

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SAŠA ZAJC

**UGOTAVLJANJE PROTIBAKTERIJSKEGA DELOVANJA
ENDOFITSKIH GLIV IGLAVCEV**

**ASSESSMENT OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ENDOPHYTIC
FUNGI OF CONIFERS**

Ljubljana, 2011

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

Zahvala

V prvi vrsti se želim zahvaliti mentorju doc. dr. Andreju Umeku, mag. farm. za vso pomoč in napotke pri pripravi diplomske naloge. Zahvaljujem se somentorju doc. dr. Damjanu Janešu, mag. farm. za nasvete in usmeritve pri izvedbi laboratorijskega dela. Hvala tudi ostalim članom Katedre za farmacevtsko biologijo, ki so mi pomagali pri praktičnem delu diplome.

Ne nazadnje se želim zahvaliti tudi svoji družini in fantu za vso podporo, vzpodbudo in razumevanje tekom študija.

Izjava

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

Saša Zajc

VSEBINA

VSEBINA	I
POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD	1
1.1 GLIVE	1
1.1.1 Osnovne značilnosti.....	1
1.1.2 Zgradba in sestava celice glive.....	2
1.1.3 Rast in razmnoževanje.....	3
1.2 NARAVNI PRODUKTI.....	5
1.3 ENDOFITI.....	6
1.3.1 Splošne značilnosti	6
1.3.2 Racionalen izbor rastlin	8
1.3.3 Endofiti in fitokemija.....	8
1.3.4 Vzorčenje, izolacija in določanje endofitov	11
1.3.5 Naravne protimikrobne spojine endofitov	13
1.4 PROTIMIKROBNE UČINKOVINE	15
1.4.1 Osnovne značilnosti.....	15
1.4.2 Bakterijska rezistenca	16
1.4.3 <i>In vitro</i> preizkušanje protimikrobnih učinkovin	18
2 NAMEN DELA	20
3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 REAGENTI	21
3.2 LABORATORIJSKI PRIBOR IN MATERIAL	21
3.3 GOJIŠČA.....	22
3.4 BIOLOŠKI MATERIAL.....	22
3.5 APARATURE	28
3.6 MIKRODILUCIJSKI TEST.....	28
4 EKSPERIMENTALNO DELO	29
4.1 NABIRANJE IN SHRANJEVANJE VZORCEV	29
4.2 IZOLACIJA ENDOFITOV	29

4.3 PRECEPLJANJE GLIV	30
4.4 PRIPRAVA TRAJNIH KULTUR.....	31
4.5 PRIPRAVA IZVLEČKOV ENDOFITSKIH GLIV	31
4.6 NACEPITEV BAKTERIJE <i>Escherichia coli</i> NA LURIA BERTANI GOJIŠČE.....	32
4.7 MIKRODILUCIJSKI TEST - preizkušanje protibakterijskega učinka izvlečkov trdnega gojišča z micelijem, pripravljenih s tremi po polarosti različnimi topili	33
4.8 MIKRODILUCIJSKI TEST - preizkušanje jakosti protibakterijskega učinka z metanolom redčenih aktivnih izvlečkov trdnega gojišča z micelijem.....	36
5 REZULTATI IN RAZPRAVA	37
5.1 NABIRANJE IN SHRANJEVANJE GLIV	37
5.2 IZOLACIJA ENDOFITOV	37
5.3 PRECEPLJANJE GLIV	38
5.4 PRIPRAVA TRAJNIH KULTUR.....	44
5.5 PRIPRAVA IZVLEČKOV ENDOFITSKIH GLIV	44
5.6 NACEPITEV BAKTERIJE <i>Escherichia coli</i> NA LURIA BERTANI GOJIŠČE.....	50
5.7 MIKRODILUCIJSKI TEST - preizkušanje protibakterijskega učinka izvlečkov trdnega gojišča z micelijem, pripravljenih s tremi po polarosti različnimi topili	50
5.8 MIKRODILUCIJSKI TEST - preizkušanje jakosti protibakterijskega učinka z metanolom redčenih aktivnih izvlečkov trdnega gojišča z micelijem.....	54
6 SKLEP	55
7 VIRI IN LITERATURA	57

