamin. Esencialna sestavina membrane gliv so steroli. Med njimi sta najpomembnejša ergosterol in zimosterol, ki ju v membranah sesalcev ne najdemo. Celični organeli gliv se ne razlikujejo od tistih pri višjih evkariontih. Citoplazma ima pogosto več jeder, število mitohondrijev pa se spreminja. V citoplazmi najdemo še endoplazemski retikulum in sekrecijske vakuole, v katerih so sekundarni metaboliti. Pri nekaterih glivah so to snovi z močnimi biološkimi učinki, med njimi so karcinogeni (aflatoksin), toksini (amanitin), antibiotiki, citostatiki in druge farmakološko aktivne spojine (ergotamin) (10).

Po obliki rasti ločimo kvasovke in nitaste glive. Kvasovke so enocelične glive. Večina kvasovk, kot je *Saccharomyces cerevisiae*, je ovalne ali okrogle oblike, s premerom 5-10  $\mu\text{m}$ , in se razmnožujejo z brstenjem, ostale, kot je *Schizosaccharomyces pombe*, pa so kratke palčke s premerom okoli 5  $\mu\text{m}$ , ki se razmnožujejo z longitudinalno rastjo in delitvijo po sredini, tako da nastaneta dve hčerinski celici. Včasih pa hčerinska celica ne tvori brstov, ampak se začne podaljševati. Nastala struktura spominja na hifo in jo imenujemo psevdohifa ali psevdomicelij (npr. *Candida albicans*). Na trdnem gojišču kvasovke rastejo kot voskaste kolonije, podobno kot bakterije. Številne imajo značilen vonj po kvasu. Vlaknate (nitaste, filamentozne) glive so sestavljene iz številnih razvejenih hif in tvorijo posebno strukturo – micelij. Del, ki se vrašča v hranilno podlago, imenujemo vegetativni micelij, tistega, ki izrašča navzven in nosi razmnoževalne strukture, pa imenujemo zračni micelij. Hife iste vrste glive se lahko med seboj precej razlikujejo v premeru, odvisno od dejavnikov okolja, položaja v koloniji in starosti kolonije. Debelina hif je ponavadi v območju od 3  $\mu\text{m}$  do 10  $\mu\text{m}$ . Hife višjih gliv so ponavadi pregrajene s septami. Dolžina teh oddelkov zelo variira. Septe askomicet in mitospornih gliv so običajno perforirane in pore so včasih tako velike, da omogočajo pretok protoplazme in celo prehod jeder. Hife nižjih gliv običajno niso razdeljene s septami. Makroskopsko so kolonije različno obarvane, površina zračnega micelija je bolj ali manj puhastega videza. Za večino gliv je značilen dimorfizem, to pomeni, da lahko obstajajo v nitasti obliki ali v obliki kvasovk. Oblika je odvisna od rastnih razmer v okolju. Celice kvasovk vsebujejo samo eno jedro. Hifni oddelki lahko vsebujejo eno ali več jeder. Pri večini filamentoznih gliv v vegetativni fazi so jedra haploidna. Nekatere kvasovke, med njimi tudi *Saccharomyces cerevisiae*, se lahko podvojujejo v haploidni in diploidni fazi celičnega ciklusa, vendar so v naravi večinoma diploidne. Jedra večine gliv so majhna, s premerom

1-2  $\mu\text{m}$  in vsebujejo različno število kromosomov. Mitohondriji gliv so ploščati, podobno kot pri rastlinah in živalih. Posamezni mitohondriji se lahko zlivajo v večje in obratno, večji mitohondriji lahko fragmentira na manjše. Plazmidi pri glivah niso pogosti. Glive lahko podobno kot ostali evkarionti kopičijo lipide kot energijsko rezervo v obliki drobnih kapljic, ki jih najdemo predvsem v starejših celicah. Zalogo energije ustvarjajo tudi v obliki glikogena. Glikogen je v celicah v obliki netopnih granul s kompleksno terciarno strukturo. Poleg glikogena najdemo tudi ogljikove hidrate z nizko relativno molekulsko maso: monosaharide, disaharide (trehalozo), sladkorne alkohole (glicerol, eritritol, arabitol, ribitol in manitol). Vakuole so v glivnih celicah zelo pogoste. Značilne so predvsem za subapikalne regije. So dinamične strukture, ki igrajo pomembno vlogo pri rasti celice, shranjevanju vode in hranilnih snovi, regulaciji pH, ionski homeostazi in kot ekvivalent živalskih lizosomov (2, 10).

#### **1.4.2.2 Rast in razmnoževanje**

Med evolucijo je večina gliv ohranila spolni in nespolni način razmnoževanja. Končni produkt obeh načinov razmnoževanja so spore, ki se glede na svojo vlogo razlikujejo po obliki in velikosti. Nekatere omogočajo širjenje v okolje, druge pa preživetje v neugodnih razmerah. Glive, pri katerih poznamo spolni način razmnoževanja, imenujemo *Fungi perfecti*. Po obliki spolnega razmnoževanja jih delimo na 3 debla: *Zygomycota*, *Ascomycota* in *Basidiomycota*. Pri mnogih vrstah gliv se je nespolni način izkazal za tako uspešnega, da je spolno razmnoževanje izjemno redko ali ga celo ne poznamo. Te vrste gliv imenujemo *Fungi imperfecti* ali mitosporne glive in jih združujemo v umetno skupino *Deuteromycota* (10).

Spolna združitev lahko poteče med dvema gametama (gametogamija), lahko se združita dva gametangija (gametangiogamija) ali pa dve somatski celici (somatogamija). Spore so lahko endogene ali eksogene (2). Pri spolnem razmnoževanju sledi plazmogamiji (združitvi citoplazme 2 kompatibilnih haploidnih celic) kariogamija (zlitje dednega materiala obeh celic). Po izmenjavi se dedni material razdeli v haploidne zarodne celice (spore). Te v ustreznih razmerah v okolju vzklijejo in tvorijo micelij, ki oblikuje nespolne razmnoževalne strukture, iz katerih se razvijejo konidiji (nespolne spore). Ločimo 3 različne načine spolnega razmnoževanja, ki se med seboj ločijo po različno oblikovanih strukturah – gametangijih, v katerih nastajajo zarodne celice (10).

Za glive iz debla *Zygomycota* je značilno, da s fuzijo dveh hif nastane večjedrna zigospora (npr. *Mucor* sp.). Debela stena ji omogoča preživetje v neugodnih življenjskih razmerah. Ob kalitvi nastopi mejoza, pri čemer se razvije vegetativni haploidni micelij (10).

Spolni način razmnoževanja omogoča glivam iz debel *Ascomycota* in *Basidiomycota* učinkovito širjenje v novo okolje. Mejozi sledi nastanek ogromnega števila spor. Spolne spore, askospore pri glivah iz debla *Ascomycota*, nastajajo v vrečasti strukturi, imenovani askus (npr. *Aspergillus* sp.). Posamezen askus vsebuje 8 askospor. Filogenetsko mlajše glive tvorijo strukture, v katerih so združeni številni askusi. To strukturo imenujemo askokarp. Bazidiospore, zarodne celice debla *Basidiomycota*, nastajajo v bazidiju. Bazidiokarp je makroskopska struktura, sestavljena iz kijastega nosilca, na katerem je bazidij z bazidiosporami (10).

Nespolno se glive razmnožujejo z nespolnimi sporami (konidiji), ki so lahke in se širijo po zraku. Tvorba konidijev poteka na konidiogenih celicah z delitvijo haploidnega jedra. Pri nekaterih vrstah se konidiogene celice morfološko ne razlikujejo od ostalega micelija, pri drugih imajo značilno obliko in jih imenujemo konidiofore. Po načinu nastajanja konidijev ločimo talično in blastično konidiogenezo. Pri talični konidiogenezi cela hifa razpade na posamezne konidije ali artrospore ali pa se konidiji razvijejo iz dela hife. Na ta način nastajajo klamidospore. Pri blastični konidiogenezi nastajajo konidiji z brstenjem konidiogene celice (10).

Glive iz debla *Zygomycota* imajo poseben način nespolnega razmnoževanja. Konidiji, imenovani sporangiospore, nastajajo v vrečasti strukturi – sporangiju. Ko ta dozori, stena počne in sporangiospore se sprostijo v okolico (10).

Če začnemo pri spori, se rast glive začne s klitjem (germinacija), temu sledita asimilacijska rast ter sporulacija in krog je sklenjen. Vsaka stopnja lahko zahteva različne življenjske pogoje.

Na rast vplivajo tudi dejavniki okolja, kot so temperatura, svetloba in gravitacija. Glede na optimalno temperaturo rasti jih delimo na psihofilne (0-17°C), mezofilne (15-40°C) in termofilne glive (35-50°C). Svetloba igra pomembno vlogo predvsem pri razširjanju spor nekaterih rodov gliv, kot so *Pilobolus*, *Podospora* in *Ascobolus*, za katere je značilen fototropizem (lastnost, da se premikajo k svetlobi) (2).

Spore večinoma nastanejo, ko se poslabšajo življenjski pogoji za glivo v asimilacijski rasti, to je npr. padec temperature, pomanjkanje vode ali hranil in tako omogočijo preživetje organizma. Spore so lahko sestavljene iz ene same celice ali pa so razdeljene v več

predelkov, lahko tudi do nekaj deset ali nekaj sto. Nekatere živijo nekaj ur, druge nekaj let. Razširjajo se lahko po zraku, s pomočjo vode ali živali. Spore vzklijejo, ko nastanejo ugodni pogoji za preživetje. Sestava stene spore se razlikuje od hifne stene, je relativno neprepustna. Ko se začne klitje, encimi zmehčajo steno hife in s tem povečajo njeno prepustnost. Po klitju se začne rast in diferenciacija. Pri tem nastanejo mlade hife, poteče migracija citoplazme in jeder. Gliva nato tvori razvejane hife, da lahko kolonizira dovolj veliko področje in pridobi ustrezna hranila. Ko se lokalni viri izčrpajo, se gliva vrača v nove prehranske izvore. Micelij glive se enakomerno širi na vse strani. Hife rastejo na konicah, se podaljšujejo in razvejujejo (11).

Rast večceličnih gliv lahko spremljamo z merjenjem sveže ali suhe mase ali z merjenjem premera kolonije, pri enoceličnih glivah štejemo celice ali merimo motnost gojišča (11).

#### **1.4.2.3 Metabolizem**

Metabolizem lahko definiramo kot sistem biokemijskih reakcij, ki podpirajo življenje. Glede na shranjevanje ali porabljanje energije, ga lahko tudi pri glivah razdelimo na anabolni in katabolni metabolizem.