POVZETEK

Uporaba antibiotikov je močno zmanjšala smrtnost zaradi infekcijskih bolezni, a na žalost se je postopno razvila tudi rezistenca vse več bakterijskih sevov, ki so odporni proti posameznim ali celo več različnim antibiotikom. To je razlog, da vedno znova iščemo nove in bolj učinkovite spojine. Neizmerno raznolikost kemijskih struktur, ki je neprimerljiva celo z največjimi kombinatoričnimi knjižnicami, nam nudi narava. Potencialni vir teh spojin so tudi endofitski mikroorganizmi, ki prebivajo v tkivih živih rastlin in so razmeroma neraziskani. Že danes nam endofiti zagotavljajo široko paleto bioaktivnih sekundarnih metabolitov z edinstveno strukturo. Sposobni so sintetizirati protibakterijske, protivirusne, protitumorne, antioksidativne, antidiabetične in imunosupresivne spojine. Pričakuje se, da v prihodnosti postanejo pomemben element v proizvodnji novih bioaktivnih izdelkov.

V diplomskem delu smo ugotavljali ali izvlečki endofitskih gliv, ki so naseljevale iglice 45 dreves (vzorčili smo 67 iglavcev) v ljubljanskem in mariborskem botaničnem vrtu, izkazujejo protibakterijsko delovanje proti testnemu mikroorganizmu bakteriji *Escherichia coli* ER2738. Izvlečke 45 endofitskih gliv smo naredili s tremi različno polarnimi topili: metanolom, etilacetatom in diklorometanom. Mikrodilucijski test je pokazal, da sta etilacetatni in diklorometanski izvleček glive iz pritlikavega rdečega bora *Pinus sylvestris* »Watereri« učinkovita proti zgoraj omenjeni bakteriji. Izvlečka se po intenzivnosti učinka nista razlikovala. Pripravili smo tudi trajne kulture endofitskih gliv, ki predstavljajo stabilen vir za nadaljnje raziskave.

ABSTRACT

The use of antibiotics has drastically reduced the mortality due to infectious diseases, but unfortunately the resistance of more and more bacterial strains has developed. Those strains are resistant to one or even more different antibiotics. This is the reason for searching for new and new more efficient compounds. The immense variety of chemical structures offered to us by nature can not be compared with the largest combinatorial libraries. A potential resource of these compositions are also endophytic microorganisms living in tissues of existing plants and they are relatively unexplored. Today the endophytes ensure a large variety of bioactive secondary metabolites with unique structure. They are capable of synthesizing antibacterial, antiviral, anticancer, antioxidative, antidiabetic and immunosuppressive compounds. In the future they are expected to become an important element in the production of new bioactive products.

In the present diploma thesis we have tried to find out whether the extracts of endophytic fungi colonizing needles of 45 trees (we sampled 67 conifers) in the botanic gardens of Ljubljana and Maribor show their antibacterial effect against test microorganism, a bacteria called *Escherichia coli* ER2738. The extracts of 45 endophytic fungi were made by using three of solvents different polarity: methanol, ethyl acetate and dichloromethane. The microdilution test showed the effectiveness of the ethyl acetate and dichloromethane extract of the fungi from small red pine *Pinus sylvestris* »Watereri« against the above mentioned bacteria. The extracts did not show any difference regarding the intensity of their effectiveness. We have also prepared permanent cultures of endophytic fungi that represent a stable resource for some further research.

SEZNAM OKRAJŠAV

DNA – deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)

GPS – navigacija (global positioning system)

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (high-performance liquid chromatography)

LAF – aseptična komora z laminarnim pretokom zraka (laminar air flow)

LBA – Luria-Bertani trdno gojišče (Luria-Bertani agar)

MBK – minimalna baktericidna koncentracija

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

MRSA – proti meticilinu odporni sevi *Staphylococcus aureus* (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)

MS – masna spektrometrija (mass spectrometry)

NCCLS – nacionalni komite za klinične laboratorijske standarde (the national committee for clinical laboratory standards)

NMR – jedrska magnetna resonanca (nuclear magnetic resonance)

PBP – penicilin vezoči protein (penicillin-binding protein)

PCR – verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)

PDA – trdno gojišče s krompirjevim izvlečkom in glukozo (potato dextrose agar)

PDB – tekoče gojišče s krompirjevim izvlečkom in glukozo (potato dextrose broth)

rRNA – ribosomska ribonukleinska kislina (ribosomal ribonucleic acid)

TLC – tankoplastna kromatografija (thin-layer chromatography)

VRE – proti vankomicinu odporni enterokoki (vancomycin-resistant enterococcus)

1 UVOD

1.1 GLIVE

1.1.1 Osnovne značilnosti

Glive so evkariontski, heterotrofni, absorptivni organizmi, ki razvijejo difuzno, razvejano tubularno telo in se razmnožujejo s pomočjo spor (1). Imajo celično steno, se ne gibljejo ter se prehranjujejo s črpanjem hranil iz okolice, zato spominjajo na rastline. Vendar so po zgradbi in načinu metabolizma tako specifična živa bitja, da predstavljajo svoje kraljestvo.

Značilnosti gliv:

- v celičnih stenah imajo pretežno hitin in le nižje oblike gliv tudi celulozo,
- rezervna hrana je glikogen in ne škrob kot v rastlinah,
- prehranjujejo se heterotrofno in ne avtotrofno in fototrofno,
- presnavljajo lizotrofno, v podlago izločajo encime, ki razgrajujejo substrat v produkte, to pa glive vsrkajo (2, 3).

Glede na vir hrane jih delimo na:

- soživke/simbionte/komezale, kadar živijo v sožitju z rastlinami, insekti;
- zajedalke/parazite, kadar zajedajo žive organizme in iz njih črpajo hranilne snovi, pri tem pa jih lahko oslabijo ali celo uničijo;
- gniloživke/saprofite, kadar se hranijo z odmrlimi ali razpadajočimi organskimi odpadki (2, 3).

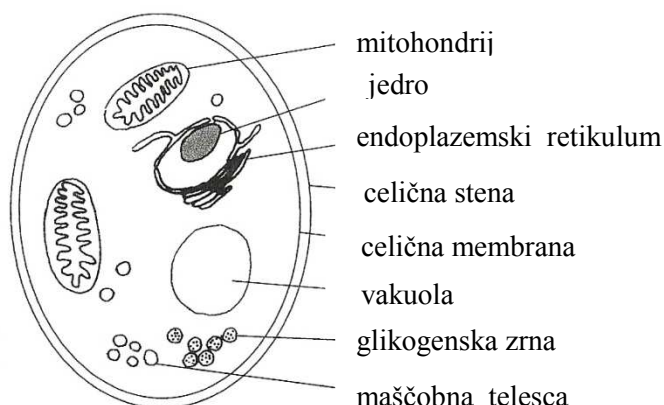
Poznamo pet različnih evkariontskih kraljestev: živali (Animalia), rastline (Plantae), glive (Eumycota), alge in stramenopile (Chromista) ter praživali (Protozoa). Večino od približno 1.500.000 različnih vrst gliv prisotnih na Zemlji uvrščamo v samostojno evkariontsko kraljestvo (Eumycota) (4). V kraljestvo pravih gliv prištevamo le tiste vrste, ki tvorijo hife ter kvasovke in lišaje. Nekatere glive pa uvrščamo tudi v kraljestvi Protozoa in Chromista. Pomembne skupine gliv podaja preglednica I (5).

Preglednica I: Razvrstitev gliv v kraljestva in skupine (5).