Glive lahko ogljik asimilirajo v obliki majhnih energijsko bogatih molekul, npr. sladkorjev, ki jih sintetizirajo drugi organizmi. Hemicelulozo, celulozo in lignin razgradijo do manjših molekul z ekstracelularnimi encimi (celulaze, hemicelulaze in ligninaze), ki jih izločajo v okolico in potem iz okolice absorbirajo razgradne produkte. Dušik asimilirajo v obliki nitratov ali amoniaka, veliko gliv pa lahko asimilira tudi aminokisline, polipeptide in proteine. Za rast potrebujejo tudi žveplo, kalij, kalcij, magnezij, železo, baker, mangan, cink, molibden in vitamine.

Produkti sekundarnega metabolizma so spojine, ki niso nujno potrebne za rast organizma. Tovrstne spojine se redko pojavljajo pri živalih, pogoste pa so pri rastlinah, bakterijah in glivah. Običajno nastanejo le v enem delu življenjskega ciklusa iz majhnega števila prekurzorjev, ki so produkt primarnega metabolizma. Sekundarni metaboliti ponavadi nastajajo zelo sporadično, vendar se kopičijo, ker jih organizem ne razgrajuje.

Veliko tovrstnih spojin izkazuje biološko aktivnost na ostale organizme. Razdelimo jih lahko v pet skupin:

- derivati monosaharidov (polisaharidi, peptidopolisaharidi in sladkorni alkoholi)
- kondenzacijski produkti acetata po acetatno-malonatni poti (poliketidi in fenolne spojine)
- kondenzacijski produkti acetata po poti mevalonske kisline (terpeni)
- produkti sinteze aromatskih aminokislin po šikimatni poti (fenolne spojine)
- derivati sinteze ostalih aminokislin.

Acetat je izhodna spojina za sintezo poliacetilenov, poliketidov, steroidov in terpenov. Poliacetileni so spojine z nerazvejano verigo, ki vsebuje konjugirane acetilenske sisteme. Med približno 400 poliacetileni, ki jih poznamo, so jih 80 našli v glivah in to samo pri bazidiomicetah. Poliketide izdelujejo mnoge askomicete in konidijski anamorfi s kondenzacijo acetilnih in malonilnih enot, čemur sledi dekarboksilacija. V to skupino spojin sodijo protiglivni antibiotik grizeofulvin in mikotoksina ohratoksin ter aflatoksin. Sinteza terpenov in steroidov poteče iz izopentenilpirofosfata, ki je sam po sebi derivat acetata. Med derivate terpenov sodijo npr. trihotecenski mikotoksini in giberelinska kislina, mikotoksin zearalenon pa je steroid (2).

Aminokisline so osnovne gradbene enote proteinov, so pa tudi izhodna surovina za sintezo mnogih sekundarnih metabolitov pri glivah. Te metabolite lahko razdelimo v štiri skupine:

- ciklični oligopeptidi (amanitini, ciklosporin)
- indolni alkaloidi (psilocibin, ergot alkaloidi)
- $\beta$ -laktamski antibiotiki (penicilin, cefalosporin)
- rastlinski regulatorji rasti (avksin, citokinin, etilen) (11).

### **1.4.3 Endofitske glive**

#### **1.4.3.1 Osnovne značilnosti**

Glive so najbolj pogosto izolirani endofitski mikroorganizmi (1). Združbe endofitska gliva-rastlina v splošnem obravnavamo ločeno od parazitskih, patogenih in saprofitnih interakcij in jih vidimo kot mutualistične združbe (12). Domnevajo, da je za odnos endofitska gliva-

gostiteljska rastlina značilno natančno uravnavano ravnotežje med virulenco glive in obrambo rastline. Če se to ravnotežje poruši zaradi zmanjšanja obrambe rastline ali povečanja virulence glive, pride do razvoja bolezni (13). Interakcije endofit-gostitelj temeljijo na vzajemnem izkoriščanju. Koristi partnerjev so redko simetrične. Gliva je popolnoma odvisna od gostitelja, saj ne more sama izdelovati hrane. Od gostiteljske rastline pa je odvisen tudi prenos tistih endofitskih gliv, ki imajo omejene možnosti širjenja s sporami. Koristi, ki jih ima gostitelj, pa so zaščita pred rastlinojedi in patogeni ter v primeru mikoriznih gliv (glive, ki živijo samo v koreninskem sistemu rastline) izboljšanje rasti gostitelja in zaščita pred izsušitvijo (12). Endofiti ščitijo gostitelja pred rastlinojedi predvsem tako, da izdelujejo alkaloidne in druge spojine. Tako na primer endofitska gliva *Lophodermium pinastri* pogosto kolonizira notranjost iglic *Pinus sylvestris* L., ne da bi povzročala kakšne simptome. Vloga te glive je odganjanje in odvrčanje rastlinojedov od tega, da bi pojedli iglice (14). Poleg konstitutivne odpornosti pred rastlinojedi, pa so raziskali tudi inducirano odpornost. Dokazali so, da poškodba tkiva listov povzroči povečano odpornost pred določenimi rastlinojedi (6). Endofitska gliva lahko nudi rastlini zaščito pred patogeni s pomočjo protimikrobnih spojin, ki jih izdeluje (5). Patogen premaga obrambni sistem rastline na primer tako, da zmanjša koncentracije fenolnih spojin (metabolitov obrambe). Ko pa nek endofit kolonizira korenine rastline, so koncentracije teh metabolitov enake kot pri kontroli ali celo večje. Tako so ugotovili, da so se po kolonizaciji korenin macesna (*Larix decidua* P. Mill.) z endofitom *Cryptosporiopsis* sp. koncentracije topnih proantocianidinov povečale v primerjavi s kontrolo, po okužbi s patogenom *Heterobasidium annosum* pa so se zmanjšale (13). Mikorizne glive vstopajo v koreninski sistem iz zemlje in preskrbujejo gostiteljsko rastlino z anorganskimi snovmi iz zemlje, medtem ko same dobivajo potrebna hranila iz rastline. Povečujejo absorpcijo fosforja, dušika in drugih elementov. Poleg tega kolonizacija z mikoriznimi glivami povečuje pretok vode skozi rastline. Do tega najbrž pride zato, ker rastline, ki so okužene z endofiti, imajo pogosto večje koreninske sisteme kot neokužene rastline. Korenine z endofiti okuženih rastlin so manjše v premeru, ampak imajo daljše koreninske laske v primerjavi z neokuženimi, kar ima za posledico večjo površino korenin, tako da lahko sprejmejo več vode. To vpliva na rast rastline (6). Tako je kolonizacija korenin macesna (*L. decidua*) z endofitom *Cryptosporiopsis* sp. ali *Phialophora* sp. imela za posledico signifikantno povečanje rasti rastline v primerjavi s kontrolo in v primerjavi z rastlino, okuženo s patogenom *Heterobasidium annosum* (13). Iz mikoriznih gliv pa zaenkrat še niso

izolirali nobenega uporabega produkta (15). Rastline, ki imajo specifične endofite lahko pogosto rastejo hitreje zaradi fitohormonov, ki jih izdelujejo endofiti (6). Najbolj raziskan endofitski sistem (rastlina - mikroorganizem) je odnos vrste trav - *Neotyphodium* sp. Hife rastejo v notranjosti in intercelularno v nadzemna tkiva gostiteljske rastline in v razvijajoče se socvetje in semena in se tako vertikalno prenašajo iz materinske rastline na potomstvo. Domnevajo, da se endofiti rodu *Neotyphodium* lahko prenašajo le vertikalno (preko hif v semenih). Gliva je verjetno popolnoma izgubila neodvisno razvojno stopnjo v svojem življenjskem ciklu in je simbioza bistvena za preživetje in razmnoževanje glive. Nasprotno pa se endofiti iz rodu *Epichloë* lahko prenašajo tudi horizontalno - s spolnimi ali nespolnimi sporami (12). Možna vloga endofitskih gliv je sodelovanje pri biološki razgradnji odmrle ali umirajoče gostiteljske rastline v procesu recikliranja hranil (6).

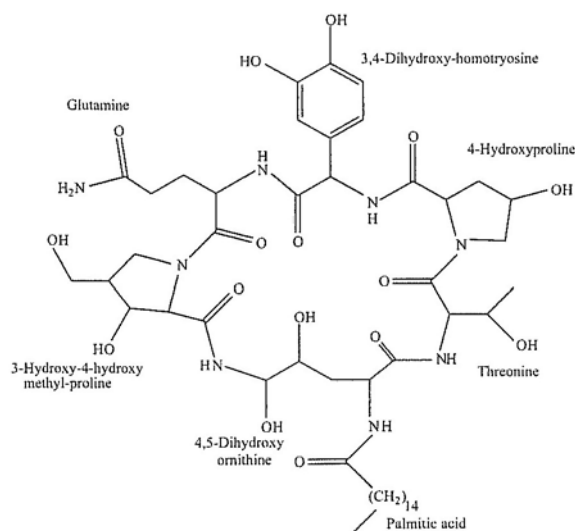
Najbolj pogosto izolirane endofitske glive so iz skupine *Fungi imperfecti* ali *Deuteromycota*. Le-te v osnovi tvorijo nespolne spore v ali na različnih strukturah. Dokaj pogosto pa izolirajo tudi endofitske glive, ki ne tvorijo spor (*Mycelia sterilia*) (3). Poznamo pa tudi endofitske glive iz debla *Ascomycota* (16). Nekatere endofitske glive so specifične za določenega gostitelja, za druge (na primer: *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Xylaria* sp.) pa se zdi, da so vseprisotne (3).

Glede na to da je opisanih le približno 5 % gliv, predstavljajo le-te ogromen potencial za nove učinkovine. V preteklosti so glavni vir protimikrobnih učinkovin predstavljali mikroorganizmi iz zemlje. Nedavne raziskave Barbare Schulz in sodelavcev (13) pa so pokazale, da je večji delež endofitskih gliv pokazal biološko aktivnost v primerjavi z izolati iz zemlje. Poleg tega so med metaboliti, katerim so določili strukture, določali delež novih spojin. Delež novih biološko aktivnih spojin, izoliranih iz endofitov, je bil znatno večji (51 %) v primerjavi z deležem novih biološko aktivnih spojin iz mikroorganizmov iz zemlje (38 %) (13).

#### **1.4.3.2 Primeri spojin iz endofitskih gliv s protimikrobnim delovanjem**

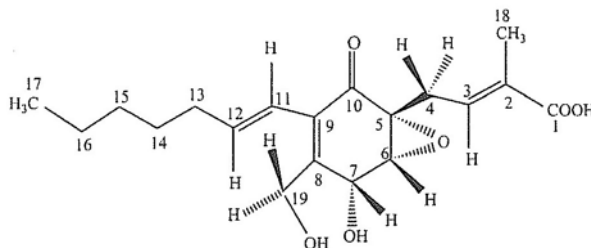
Nekatere spojine iz endofitskih gliv kažejo aktivnost proti fitopatogenom kot tudi proti bakterijam, glivam, virusom in protozom, ki so patogeni za živali in ljudi (3). V nadaljevanju je opisanih le nekaj primerov naravnih produktov iz endofitskih gliv s protimikrobnim delovanjem.