SKUPINA	KRALJESTVO
Celične sluzne plesni	Protozoa
Plazmodijske sluzne plesni (Myxomycetes)	
Oomicete (Oomycetes)	Chromista
Hitridiomicete (Chytridiomycetes)	Eumycota
Zigomicete (Zygomycetes)	
Askomicete (Ascomycetes)	
Bazidiomicete (Basidiomycetes)	
Mitosporne glive	

1.1.2 Zgradba in sestava celice glive

Celica je osnovna gradbena in življenjska enota vseh živih bitij. Nekatere strukture v celici gliv so podobne živalski, druge pa rastlinski celici. Glive imajo tipično evkariontsko zgradbo. Celična membrana obdaja citoplazmo z organeli, zunanji skelet pa predstavlja celična stena. V vsaki celici najdemo najmanj eno jedro obdano z jedrno membrano, endoplazemski retikulum, mitohondrije in celične vključke. Nekatere glive izdelujejo kapsulo (3).

**Slika 1:** Celična struktura glive (3).

Polisaharidna kapsula omogoča celicam, da se vežejo med seboj in pritrjujejo na podlago. Sestava polisaharidov ter antigenske in fizikalne lastnosti kapsule se razlikujejo

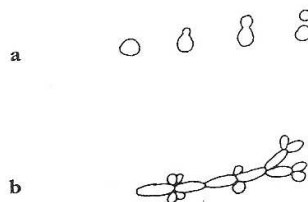
od vrste do vrste. Kapsula služi tudi kot virulenčni dejavnik, saj onemogoča gostiteljevemu imunskemu sistemu, da bi glivo prepoznal in jo fagocitiral. Pod kapsulo leži celična stena, ki daje glivam obliko, jim določa antigenske lastnosti in ščiti celice pred spremembami osmotskega tlaka v okolju. Sestavljena je pretežno iz ogljikovih hidratov. Pod njo je dvoslojna celična membrana, ki ima podobno strukturo kot membrana višjih evkariontov. Celična membrana ima več nalog: ščiti citoplazmo in znotrajcelične organele, uravnava vnos in izločanje snovi ter sodeluje pri sintezi celične stene in kapsule. Glavna sestavina membrane so fosfolipidi. Esencialna sestavina membrane gliv pa so steroli (ergosterol, zimosterol), ki jih v membrani sesalcev ne najdemo. Slednji podatek izkoriščamo pri zdravljenju glivičnih okužb s polienskimi antibiotiki in azoli. Celični organeli gliv se ne razlikujejo od tistih pri višjih evkariontih. V citoplazmi se nahajajo organeli, kot so: jedro, ribosomi, endoplazemski retikulum, mitohondriji, Golgijev aparat... V citoplazmi najdemo tudi 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 farmakološke učinkovine (npr. ergotamin) (5, 6).

1.1.3 Rast in razmnoževanje

Bistvena značilnost gliv je rast v obliki cilindričnih celic, hif. Razširjanje glivnih hif po površju in v notranjosti substrata poteka z apikalno rastjo. Hife se podaljšujejo in razvejujejo. Preplet hif imenujemo micelij. Na površju gojišča oblikuje micelij okroglo kolonijo. Njen premer narašča s konstantno hitrostjo, istočasno pa kolonija prodira tudi v globino (7). Ob izobilju hranil glive intenzivno vegetativno rastejo. Na rast vplivajo tudi fizikalno kemični dejavniki, kot so: temperatura, zrak, svetloba in pH (1). Čeprav obstaja nekaj gliv, ki nimajo hif in nekateri drugi organizmi, ki jih imajo, so hife in miceliji kljub temu povezani z rastjo in obliko gliv dosti bolj kot pri katerikoli drugi skupini organizmov (8). Po obliki rasti delimo glive na kvasovke, plesni in dimorfne glive (3).

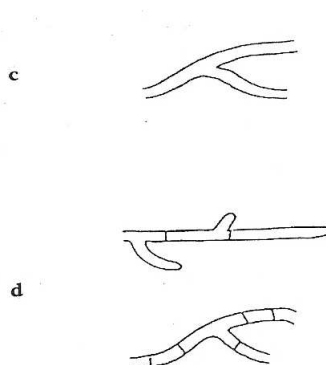
Kvasovke so enocelične glive ovalnih in okroglih oblik. Na trdnih gojiščih rastejo v kolonijah in imajo značilen vonj po kvasu. Razmnožujejo se z brstenjem. Mlade vzbrstele celice imenujemo blastospore. Brsteča celica se lahko popolnoma loči od starševske celice ali pa ostane z njo v stiku. Tako nastane veriga celic nanizana druga za drugo. Včasih

hčerinska celica ne tvori brstov, ampak se začne podaljševati. Nastala struktura spominja na hifo in se imenuje psevdohifa ali psevdomicelij (npr. *Candida albicans*) (3, 9).



Slika 2: Rast kvasovk: a - brstenje, b - psevdohifa (3).

Plesni ali vlaknate glive so večcelični organizmi. Rastejo v obliki razvejanih niti (hif). Pri filogenetsko mlajših vrstah so hife prečno opredeljene s stenami - septami. Splet hif imenujemo micelij. Ta je puhastega videza. Del micelija se vrašča v hranilno podlago in ga imenujemo vegetativni micelij. Del, ki raste nad površino, imenujemo zračni ali reproduktivni micelij. Na zračnem miceliju se razvijejo značilne strukture za razmnoževanje s sporami, ki so morfološko tako značilne za posamezne plesni, da zadostujejo za identifikacijo. Najbolj znani predstavniki plesni so iz rodov *Aspergillus* in *Penicillium* (3, 9).



Slika 3: Rast plesni: c - neseptirane hife, d - septirane hife (3).

Dimorfne glive lahko rastejo kot kvasovke in plesni. Oblika je odvisna od rasnih razmer v okolju. Nekatere za človeka patogene glive imajo izražen temperaturni dimorfizem. V naravi rastejo pri 25 do 30°C kot plesni, v gostitelju in pri temperaturi 35 do 37°C pa se preoblikujejo v kvasovke (3). Poleg temperature vplivajo na obliko, v kateri bo dimorfna gliva, tudi drugi dejavniki, kot so: koncentracija CO₂, pH, vsebnost cisteina in drugih sulfhidrilnih spojin (6).

Spore imajo v življenju gliv dve glavni nalogi: razširitev na novo področje in preživetje v neugodnih razmerah. V primerjavi z vegetativnim razvojem gliv, ki je precej

enostaven, je sporulacija zelo zapletena in se pojavlja v zelo različnih oblikah. Spore ponavadi nastajajo na hifah ali na kompleksno zgrajenih plodiščih sestavljenih iz hif, ki so se dvignile nad podlago in prepletle (8). Razširjajo se lahko po zraku, s pomočjo vode ali živali. Sestava stene spore se razlikuje od hifne stene, saj je relativno neprepustna. Ko se začne brstenje, encimi zmehčajo steno spore in s tem povečajo njeno prepustnost. Po brstitvi se začne rast in diferenciacija. Pri tem nastajajo mlade hife, poteče migracija citoplazme in jeder. Gliva nato tvori razvejene hife, da lahko kolonizira dovolj veliko področje in pridobi ustrezna hranila (1).

Večina gliv je med evolucijo ohranila spolni in nespolni način razmnoževanja. Glive, pri katerih poznamo spolni način razmnoževanja, imenujemo *Fungi perfecti*. Po obliki spolnega razmnoževanja jih delimo na tri debla: *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*. Poznamo tudi glive, imenovane *Fungi imperfecti*, pri katerih prevladuje nespolni način razmnoževanja. Spore, ki pri tem nastanejo, se imenujejo konidiji. Te vrste gliv združujemo v umetno skupino *Deuteromycota* (3).