*Cryptosporiopsis cf. quercina* je gliva, ki so jo izolirali kot endofit iz *Tripterigeum wilfordii*, zdravilne rastline, ki izvira iz Evrazije. *C. quercina* je na petrijevkah pokazala odlično protiglivo aktivnost proti nekaterim za človeka pomembnim patogenim glivam, kot sta *Candida albicans* in *Trichophyton* spp. Glede na to, da so glivične okužbe naraščajoč zdravstveni problem, potrebujemo nove antimikotike za spopad s tem problemom. Iz *C. quercina* so izolirali in opisali peptidni antimikotik, imenovan kriptokandin. Kriptokandin trenutno testirajo in razvijajo v nekaterih podjetjih za uporabo proti številnim glivam, ki povzročajo bolezni kože in nohtov (1).



**Slika 3:** Kriptokandin A, protiglivi peptid iz endofitske glive *C. quercina* (5).

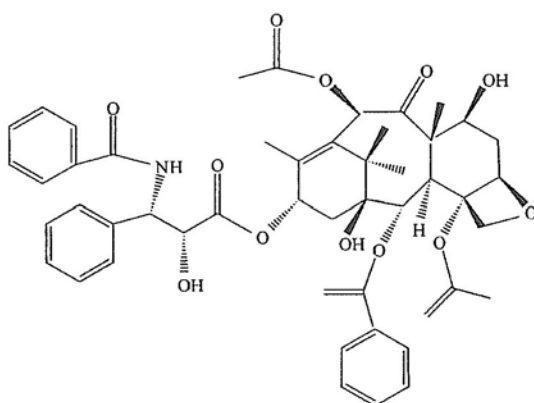
Iz endofitske glive *Pestalotiopsis microspora*, ki je pogost endofit deževnih gozdov, so izolirali ambuinsko kislino, ki ima protiglivo delovanje (1).



**Slika 4:** Ambuinska kislina, protiglivi spojina, ki so jo izolirali iz endofitske glive *Pestalotiopsis microspora* (3).

Koletotrinska kislina je metabolit endofitske glive *Colletotrichum gloeosporioides*, ki so jo izolirali iz rastline *Artemisia mongolica* (Besser) Fisch. ex Nakai. Koletotrinska kislina ima protibakterijsko delovanje, deluje pa tudi proti nekaterim fitopatogenim glivam. Druga *Colletotrichum* sp., ki so jo izolirali iz rastline *Artemisia annua* L., izdeluje metabolite, ki tudi kažejo pestro protimikrobno aktivnost. *A. annua* je tradicionalno kitajsko zelišče, ki je znano po sintezi protimalarijske učinkovine artemisinina. *Colletotrichum* sp. iz *A. annua* izdeluje tako metabolite z aktivnostjo proti za človeka patogenim glivam in bakterijam kot tudi metabolite, ki delujejo fungistatsko na glive, ki so patogene za rastline (1).

Tudi taksol, ki ga danes uporabljamo kot protitumorno učinkovino, ima močne protiglivične lastnosti. Njegov namen naj bi bil zaščita rastline pred patogenimi glivami. Taksol so najprej odkrili v lubju kalifornijske tise (*Taxus brevifolia* Nutt.). Taksol so odkrili tudi v drugih vrstah tise in v endofitski glivi *Taxomyces andreanae*, ki je povezana s temi drevesnimi vrstami. Pozneje so odkrili, da taksol izdelujejo tudi endofitske glive, ki so povezane z drugimi drevesnimi vrstami (cipresa, bor), ki rastejo na različnih celinah (6).



**Slika 5:** Taksol – protitumorna učinkovina, ki jo izdelujeta kalifornijska tisa in endofitska gliva *Taxomyces andreanae* (6).

## 1.5 Protimikrobne učinkovine

### 1.5.1 Razdelitev

Med antibiotike uvrščamo učinkovine, izolirane iz različnih vrst mikroorganizmov (bakterij in gliv), ki zavirajo rast ostalih mikroorganizmov ali jih ubijejo. Izraz antibiotik danes uporabljajo zelo splošno, tudi za učinkovine, ki so popolnoma sintezne ali pa sintezno modificirane naravne spojine, in jih po definiciji sploh ne bi smeli imenovati

antibiotiki. Primeren izraz je protimikrobne učinkovine, te pa lahko opredelimo kot naravne (antibiotiki), polsintezne in sintezne. Poznavanje molekulskih mehanizmov razmnoževanja bakterij, gliv in virusov je močno pospešilo racionalen razvoj učinkovin, ki vplivajo na življenjski cikel mikroorganizmov.

Protimikrobne učinkovine lahko razdelimo, glede na to, na katere mikroorganizme delujejo, v naslednje skupine:

- protibakterijske učinkovine
- protivirusne učinkovine
- protiglivne učinkovine
- antiprotozoiki
- antihelmintiki.

Zadnji dve skupini nekateri ne uvrščajo med protimikrobne učinkovine. Ta delitev ni najboljša, saj nekatere spojine izkazujejo učinkovitost znotraj več skupin. Prav tako ni dobra razvrstitev na bakteriostatske in baktericidne učinkovine, saj sta omenjena učinka odvisna od koncentracije učinkovine, časa, razmer pri inkubaciji in bakterijskega seva.

Najbolj pregledno lahko razvrstimo protimikrobne učinkovine glede na mehanizem delovanja (preglednica I) (2).

**Preglednica I:** Razvrstitev protimikrobnih učinkovin glede na mehanizem delovanja (2).

| MEHANIZEM DELOVANJA                                                               | PRIMERI UČINKOVIN                                                                                                            |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| inhibicija sinteze bakterijske ali glivne celične stene                           | penicilini, cefalosporini, cikloserin, vankomicin, bacitracin, protiglivni imidazoli (mikonazol, ketokonazol in klotrimazol) |
| neposredno delovanje na membrano mikroorganizma in sprememba njene prepustnosti   | detergenti, polimiksin, polieni (nistatin, amfotericin B)                                                                    |
| vezava na 30 S ali 50 S ribosomske podenote in s tem inhibicija sinteze proteinov | kloramfenikol, tetraciklini, eritromicin, klindamicin                                                                        |
| vezava na 30 S podenoto ribosomov in s tem sprememba sinteze proteinov            | aminoglikozidi                                                                                                               |
| vpletanje v metabolizem nukleinskih kislin                                        | rifampin, kinoloni                                                                                                           |
| antimetaboliti                                                                    | trimetoprim, sulfonamidi                                                                                                     |
| analogi nukleinskih kislin                                                        | zidovudin, ganciklovir, vidarabin, aciklovir                                                                                 |

Protibakterijske učinkovine razvrščamo glede na kemijsko strukturo v naslednje skupine:

- sulfonamidi
- trimetoprim
- kinoloni
- $\beta$ -laktami: penicilini, cefalosporini, karbapenemi, inhibitorji  $\beta$ -laktamaz
- aminoglikozidi
- tetraciklini
- kloramfenikol
- makrolidi
- piranozidi
- polimiksini
- glikopeptidi
- polipeptidi
- ostale učinkovine z različnimi strukturami: derivati piridina, pirazina in aminosalicilne kisline, etambutol, cikloserin, sulfoni, fenazinska in trifenilmetanska barvila (2).

Pomembna lastnost protimikrobnih učinkovin je selektivna toksičnost. To pomeni, da so zmožne ubiti ali prizadeti tuj organizem, ki vdre v telo, ne da bi prizadele gostitelja. Mehanizmi delovanja protimikrobnih učinkovin izkoriščajo razlike med patogeni in gostujočim organizmom. Selektivna toksičnost je zelo relativen pojem. Odvisna je od vrste učinkovine, stanja pacienta (imunski sistem, jetra, ledvica, nosečnost) in odmerka zdravila (17).

### **1.5.2 Rezistenca mikrobov proti protimikrobnim učinkovinam**

Nedvomno so bili odkrivanje, razvoj in klinične študije novih protimikrobnih učinkovin, ki so močno zaznamovali medicino 20. stoletja, uspešni koraki v boju z mikrobi, vendar se v 21. stoletju človeštvo sooča z zelo veliko težavo: z rezistenco patogenih mikroorganizmov na nekoč zelo uspešne protimikrobne učinkovine. Rezistenca je neizogiben odgovor evolucije na uporabo protimikrobnih učinkovin. Že v prvih letih uporabe penicilina se je

pojavil velik delež rezistentnih sevov *Staphylococcus aureus*, temu pa so sledile še številne vrste bakterij, ki so zaradi uporabe novih antibiotikov postale še multirezistentne.

V začetku je farmacevtska industrija z velikim številom novih antibiotikov še lahko sledila pojavu rezistence, v zadnjih dveh desetletjih pa so razvili zelo malo novih protimikrobnih učinkovin. Med multirezistentne mikroorganizme, ki povzročajo resne okužbe, uvrščamo na meticilin odporne seve *Staphylococcus aureus* (MRSA), na vankomicin neobčutljive seve enterokokov (VRE), na penicilin odporne seve pnevmokokov in multirezistentne po Gramu negativne bakterije, kot so *Escherichia coli*, *Klebsiella* in *Enterobacter* sp. ter *Pseudomonas aeruginosa*. Rezistenca se ne pojavlja samo pri bakterijah, temveč tudi pri glivah, virusih in parazitih.

Nekatere bakterije so že naravno odporne proti določenim protimikrobnim učinkovinam. Po Gramu negativne bakterije imajo zunanjo celično membrano, ki ščiti celico pred vdorom neželenih spojin, fakultativne anaerobne bakterije kot je *Escherichia coli* pa ne morejo reducirati nitro skupine metronidazola, zato ta ostane v svoji neaktivni obliki. Rezultat spontanij mutacij so organizmi, ki imajo nove mehanizme rezistence na protimikrobne učinkovine. Mehanizmi rezistence vključujejo spremembo ali modifikacijo tarčnega mesta, razgradnjo antibiotika in znižanje njegove znotrajcelične koncentracije (2). Najpomembnejši način širjenja rezistence pri bakterijah je prenos genov iz enega mikroorganizma v drugega. To se lahko zgodi:

- s transdukcijo, kjer poteče vnos DNA z bakteriofagom,
- s transformacijo, kjer pride prosta DNA iz okolja v celico in
- s konjugacijo, kjer poteče izmenjava DNA med dvema bakterijama preko pilusa ali mostička.

Rezistenca na protimikrobne učinkovine se posebno hitro širi v bolnišnicah, kjer lahko različne bakterije pridejo v tesen stik, tako da lahko poteče izmenjava genskega materiala. Težava je v tem, da bakterija pridobljeni gen za rezistenco ne izgubi zlahka, ampak postane relativno stabilen del njenega genoma.