1.2 NARAVNI PRODUKTI

Naravni produkti so naravno pridobljeni metaboliti in/ali stranski produkti iz mikroorganizmov, rastlin ali živali. Te produkte so uporabljali v humani medicini že pred tisočletji, rastline pa so bile glavni vir spojin, ki so se uporabljale za zdravljenje. Razumevanje kemijskih lastnosti in mehanizem delovanja bioaktivnih snovi v kompleksnih mešanica pa sta še dolgo ostali skrivnost (10).

Šele, ko je Pasteur odkril, da fermentacijo povzročajo žive celice, so ljudje začeli resno preiskovati mikrobo kot vir biološko aktivnih spojin (10). V prejšnjem stoletju so najpomembnejšo vlogo pri odkrivanju novih zdravilnih učinkovin odigrali mikroorganizmi, ki sintetizirajo antibiotike. Flemingovo odkritje penicilina v *Penicillium notatum* leta 1929 ter prva širša terapevtska uporaba omenjenega antibiotika v 40. letih prejšnjega stoletja, sta začela novo obdobje medicine, t.i. »zlato dobo antibiotikov«. Izjemen uspeh penicilina je sprožil intenzivno iskanje bioaktivnih učinkovin v naravnih virih. Rezultati dolgoletnih raziskav gliv 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. (1).

Odkrivanje velikega števila mikroorganizmov, ki bi lahko bili vir potencialnih zdravnih učinkovin, je danes lažje zaradi razvoja novih in izpopolnjenih postopkov reševanja. Ti postopki uporabljajo posamezne celice, encime, izpopolnjene tehnike, ki so pogosto avtomatizirane, kar omogoča relativno hitro detekcijo. Vseeno pa velike industrije izgubljajo interes za raziskavo naravnih virov, saj predstavlja iskanje ustreznega biološkega vira, detekcija aktivnega produkta, določanje strukture le-tega, nato pa še dolga pot, da iz spojine vodnice razvijejo končno zdravilo, velik napor ter relativno visoke stroške (10).

Naravni produkti nam nudijo neizmerno raznolikost kemijskih struktur, ki je neprimerljiva celo z največjimi kombinatoričnimi knjižnicami. Pomembno bi bilo, da bi postal primarni namen kombinatorne kemije dopolnjevanje in pomoč pri odkrivanju ter razvoju naravnih produktov, ne pa pri njihovem nadomeščanju (10).

1.3 ENDOFITI

1.3.1 Splošne značilnosti

Simbiotska združenja med mikroorganizmi in rastlinami so že starodavna, o tem pričajo številni primeri kompleksnih in visoko specifičnih sožitij med rastlinami in mikrobi, ki so bili popisani zelo natančno. Endofitski mikrobi so zanimiva skupina mikroorganizmov, ki so združeni z različnimi tkivi in organi zemeljskih in nekaterih vodnih rastlin ter postajajo predmet zanimanja mikologov, ekologov in rastlinskih patologov (11). Od Freemanovega odkritja endofitov v Darnelu v Nemčiji leta 1904, so različni raziskovalci opredelili endofite na različne načine. Bacon in White podajata široko sprejeto definicijo endofitov: »Endofiti so mikroorganizmi, ki naseljujejo živa, notranja tkiva rastlin, ne da bi pri tem povzročali kakršnekoli vidne poškodbe gostitelja« (12). Endofiti lahko razvijejo z rastlino simbiotične ali mutualistične odnose, lahko pa so tudi agresivni saprofiti ali oportunistični patogeni (10).

Razvoj endofitskih odnosov se je začel pred stotinami milijoni let, ko so se na našem planetu pojavile prve višje rastline. Dokaz za to so fosilizirana tkiva stebel in listov,

kjer so te mikroorganizme odkrili (13). Ocenjujejo, da je na svetu več kot 1 milijon endofitskih vrst (14). Najpogostejši endofitski mikroorganizmi so glive in bakterije. Verjetno se kot endofiti v rastlinah nahajajo tudi mikoplazme, rikecije, arhebakterije, a do sedaj še niso našli dokazov o njihovi prisotnosti (15).