Za uspešno terapijo je nujen konstanten razvoj novih protimikrobnih učinkovin, saj so dosedanje izkušnje pokazale, da so zaradi pojava vedno novih rezistentnih sevov tudi najnovejše učinkovine uspešne v zelo omejenem časovnem obdobju. Rezistenca se slej kot prej razvije proti vsaki učinkovini, zato moramo nujno uporabiti druge pristope, še posebej pri zdravljenju infektivnih bolezni v bolnišnicah. V terapijo lahko posegamo z uvajanjem

novih analogov dosedanjih učinkovin, z uporabo kombinacij različnih učinkovin, z novimi terapevtskimi pristopi ter z uporabo novih spojin, ki imajo drugačen mehanizem delovanja, predvsem pa je nujno, da omejimo pojavnost in širitev rezistentnih sevov, da bomo lahko še pravočasno odkrili in razvili nove protimikrobne učinkovine (2).

### **1.5.3 Preizkušanje protimikrobnih učinkovin *in vitro***

Posamezni bakterijski sevi so različno občutljivi na protimikrobne učinkovine, zato so takšni podatki zelo pomembni pri terapiji in iskanju novih protimikrobnih učinkovin. Za preizkušanje občutljivosti danes največkrat uporabljamo disk difuzijski, agar dilucijski in bujon dilucijski test.

Disk difuzijski test uporabljamo za kvalitativno ali semikvantitativno oceno občutljivosti določenega bakterijskega seva na protimikrobne učinkovine. Pri tej metodi merimo premer inhibicijskega območja okoli diska, prepojenega z raztopino učinkovine, po inkubaciji na agarju, ki je premazan s suspenzijo izbranega bakterijskega seva.

Za kvantitativno vrednotenje občutljivosti uporabljamo agar dilucijski ali bujon dilucijski test. Pri tej metodi pripravimo serijo redčitev protimikrobne učinkovine v agarju ali bujonu in po inkubaciji opazujemo bakterijske kolonije na agarju ali zamotnitev tekočega gojišča zaradi rasti bakterij. Najnižja koncentracija učinkovine v agarju ali bujonu, ki prepreči rast bakterij je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK). Bujon dilucijsko metodo je možno tudi avtomatizirati, pri čemer motnost gojišča ovrednotimo denzitometrijsko.

Bujon dilucijski test je možno izvesti tudi v majhnem merilu z volumnom inkubacijske zmesi okoli 100 µL. Tako imenovan mikrodilucijski test je danes standardna referenčna metoda za preizkušanje občutljivosti aerobnih bakterij na protimikrobne učinkovine. S to metodo lahko kvantitativno opredelimo *in vitro* učinkovitost spojine na izbranem bakterijskem sevu. Metodo uporabljamo kot zanesljivo orodje za odkrivanje protimikrobnih učinkovin z novim kemizmom in kar je zelo pomembno, test lahko prilagodimo za preizkušanje izvlečkov. Mikrodilucijski test zelo veliko uporabljajo. Z njim so preizkušali tako naravne kot polsintezne in sintezne učinkovine, npr.: protibakterijske učinke eteričnih olj, rastlinskih izvlečkov, polsinteznih in sinteznih učinkovin pa tudi protiglivne učinke naravnih in sinteznih spojin (2).

## 2 NAMEN DELA

Endofitske glive so pogosto vir protimikrobnih učinkovin. Naš namen je ovrednotiti protimikrobno učinkovitost nekaterih endofitskih gliv iz rastlinskih delov, vzorčenih na zanimivih lokacijah po Sloveniji. V ta namen bomo izvedli naslednje aktivnosti:

- gojenje izoliranih endofitskih gliv na trdnih gojiščih,
- priprava izvlečkov gojišča in micelija z različnimi topili,
- reševanje protibakterijskega učinka izvlečkov endofitskih gliv z referenčnim mikrodilucijskim testom,
- iskanje glive z najmočnejšim protibakterijskim delovanjem.

Pripravili bomo tudi trajne kulture endofitskih gliv.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Reagenti

| REAGENT                        | KATAL. ŠT. | IZDELOVALEC                                                        |
|--------------------------------|------------|--------------------------------------------------------------------|
| agar-agar, Kobe I              | 5210.4     | Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija                                      |
| ampicilin, natrijeva sol       | 10044      | Fluka, Buchs, Švica                                                |
| beli vazelin                   | 1593       | Lex, Koper, Slovenija                                              |
| diklorometan                   | 32222      | Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija                                    |
| dušik, stisnjen                |            | Messer, Ruše, Slovenija                                            |
| etilacetat                     | 33211      | Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija                                    |
| izopropanol                    | 33539      | Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija                                    |
| kvasni izvleček                | 0127-17    | Becton Dickinson<br>Mycrobiology Systems,<br>Sparks, Maryland, ZDA |
| krompirjev glukozni agar (PDA) | 70139      | Fluka, Buchs, Švica                                                |
| metanol                        | 32213      | Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija                                    |
| Mueller-Hinton bujon           | 110293     | Merck, Darmstadt, Nemčija                                          |
| natrijev klorid                | 106404     | Merck, Darmstadt, Nemčija                                          |
| pepton                         | 70169      | Fluka, Buchs, Švica                                                |
| tekoči parafin                 |            | Pharmachem, Ljubljana, Slovenija                                   |
| Tween® 80                      | 93780      | Fluka, Buchs, Švica                                                |

### 3.2 Material

| MATERIAL                                          | KAT. ŠT.  | IZDELOVALEC                           |
|---------------------------------------------------|-----------|---------------------------------------|
| centrifugirke (volumen 50 mL, samostoječa oblika) | 91051     | TPP, Trasadingen, Švica               |
| centrifugirke (volumen 50 mL, konusna oblika)     | 91050     | TPP, Trasadingen, Švica               |
| centrifugirke (volumen 15 mL, konusna oblika)     | 91015     | TPP, Trasadingen, Švica               |
| mikrotitrne ploščice z okroglim dnom              | 92097     | TPP, Trasadingen, Švica               |
| petrijeve (Ø 90 × 20 mm)                          | 93100     | TPP, Trasadingen, Švica               |
| sterilne plastične eze za enkratno uporabo        | 8175CS10H | Copan Italia S.p.A., Brescia, Italija |

### 3.3 Gojišča

#### Luria-Bertani trdno gojišče (LBA)

|                 |          |
|-----------------|----------|
| pepton          | 1,0 g    |
| kvasni izvleček | 0,5 g    |
| natrijev klorid | 0,5 g    |
| agar            | 1,5 g    |
| voda            | ad 100 g |

#### Mueller-Hinton bujon

|               |          |                               |                      |      |
|---------------|----------|-------------------------------|----------------------|------|
| suha mešanica | 2,1 g    | Sestava [g.L <sup>-1</sup> ]: | mesni izvleček       | 2,0  |
| voda          | ad 100 g |                               | kazeinski hidrolizat | 17,5 |
|               |          |                               | škrob                | 1,5  |

### Trdno gojišče s krompirjevim izvlečkom in glukozo – PDA

|               |          |                               |                     |      |
|---------------|----------|-------------------------------|---------------------|------|
| suha mešanica | 3,9 g    | Sestava [g.L <sup>-1</sup> ]: | krompirjev izvleček | 4,0  |
| voda          | ad 100 g |                               | glukoza             | 20,0 |
|               |          |                               | agar                | 15,0 |

## 3.4 Biološki material

### Bakterije

*Escherichia coli*, sev ER2738, je iz trajnih kultur Katedre za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

### Glive

Vzorci endofitskih gliv smo dobili iz čistih kultur Katedre za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

Podatke o vzorčenju rastlinskih delov gostiteljskih rastlin posameznih endofitskih gliv podaja **preglednica II**.

**Preglednica II:** Podatki o vzorčenju rastlinskih delov gostiteljskih rastlin posameznih endofitskih gliv.

| Številka vzorca | Ime gostiteljske rastline                         | Rastlinski del | Lokacija                                               | Datum nabiranja |
|-----------------|---------------------------------------------------|----------------|--------------------------------------------------------|-----------------|
| 2               | <i>Sambucus nigra</i> L.<br>črni bezeg            | list           | Semič<br>N 45° 39,224'<br>E 15° 11,209'<br>n.v. 216 m  | 26.4.2007       |
| 2C              |                                                   |                |                                                        |                 |
| 14              | <i>Larix decidua</i> P. Mill.<br>evropski macesen | iglice         | Semič<br>N 45° 39,215'<br>E 15° 11,190'<br>n.v. 216 m  | 26.4.2007       |
| 17A             | <i>Pinus nigra</i> Arnold<br>črni bor             | iglice         | Krempa<br>N 45° 31,927'<br>E 14° 46,759'<br>n.v. 924 m | 9.5.2007        |

**Preglednica II: ...nadaljevanje s prejšnje strani.**

| <b>Številka vzorca</b> | <b>Ime gostiteljske rastline</b>                     | <b>Rastlinski del</b> | <b>Lokacija</b>                                        | <b>Datum nabiranja</b> |
|------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------|------------------------|
| <b>21</b>              | <i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull.<br>jesenska vresa | list                  | Krempa<br>N 45° 31,979'<br>E 14° 46,731'<br>n.v. 879 m | 9.5.2007               |
| <b>24A</b>             | <i>Centaurea</i> sp.<br>vrsta glavinca               | steblo                | Krempa<br>N 45° 31,985'<br>E 14° 46,669'<br>n.v. 871 m | 9.5.2007               |
| <b>24B</b>             |                                                      |                       |                                                        |                        |
| <b>27</b>              | <i>Pinus nigra</i><br>Arnold<br>črni bor             | iglice                | Krempa<br>N 45° 32,033'<br>E 14° 46,654'<br>n.v. 889 m | 9.5.2007               |
| <b>27A</b>             |                                                      |                       |                                                        |                        |
| <b>27B</b>             |                                                      |                       |                                                        |                        |
| <b>28</b>              | <i>Pinus nigra</i><br>Arnold<br>črni bor             | iglice                | Krempa<br>N 45° 32,025'<br>E 14° 46,638'<br>n.v. 893 m | 9.5.2007               |
| <b>33</b>              | <i>Pinus nigra</i><br>Arnold<br>črni bor             | iglice                | Krempa<br>N 45° 32,083'<br>E 14° 46,491'<br>n.v. 971 m | 9.5.2007               |
| <b>33B</b>             |                                                      |                       |                                                        |                        |
| <b>34</b>              | <i>Pinus nigra</i><br>Arnold<br>črni bor             | iglice                | Krempa<br>N 45° 32,054'<br>E 14° 46,501'<br>n.v. 968 m | 9.5.2007               |
| <b>34B</b>             |                                                      |                       |                                                        |                        |
| <b>35</b>              | <i>Pinus nigra</i><br>Arnold<br>črni bor             | iglice                | Krempa<br>N 45° 32,049'<br>E 14° 46,510'<br>n.v. 965 m | 9.5.2007               |
| <b>35C</b>             |                                                      |                       |                                                        |                        |
| <b>36X</b>             | <i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull.<br>jesenska vresa | list                  | Krempa<br>N 45° 32,049'<br>E 14° 46,510'<br>n.v. 965 m | 9.5.2007               |
| <b>36Y</b>             |                                                      |                       |                                                        |                        |

**Preglednica II: ...nadaljevanje s prejšnje strani.**

| Številka vzorca | Ime gostiteljske rastline                  | Rastlinski del | Lokacija                                                             | Datum nabiranja |
|-----------------|--------------------------------------------|----------------|----------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 42              | <i>Pinus sylvestris</i><br>L.<br>rdeči bor | vršiček        | Rašica nad Ljubljano<br>N 46° 06,205'<br>E 14° 31,227'<br>n.v. 373 m | 6.6.2007        |
| 42B             |                                            |                |                                                                      |                 |
| 42C             |                                            |                |                                                                      |                 |
| 42D             |                                            |                |                                                                      |                 |
| 45              | <i>Pinus sylvestris</i><br>L.<br>rdeči bor | iglice         | Rašica nad Ljubljano<br>N 46° 06,484'<br>E 14° 31,081'<br>n.v. 373 m | 6.6.2007        |
| 45B             |                                            |                |                                                                      |                 |
| 46              | <i>Pinus sylvestris</i><br>L.<br>rdeči bor | vršiček        | Rašica nad Ljubljano<br>N 46° 06,484'<br>E 14° 31,081'<br>n.v. 373 m | 6.6.2007        |
| 49              | <i>Pinus sylvestris</i><br>L.<br>rdeči bor | vršiček        | Rašica nad Ljubljano<br>N 46° 06,499'<br>E 14° 31,046'<br>n.v. 379 m | 6.6.2007        |

### 3.5 Aparature

| APARATURA                                       | IZDELOVALEC                               |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| analizna tehtnica KERN ALS 120-4                | Kern & Sohn GmbH, Balingen, Nemčija       |
| avtoklav 2540EL                                 | Systec, Wettenberg, Nemčija               |
| hladilnik, +4°C                                 | Gorenje, Velenje, Slovenija               |
| LAF komora Iskra PIO LFVP 12                    | Iskra PIO d.o.o., Šentjernej, Slovenija   |
| tehtnica Mettler PC 2000                        | Mettler-Toledo, Inc., Columbus, Ohio, ZDA |
| termostatirana komora Termostat WTB             | Binder GmbH, Tuttlingen, Nemčija          |
| ultrazvočna kadička SONIS 2 GT                  | Iskra PIO d.o.o., Šentjernej, Slovenija   |
| UV/VIS spektrofotometer Lambda 20               | Perkin-Elmer, Wellesley, ZDA              |
| vakuumski rotacijski uparjalnik Rotavapor R-200 | Büchi, Flawil, Švica                      |
| zamrzovalnik, -30°C                             | Gorenje, Velenje, Slovenija               |

### 3.6 Mikrodilucijski test

Mikrodilucijski test smo naredili v skladu s smernicami nacionalnega komiteja za klinične laboratorijske standarde (NCCLS) (2).

## **4 EKSPERIMENTALNI DEL**

### **4.1 Začetno gojenje gliv**

#### **4.1.1 Gojenje na trdnem gojišču s krompirjevim izvlečkom in glukozo**

Trdno gojišče s krompirjevim izvlečkom in glukozo (PDA): 15,6 g suhe zmesi gojišča z agarjem, krompirjevim izvlečkom in glukozo smo suspendirali v 400 mL vode in sterilizirali 20 minut pri 121°C in nadtlaku vodne pare 1 bar. Raztopino smo po sterilizaciji ohladili na 80°C in jo v sterilni komori z laminarnim pretokom zraka razporedili po približno 20 mL v 17 sterilnih petrijevkih s premerom 90 mm. Ko se je po približno 30 minutah gojišče v zaprtih petrijevkah strdilo, smo petrijevke ovili s parafilmom. Postopek smo ponovili še 4-krat, da smo dobili 85 trdnih gojišč s krompirjevim izvlečkom in glukozo. PDA plošče smo za 1 teden postavili v karanteno v komoro za gojenje gliv na pladenj, premazan z vazelinom, za zaščito pred pršicami in s posodo s 500 mL vode za vzdrževanje vlažnosti.

Po 1 tednu smo pripravljene PDA plošče pregledali, da bi ugotovili, ali so gojišča sterilna ali pa so na gojiščih zrasle morebitne kolonije.

V sterilni komori z laminarnim pretokom zraka smo na sterilne PDA plošče nacepili micelije naslednjih gliv: 2, 2C, 14, 17A, 21, 24A, 24B, 27, 27A, 27B, 28, 33, 33B, 34, 34B, 35, 35C, 36X, 36Y, 42, 42B, 42C, 42D, 45, 45B, 46, 49. Vsako glivo smo nacepili na 3 PDA plošče. Petrijevke smo ovili s parafilmom in jih postavili v komoro za gojenje gliv pri sobni temperaturi (22-25°C).

#### **4.1.2 Priprava trajnih kultur**

Poševno gojišče s PDA: 11,7 g suhe zmesi gojišča z agarjem, krompirjevim izvlečkom in glukozo smo suspendirali v 300 mL vode in sterilizirali 20 minut pri 121°C in nadtlaku 1 bar. Raztopino smo po sterilizaciji ohladili na 80°C in jo v sterilni komori z laminarnim pretokom zraka razporedili po približno 20 mL v 15 sterilnih epruvet z zamaškom z volumnom 50 mL. Epruvete smo zaprli z zamaški in jih nagnili za 30°, dokler se ni gojišče

po približno 30 minutah strdilo. Postopek smo ponovili še enkrat, da smo dobili 30 poševnih gojišč s PDA. Epruvete smo za 1 teden postavili v karanteno v komoro za gojenje gliv na pladenj, premazan z vazelinom in posodo s 500 mL vode za vzdrževanje vlažnosti. Po 1 tednu smo epruvete z gojišči pregledali, da bi ugotovili, ali so gojišča sterilna ali pa so na gojiščih zrasle morebitne kolonije.

V sterilni komori z laminarnim pretokom zraka smo na poševna gojišča nacepili micelije gliv. Epruvete smo rahlo zaprli z zamaški in jih postavili v komoro za gojenje gliv na pladenj, premazan z vazelinom in s posodo s 500 mL vode za vzdrževanje vlažnosti.

Ko so glive prerasle površino gojišča, smo jih prelili 10 mm visoko s tekočim parafinom, ki smo ga prej dvakrat zaporedoma sterilizirali 20 minut pri 121°C in nadtlaku vodne pare 1 bar. Epruvete smo rahlo zaprli z zamaški in jih shranili pri 4-6°C.

## **4.2 Priprava izvlečkov trdnih gojišč z micelijem z različnimi topili**

Glive smo gojili 4 tedne na trdnem gojišču s krompirjevim izvlečkom in glukozo (PDA). Vsako izmed gliv smo gojili na 3 gojiščih, da bi lahko pripravili izvlečke trdnih gojišč z micelijem s 3 različnimi topili, ki se razlikujejo po polarnosti, in sicer z najbolj polarnim metanolom, z nekoliko manj polarnim etilacetatom in najmanj polarnim diklorometanom. Micelij z gojiščem iz vsake petrijevke smo homogenizirali do velikosti delcev približno 5 mm, prelili s 70 mL metanola, etilacetata ali diklorometana in macerirali 15 minut v ultrazvočni kadički, 24 ur brez ultrazvoka in nato še 15 minut v ultrazvočni kadički. Potem smo zmes filtrirali skozi naguban filtrirni papir, preostanek na filtru sprali trikrat z 10 mL ustreznega topila (metanola, etilacetata ali diklorometana) in topilo odstranili pri 50°C in znižanem tlaku. Suhe preostanke smo stehali in jih do preizkušanja shranili v atmosferi dušika pri -25°C. Pred preizkušanjem smo suhe preostanke raztopili v 50 % metanolu tako, da je bila koncentracija izvlečkov 1 mg.mL<sup>-1</sup>.

## **4.3 Priprava Luria-Bertani trdnih gojišč**

Luria-Bertani trdno gojišče: 4,0 g peptona, 2,0 g kvasnega izvlečka, 2,0 g natrijevega klorida in 6,0 g agarja smo suspendirali v 400 mL vode in sterilizirali s segrevanjem 20 minut pri 121°C in nadtlaku vodne pare 1 bar. Raztopino smo po sterilizaciji ohladili na

80°C in jo v sterilni komori z laminarnim pretokom zraka razporedili po približno 20 mL v 18 sterilnih petrijevkih s premerom 90 mm. Ko se je gojišče v odprtih petrijevkah ohladilo in strdilo, smo petrijevke zaprli, jih ovili s parafilmom in jih do uporabe shranili pri +4°C.

#### **4.4 Mikrodilucijski test – preizkušanje protibakterijskega učinka izvlečkov trdnega gojišča z micelijem, pripravljenih z različnimi topili**

Na sterilno Luria-Bertani trdno gojišče smo pri sterilnih razmerah dela nacepili bakterije *Escherichia coli* ER2738 iz 1 kolonije. Petrijevko smo ovili s parafilmom in jo inkubirali 24 ur pri 37°C.

Bakterije iz 1 sveže zrasle kolonije smo s sterilno zanko prenesli in suspendirali v 10 mL sterilne 0,9 % raztopine natrijevega klorida, ki smo jo pripravili s sterilizacijo raztopine 720 mg natrijevega klorida v 80 mL vode 20 minut pri 121°C in nadtlaku vodne pare 1 bar. Raztopino smo redčili tako, da je bila absorbanca suspenzije pri valovni dolžini  $\lambda = 625$  nm med 0,08 in 0,1. To ustreza 0,5 enote motnosti po McFarlandu. Tako pripravljena suspenzija vsebuje  $10^8$  bakterij (CFU).mL<sup>-1</sup>. 800 µL suspenzije smo redčili s 25 mL sterilne raztopine Tween<sup>®</sup> 80, ki smo jo pripravili s sterilno filtracijo raztopine 5 µL Tween<sup>®</sup> 80 v 25 mL vode.

Mueller-Hinton bujon smo pripravili s sterilizacijo suspenzije 840 mg suhe mešanice v 40 mL vode s segrevanjem 20 minut pri 121°C in nadtlaku vodne pare 1 bar.

Raztopino kontrolnega antibiotika s koncentracijo 1 mg.mL<sup>-1</sup> smo pripravili z redčenjem osnovne raztopine s 50 % metanolom. Osnovno raztopino smo pripravili z raztapljanjem 100 mg natrijeve soli ampicilina v 1,00 mL 50 % metanola in jo shranili pri -25°C.

Mikrodilucijski test smo naredili v mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinami z okroglim dnom in volumnom 200 µL. Raztopine in suspenzijo smo vnesli z mikropipetami.

Vsaka ploščica je vsebovala kontrolno raztopino natrijeve soli ampicilina s koncentracijo 1 mg.mL<sup>-1</sup> in njene redčitve s 50 % metanolom v razmerju 1:1, izvlečke s koncentracijo 1 mg.mL<sup>-1</sup>, pozitivno kontrolo in negativno kontrolo.

### **Prva ploščica:**

- **kontrolni antibiotik A1-A12:** 1: 10  $\mu\text{L}$  raztopine natrijeve soli ampicilina s koncentracijo 1  $\text{mg.mL}^{-1}$ , 2-12: redčitve s 50 % metanolom v razmerju 1:1 + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona + 10  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. coli*
- **metanolni izvlečki B1-B12:** 10  $\mu\text{L}$  izvlečka 2, 2C, 14, 17A, 21, 24A, 24B, 27, 27A, 27B, 28, 33 s koncentracijo 1  $\text{mg.mL}^{-1}$  + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona + 10  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. coli*
- **etilacetatni izvlečki C1-C12:** 10  $\mu\text{L}$  izvlečka 2, 2C, 14, 17A, 21, 24A, 24B, 27, 27A, 27B, 28, 33 s koncentracijo 1  $\text{mg.mL}^{-1}$  + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona + 10  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. coli*
- **diklorometanski izvlečki D1-D12:** 10  $\mu\text{L}$  izvlečka 2, 2C, 14, 17A, 21, 24A, 24B, 27, 27A, 27B, 28, 33 s koncentracijo 1  $\text{mg.mL}^{-1}$  + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona + 10  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. coli*
- **pozitivna kontrola E1-E12:** 10  $\mu\text{L}$  50 % metanola + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona + 10  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. coli*
- **negativna kontrola F1-F12:** 10  $\mu\text{L}$  50 % metanola + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona.

### **Druga ploščica:**

- **kontrolni antibiotik A1-A12:** 1: 10  $\mu\text{L}$  raztopine natrijeve soli ampicilina s koncentracijo 1  $\text{mg.mL}^{-1}$ , 2-12: redčitve s 50 % metanolom v razmerju 1:1 + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona + 10  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. coli*
- **metanolni izvlečki B1-B7:** 10  $\mu\text{L}$  izvlečka 33B, 34, 34B, 35, 35C, 36X, 36Y s koncentracijo 1  $\text{mg.mL}^{-1}$  + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona + 10  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. coli*
- **etilacetatni izvlečki C1-C7:** 10  $\mu\text{L}$  izvlečka 33B, 34, 34B, 35, 35C, 36X, 36Y s koncentracijo 1  $\text{mg.mL}^{-1}$  + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona + 10  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. coli*
- **diklorometanski izvlečki D1-D7:** 10  $\mu\text{L}$  izvlečka 33B, 34, 34B, 35, 35C, 36X, 36Y s koncentracijo 1  $\text{mg.mL}^{-1}$  + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona + 10  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. coli*
- **pozitivna kontrola E1-E12:** 10  $\mu\text{L}$  50 % metanola + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona + 10  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. coli*
- **negativna kontrola F1-F12:** 10  $\mu\text{L}$  50 % metanola + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona.

### **Tretja ploščica:**

- **kontrolni antibiotik A1-A12:** 1: 10  $\mu\text{L}$  raztopine natrijeve soli ampicilina s koncentracijo  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , 2-12: redčitve s 50 % metanolom v razmerju 1:1 + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona + 10  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. coli*
- **metanolni izvlečki B1-B8:** 10  $\mu\text{L}$  izvlečka 42, 42B, 42C, 42D, 45, 45B, 46, 49 s koncentracijo  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona + 10  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. coli*
- **etilacetatni izvlečki C1-C8:** 10  $\mu\text{L}$  izvlečka 42, 42B, 42C, 42D, 45, 45B, 46, 49 s koncentracijo  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona + 10  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. coli*
- **diklorometanski izvlečki D1-D8:** 10  $\mu\text{L}$  izvlečka 42, 42B, 42C, 42D, 45, 45B, 46, 49 s koncentracijo  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona + 10  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. coli*
- **pozitivna kontrola E1-E12:** 10  $\mu\text{L}$  50 % metanola + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona + 10  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. coli*
- **negativna kontrola F1-F12:** 10  $\mu\text{L}$  50 % metanola + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona.

Mikrotitrne ploščice smo zaprli s samolepilno folijo, jih inkubirali 24 ur pri  $37^{\circ}\text{C}$  in nato pregledali.

## **4.5 Mikrodilucijski test – preizkušanje protibakterijskega učinka izvlečkov trdnega gojišča z micelijem in njihovih redčitev**

Mikrodilucijski test smo naredili po opisanem postopku v mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinami z okroglim dnom in volumnom 200  $\mu\text{L}$ .

Ploščica je vsebovala kontrolno raztopino natrijeve soli ampicilina s koncentracijo  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  in njene redčitve s 50 % metanolom v razmerju 1:1, izvlečke s koncentracijo  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  in njihove redčitve s 50 % metanolom v razmerju 1:1, pozitivno kontrolo in negativno kontrolo:

- **kontrolni antibiotik A1-A12:** 1: 10  $\mu\text{L}$  raztopine natrijeve soli ampicilina s koncentracijo  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , 2-12: redčitve s 50 % metanolom v razmerju 1:1 + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona + 10  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. coli*
- **B1-B12:** 1: 10  $\mu\text{L}$  diklorometanskega izvlečka 2 s koncentracijo  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , 2-12: redčitve s 50 % metanolom v razmerju 1:1 + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona + 10  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. coli*
- **C1-C12:** 1: 10  $\mu\text{L}$  diklorometanskega izvlečka 24B s koncentracijo  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , 2-12: redčitve s 50 % metanolom v razmerju 1:1 + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona + 10  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. coli*
- **D1-D12:** 1: 10  $\mu\text{L}$  diklorometanskega izvlečka 33 s koncentracijo  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , 2-12: redčitve s 50 % metanolom v razmerju 1:1 + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona + 10  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. coli*
- **E1-E12:** 1: 10  $\mu\text{L}$  diklorometanskega izvlečka 35 s koncentracijo  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , 2-12: redčitve s 50 % metanolom v razmerju 1:1 + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona + 10  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. coli*
- **F1-F12:** 1: 10  $\mu\text{L}$  diklorometanskega izvlečka 35C s koncentracijo  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , 2-12: redčitve s 50 % metanolom v razmerju 1:1 + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona + 10  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. coli*
- **pozitivna kontrola G1-G12:** 10  $\mu\text{L}$  50 % metanola + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona + 10  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. coli*
- **negativna kontrola H1-H12:** 10  $\mu\text{L}$  50 % metanola + 90  $\mu\text{L}$  Mueller-Hinton bujona.

Mikrotitrsko ploščico smo zaprli s samolepilno folijo, jo inkubirali 24 ur pri  $37^{\circ}\text{C}$  in nato pregledali.

## 5 REZULTATI

### 5.1 Začetno gojenje gliv

#### 5.1.1 Gojenje na trdnem gojišču s krompirjevim izvlečkom in glukozo

Glive so začele rasti po 1 tednu po inokulaciji. Površino gojišča v petrijevki so prerasle v 4 tednih.



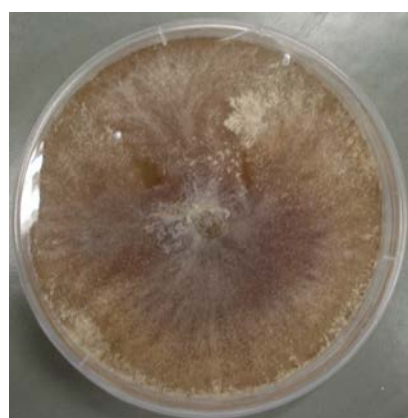
2



2C



14



17A

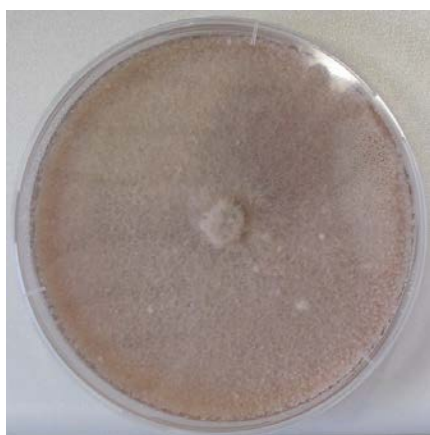
**Slika 6:** Glive na PDA gojišču.



21



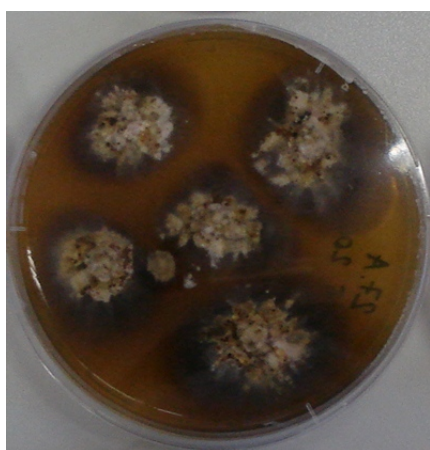
24A



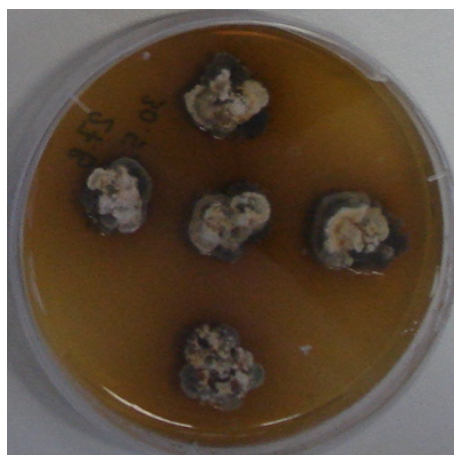
24B



27



27A

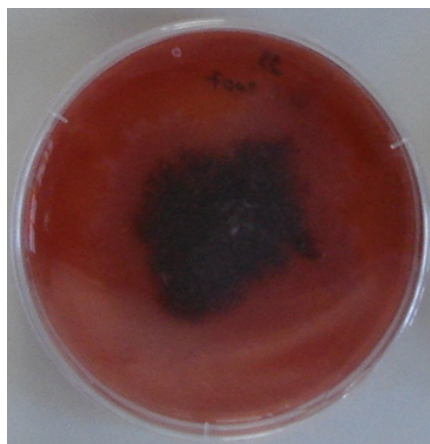


27B

**Slika 7:** Glive na PDA gojišču.



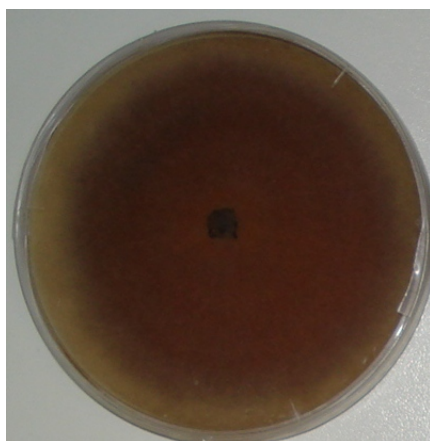
28



33



33B



34



34B



35

**Slika 8:** Glive na PDA gojišču.



**35C**



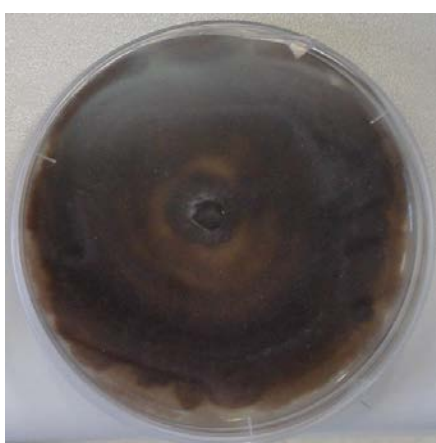
**36X**



**36Y**



**42**

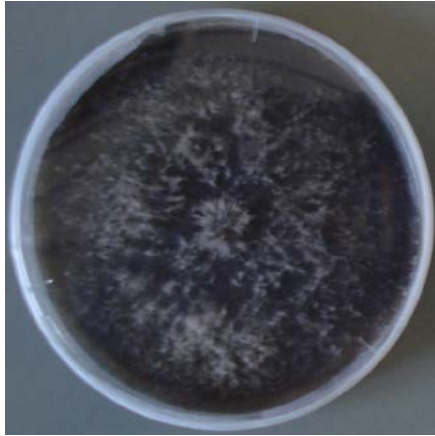


**42B**

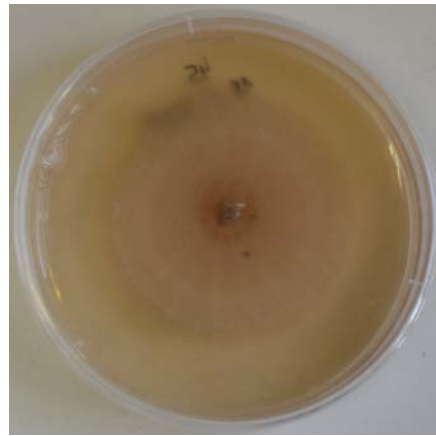


**42C**

**Slika 9:** Glive na PDA gojišču.



**42D**



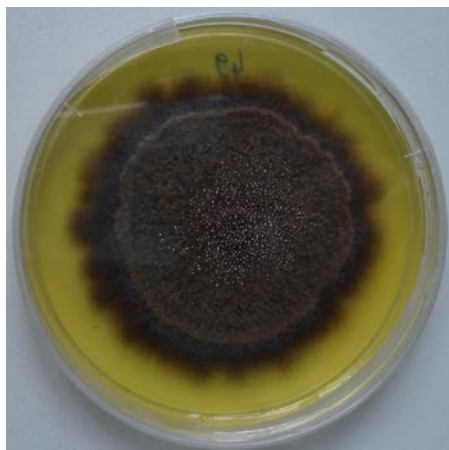
**45**



**45B**



**46**



**49**

**Slika 10:** Glive na PDA gojišču.

### 5.1.2 Priprava trajnih kultur

Glive so prerasle površino poševnega gojišča v 3 tednih po inokulaciji.

## 5.2 Priprava izvlečkov trdnih gojišč z micelijem z različnimi topili

Mase suhih izvlečkov, ki smo jih dobili pri ekstrakciji trdnih gojišč z micelijem z različnimi topili, podaja **preglednica III**.

**Preglednica III:** Mase suhih izvlečkov, ki smo jih dobili pri ekstrakciji trdnih gojišč z micelijem z različnimi topili.

| Gliva | Topilo       | Masa suhega izvlečka [mg] |
|-------|--------------|---------------------------|
| 2     | metanol      | 139,9                     |
|       | etilacetat   | 5,8                       |
|       | diklorometan | 0,7                       |
| 2C    | metanol      | 249,7                     |
|       | etilacetat   | 15,0                      |
|       | diklorometan | 6,7                       |
| 14    | metanol      | 90,8                      |
|       | etilacetat   | 44,1                      |
|       | diklorometan | 13,7                      |
| 17A   | metanol      | 125,6                     |
|       | etilacetat   | 18,3                      |
|       | diklorometan | 3,0                       |
| 21    | metanol      | 165,0                     |
|       | etilacetat   | 13,6                      |
|       | diklorometan | 1,3                       |

**Preglednica III: ...nadaljevanje s prejšnje strani.**

| <b>Gliva</b> | <b>Topilo</b> | <b>Masa suhega izvlečka<br/>[mg]</b> |
|--------------|---------------|--------------------------------------|
| <b>24A</b>   | metanol       | 288,2                                |
|              | etilacetat    | 1,8                                  |
|              | diklorometan  | 0,5                                  |
| <b>24B</b>   | metanol       | 119,0                                |
|              | etilacetat    | 15,6                                 |
|              | diklorometan  | 1,1                                  |
| <b>27</b>    | metanol       | 208,3                                |
|              | etilacetat    | 12,5                                 |
|              | diklorometan  | 6,0                                  |
| <b>27A</b>   | metanol       | 126,7                                |
|              | etilacetat    | 11,5                                 |
|              | diklorometan  | 3,6                                  |
| <b>27B</b>   | metanol       | 155,2                                |
|              | etilacetat    | 14,7                                 |
|              | diklorometan  | 4,2                                  |
| <b>28</b>    | metanol       | 104,2                                |
|              | etilacetat    | 23,0                                 |
|              | diklorometan  | 5,2                                  |
| <b>33</b>    | metanol       | 169,5                                |
|              | etilacetat    | 55,1                                 |
|              | diklorometan  | 4,1                                  |
| <b>33B</b>   | metanol       | 194,8                                |
|              | etilacetat    | 17,1                                 |
|              | diklorometan  | 1,0                                  |
| <b>34</b>    | metanol       | 104,0                                |
|              | etilacetat    | 3,5                                  |
|              | diklorometan  | 0,2                                  |

**Preglednica III: ...nadaljevanje s prejšnje strani.**

| <b>Gliva</b> | <b>Topilo</b> | <b>Masa suhega izvlečka<br/>[mg]</b> |
|--------------|---------------|--------------------------------------|
| <b>34B</b>   | metanol       | 165,8                                |
|              | etilacetat    | 19,0                                 |
|              | diklorometan  | 3,9                                  |
| <b>35</b>    | metanol       | 124,2                                |
|              | etilacetat    | 6,4                                  |
|              | diklorometan  | 2,0                                  |
| <b>35C</b>   | metanol       | 284,0                                |
|              | etilacetat    | 3,3                                  |
|              | diklorometan  | 1,1                                  |
| <b>36X</b>   | metanol       | 319,3                                |
|              | etilacetat    | 31,5                                 |
|              | diklorometan  | 25,6                                 |
| <b>36Y</b>   | metanol       | 235,3                                |
|              | etilacetat    | 13,6                                 |
|              | diklorometan  | 6,4                                  |
| <b>42</b>    | metanol       | 130,5                                |
|              | etilacetat    | 15,0                                 |
|              | diklorometan  | 7,8                                  |
| <b>42B</b>   | metanol       | 218,4                                |
|              | etilacetat    | 4,6                                  |
|              | diklorometan  | 0,5                                  |
| <b>42C</b>   | metanol       | 92,7                                 |
|              | etilacetat    | 12,4                                 |
|              | diklorometan  | 0,5                                  |
| <b>42D</b>   | metanol       | 106,3                                |
|              | etilacetat    | 1,0                                  |
|              | diklorometan  | 0,2                                  |

**Preglednica III: ...nadaljevanje s prejšnje strani.**

| <b>Gliva</b> | <b>Topilo</b> | <b>Masa suhega izvlečka<br/>[mg]</b> |
|--------------|---------------|--------------------------------------|
| <b>45</b>    | metanol       | 132,5                                |
|              | etilacetat    | 1,0                                  |
|              | diklorometan  | 0,2                                  |
| <b>45B</b>   | metanol       | 133,4                                |
|              | etilacetat    | 0,3                                  |
|              | diklorometan  | 0,2                                  |
| <b>46</b>    | metanol       | 145,1                                |
|              | etilacetat    | 44,4                                 |
|              | diklorometan  | 16,9                                 |
| <b>49</b>    | metanol       | 147,8                                |
|              | etilacetat    | 5,6                                  |
|              | diklorometan  | 4,4                                  |

### 5.3 Mikrodilucijski test – preizkušanje protibakterijskega učinka izvlečkov trdnega gojišča z micelijem, pripravljenih z različnimi topili

**Preglednica IV:** Rezultati mikrodilucijskega testa z izvlečki trdnega gojišča z micelijem, pripravljenimi z metanolom, etilacetatom in diklorometanom – **prva ploščica**. (Legenda: (+) motno gojišče, (-) bistro gojišče po inkubaciji.)

|                          |          | 1      | 2       | 3       | 4        | 5       | 6        | 7        | 8       | 9        | 10       | 11      | 12      |
|--------------------------|----------|--------|---------|---------|----------|---------|----------|----------|---------|----------|----------|---------|---------|
| ampicilin Na             | <b>A</b> | -      | -       | -       | -        | -       | +        | +        | +       | +        | +        | +       | +       |
| metanolni izvlečki       | <b>B</b> | 2<br>+ | 2C<br>+ | 14<br>+ | 17A<br>+ | 21<br>+ | 24A<br>+ | 24B<br>+ | 27<br>+ | 27A<br>+ | 27B<br>+ | 28<br>+ | 33<br>+ |
| etilacetatni izvlečki    | <b>C</b> | 2<br>+ | 2C<br>+ | 14<br>+ | 17A<br>+ | 21<br>+ | 24A<br>+ | 24B<br>+ | 27<br>+ | 27A<br>+ | 27B<br>+ | 28<br>+ | 33<br>+ |
| diklorometanski izvlečki | <b>D</b> | 2<br>- | 2C<br>+ | 14<br>+ | 17A<br>+ | 21<br>+ | 24A<br>+ | 24B<br>- | 27<br>+ | 27A<br>+ | 27B<br>+ | 28<br>+ | 33<br>- |
| pozitivna kontrola       | <b>E</b> | +      | +       | +       | +        | +       | +        | +        | +       | +        | +        | +       | +       |
| negativna kontrola       | <b>F</b> | -      | -       | -       | -        | -       | -        | -        | -       | -        | -        | -       | -       |

**Preglednica V:** Rezultati mikrodilucijskega testa z izvlečki trdnega gojišča z micelijem, pripravljenimi z metanolom, etilacetatom in diklorometanom – **druga ploščica**. (Legenda: (+) motno gojišče, (-) bistro gojišče po inkubaciji.)

|                          |          | 1        | 2       | 3        | 4       | 5        | 6        | 7        | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------------|----------|----------|---------|----------|---------|----------|----------|----------|---|---|----|----|----|
| ampicilin Na             | <b>A</b> | -        | -       | -        | -       | -        | +        | +        | + | + | +  | +  | +  |
| metanolni izvlečki       | <b>B</b> | 33B<br>+ | 34<br>+ | 34B<br>+ | 35<br>+ | 35C<br>+ | 36X<br>+ | 36Y<br>+ |   |   |    |    |    |
| etilacetatni izvlečki    | <b>C</b> | 33B<br>+ | 34<br>+ | 34B<br>+ | 35<br>+ | 35C<br>+ | 36X<br>+ | 36Y<br>+ |   |   |    |    |    |
| diklorometanski izvlečki | <b>D</b> | 33B<br>+ | 34<br>+ | 34B<br>+ | 35<br>- | 35C<br>- | 36X<br>+ | 36Y<br>+ |   |   |    |    |    |
| pozitivna kontrola       | <b>E</b> | +        | +       | +        | +       | +        | +        | +        | + | + | +  | +  | +  |
| negativna kontrola       | <b>F</b> | -        | -       | -        | -       | -        | -        | -        | - | - | -  | -  | -  |

**Preglednica VI:** Rezultati mikrodilucijskega testa z izvlečki trdnega gojišča z micelijem, pripravljenimi z metanolom, etilacetatom in diklorometanom – tretja ploščica. (Legenda: (+) motno gojišče, (-) bistro gojišče po inkubaciji.)

|                          |          | 1       | 2        | 3        | 4        | 5       | 6        | 7       | 8       | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------------|----------|---------|----------|----------|----------|---------|----------|---------|---------|---|----|----|----|
| ampicilin Na             | <b>A</b> | -       | -        | -        | -        | -       | +        | +       | +       | + | +  | +  | +  |
| metanolni izvlečki       | <b>B</b> | 42<br>+ | 42B<br>+ | 42C<br>+ | 42D<br>+ | 45<br>+ | 45B<br>+ | 46<br>+ | 49<br>+ |   |    |    |    |
| etilacetatni izvlečki    | <b>C</b> | 42<br>+ | 42B<br>+ | 42C<br>+ | 42D<br>+ | 45<br>+ | 45B<br>+ | 46<br>+ | 49<br>+ |   |    |    |    |
| diklorometanski izvlečki | <b>D</b> | 42<br>+ | 42B<br>+ | 42C<br>+ | 42D<br>+ | 45<br>+ | 45B<br>+ | 46<br>+ | 49<br>+ |   |    |    |    |
| pozitivna kontrola       | <b>E</b> | +       | +        | +        | +        | +       | +        | +       | +       | + | +  | +  | +  |
| negativna kontrola       | <b>F</b> | -       | -        | -        | -        | -       | -        | -       | -       | - | -  | -  | -  |

#### 5.4 Mikrodilucijski test – preizkušanje protibakterijskega učinka izvlečkov trdnega gojišča z micelijem in njihovih redčitev

**Preglednica VII:** Rezultati mikrodilucijskega testa z izvlečki trdnega gojišča z micelijem s koncentracijo 1 mg.mL<sup>-1</sup> in njihovimi redčitvami s 50 % metanolom v razmerju 1:1. (Legenda: (+) motno gojišče, (-) bistro gojišče po inkubaciji.)

|                              |          | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------------------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| ampicilin Na                 | <b>A</b> | - | - | - | - | - | + | + | + | + | +  | +  | +  |
| diklorometanski izvleček 2   | <b>B</b> | - | - | - | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  |
| diklorometanski izvleček 24B | <b>C</b> | - | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  |
| diklorometanski izvleček 33  | <b>D</b> | - | - | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  |
| diklorometanski izvleček 35  | <b>E</b> | - | - | - | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  |
| diklorometanski izvleček 35C | <b>F</b> | - | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  |
| pozitivna kontrola           | <b>G</b> | + | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  |
| negativna kontrola           | <b>H</b> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | -  |

## 6 RAZPRAVA

Priprava izvlečkov trdnega gojišča z micelijem z organskimi topili, zlasti z metanolom, je bila težavna zaradi prisotnosti vode iz trdnega gojišča, kar je imelo za posledico dolgotrajno filtracijo in odparevanje topila. To težavo bi lahko odpravili z liofilizacijo gojišč pred ekstrakcijo, saj bi na ta način odstranili vodo iz gojišča.

Za preizkušanje protibakterijskega učinka smo izbrali mikrodilucijski test, ker je standardna in referenčna metoda, primeren pa je tudi za preizkušanje izvlečkov. Pri testu smo izhajali iz izvlečkov s koncentracijo  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Tako nizko koncentracijo smo uporabili, da ne bi prišlo do obarjanja sestavin izvlečka in s tem do zamotnitve raztopine v vdolbinici takoj ob dodatku izvlečka, ker bi nam to onemogočilo proučevanje učinkov z mikrodilucijskim testom. Če bi prišlo do obarjanja, bi lahko uvedli še dodatno inkubacijo na trdnem gojišču in štetje kolonij. Izvlečke za preizkušanje smo pripravili v 50 % metanolu. Prav tako smo v 50 % metanolu pripravili kontrolno raztopino natrijeve soli ampicilina. Pri testu so bakterije v pozitivni kontroli zrasle, kar pomeni, da prenesejo končno koncentracijo metanola v vdolbinici mikrotitrne ploščice. Negativna kontrola pa je pokazala, da uporabljena količina metanola še ne obarja sestavin bujona. Izmed izvlečkov 27 glivnih sevov jih je bilo 5 učinkovitih proti testnemu organizmu *Escherichia coli* ER2738. Učinkoviti so bili diklorometanski izvlečki, kar pomeni, da gre za zmerno do zelo lipofilne spojine. Disk difuzijski test zato ni primerna metoda za preizkušanje izvlečkov, saj spojine zaradi svoje lipofilnosti težko difundirajo iz diskov v hidrofilno trdno gojišče. Učinkoviti izvlečki so v območju učinkovitosti natrijeve soli ampicilina, saj smo pri testu izhajali iz enakih koncentracij izvlečkov in kontrolne raztopine natrijeve soli ampicilina ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Upoštevati moramo, da smo pri testu uporabili izvlečke. Čista, izolirana protibakterijska spojina bi imela še močnejše delovanje. Ugotovili smo, da imata med vsemi učinkovitimi izvlečki najmočnejši učinek izvlečka z oznako 2 in 35, izolirana iz rastlin *Sambucus nigra* L. (črni bezeg) in *Pinus nigra* Arnold (črni bor), saj sta inhibirala rast *E. coli* ER2738 pri največji redčitvi. Protibakterijsko aktivna izvlečka z oznako 33 in 35C sta tudi izolirana iz iglic črnega bora (*Pinus nigra* Arnold), izvleček 24B pa iz stebila vrste glavinca (*Centaurea* sp.). Steblo glavinca in iglice črnega bora so iz območja naravnega rezervata Krempa. Ta habitat ustreza kriterijem za vzorčenje gostiteljskih rastlin, saj gre za ekstremno rastišče ob robu pragozda Krokar. Vzorci črnega bezga pa so iz območja Semiča, na obrobju Kočevskega Roga, ki tudi ustreza tem pogojem.

Trajne kulture, ki smo jih pripravili, so zelo pomembne, saj predstavljajo dolgoročen in stabilen vir glivnega seva v primeru, ko gojeni sev izgubimo zaradi okužbe, odmrtja ali mutacije. Primerno hranjene glive lahko iz trajnih kultur odvzamemo in ponovno gojimo.

## 7 SKLEP

Endofitske glive so dober vir potencialnih protimikrobnih učinkovin. Pokazali smo, da imajo izvlečki kultur 5 izmed 27 glivnih sevov protibakterijsko delovanje na bakterijo *Escherichia coli* ER2738. Vsi učinkoviti izvlečki so dovolj obetavni, zato so potrebne nadaljnje raziskave, čiščenje izvlečkov ter izolacija in karakterizacija aktivnih komponent. Izvlečke je treba preizkusiti tudi na ostale gramnegativne bakterije, grampozitivne bakterije, glive, viruse. Potrebno je določiti vrsto učinkovitih glivnih sevov. Glive je potrebno gojiti v večji količini tekočega gojišča, da bi dobili tudi večjo količino učinkovine za določevanje strukture. Gojišče z micelijem potem ekstrahiramo z diklorometanom in pripravimo suhi izvleček. Pri izolaciji protibakterijskih spojin lahko uporabimo vezavo lipofilnih učinkovin na polimerno smolo in elucijo z acetonom. V naslednji fazi je potrebno spojine ločiti s preparativno plastno kromatografijo in jim določiti strukturo s pomočjo masne spektrometrije in jedrske magnetne resonance.

## 8 LITERATURA

1. Strobel G, Daisy B: *Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products*. Microbiol Mol Biol Rev 2003; 67: 491-502.
2. Janeš D: *Doktorska disertacija: Raziskave gliv kot virov novih protimikrobnih učinkovin*. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2007: 1-24.
3. Strobel G, Daisy B, Castillo U, Harper J: *Natural products from endophytic microorganisms*. J Nat Prod 2004; 67: 257-268.
4. Bacon CW, White JF: *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA, 2000: 3-29.
5. Strobel GA: *Endophytes as sources of bioactive products*. Microbes Infect 2003; 5: 535-544.
6. Owen NL, Hundley N: *Endophytes – the chemical synthesizers inside plants*. Sci Prog 2004; 87 (2): 79-99.
7. Raviraja NS, Maria GL, Sridhar KR: *Antimicrobial evaluation of endophytic fungi inhabiting medicinal plants of the Western Ghats of India*. Eng Life Sci 2006; 6: 515-520.
8. Doljak B, Kac J, Kreft S, Janeš D, Mlinarič A, Slanc P, Štrukelj B, Umek A: *Vaje iz farmakognozije in farmacevtske biotehnologije*. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2005: 12-13.
9. Kendrick B: *The Fifth Kingdom, 3<sup>rd</sup> ed*. Focus Publishing, Newburyport, MA, USA, 2000: 1-8.
10. Gubina M, Ihan A: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Medicinski razgledi, Ljubljana, 2002: 457-461.
11. Kendrick B: *The Fifth Kingdom, 3<sup>rd</sup> ed*. Focus Publishing, Newburyport, MA, USA, 2000: 142-158.
12. Saikkonen K, Wäli P, Helander M, Faeth SH: *Evolution of endophyte – plant symbioses*. Trends Plant Sci 2004; 9: 275-280.
13. Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert A-K, Krohn K: *Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites*. Mycol Res 2002; 106: 996-1004.
14. Kendrick B: *The Fifth Kingdom, 3<sup>rd</sup> ed*. Focus Publishing, Newburyport, MA, USA, 2000: 184-199.

15. Strobel GA: *Rainforest endophytes and bioactive products*. Crit Rev Biotechnol 2002; 22: 315-333.
16. Petrini O, Sieber TN, Toti L, Viret O: *Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi*. Nat Toxins 1992; 1(3): 185-196.
17. Gubina M, Ihan A: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Medicinski razgledi, Ljubljana, 2002: 427-438.