Glivni endofiti vsebujejo eksoencime potrebne za kolonizacijo njihovih gostiteljev. Ti vključujejo proteaze in amilaze, fenol oksidaze, lipaze in celulaze, ksilanaze in pektinaze. Po kolonizaciji nastane mutualistično združenje z gostiteljem: izboljša se rast gostitelja, obenem pa je poskrbljeno za oskrbo mikrobov s hranili za ekstenzivno kolonizacijo gostitelja (16). Torej interakcija gostitelj-endofit temelji na medsebojnem izkoriščanju. Ugodnosti za posameznega partnerja so le redko simetrične in se lahko destabilizirajo (17). Če je ravnotežje moteno, bodisi s porastom rastlinske obrambe bodisi z upadom glivne virulence, nastopi bolezen (16).

Endofitom so dokazali številne vloge, in sicer:

- nove ekološke funkcije (npr. termotoleranca rastlin, ki rastejo na geotermalnih tleh),
- vplivajo na biološko raznovrstnost,
- neposredno pospešujejo rast rastlin,
- proizvajajo strupene alkaloidne, ki odvrčajo ali zastupijo rastlinojedce,
- v lesnatih rastlinah lahko razvijejo posebno vrsto obrambe ali imajo bolj splošno funkcijo pri omejitvi škode povzročene s patogeni (14),
- sodelujejo pri biološki razgradnji odmrle ali umirajoče gostiteljske rastline v procesu recikliranja hranil (18).

Endofiti zagotavljajo široko paleto bioaktivnih sekundarnih metabolitov z edinstveno strukturo: alkaloidi, benzopiranoni, kinoni, flavonoidi, fenolne kisline, steroidi, terpenoidi, tetraloni, ksantoni. Te bioaktivne metabolite uporabljamo kot agrokemikalije, antibiotike, imunosupresive, antiparazitike, antioksidante, sredstva proti raku (19). Nakateri endofiti imajo zmožnost proizvajati enake ali podobne bioaktivne spojine, kot so tiste, ki jih sintetizira njihova gostiteljska rastlina. Endofitske glive lahko uporabljamo za proizvodnjo bioaktivnih spojin, ki izvirajo iz rastlin, kot so paklitaksel, podofilotoksin, kamptotecin, vinblastin, hipericin, diosgenin (20).

1.3.2 Racionalen izbor rastlin

Endofitski mikroorganizmi nas zanimajo, saj predstavljajo dokaj neraziskano področje biokemijske raznolikosti, proizvajajo protimikrobne spojine, ki lahko nudijo zaščito rastlinam, njihovi sekundarni metaboliti imajo protiglivično, protibakterijsko in druga delovanja ter se lahko uporabljajo za zdravljenje. Edina slabost je njihova morebitna toksičnost za višje organizme (živali in ljudi). Rastlinski gostitelj, ki je tudi evkariontski sistem, služi kot izbirni sistem za endofite, ki sintetizirajo bioaktivne molekule z omejeno toksičnostjo proti višjim organizmom (13).

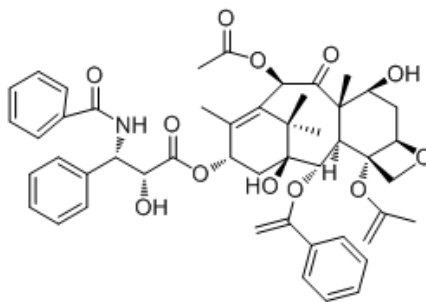
Približno 300.000 rastlinskih vrst, ki rastejo v še ne raziskanih področjih na Zemlji, so gostiteljice enega ali več endofitov (19). Zaradi velikega števila rastlinskih vrst je potrebno uporabiti kreativne strategije, da poiščemo tiste, ki so poseljene z endofiti, katerih produkti imajo biološko aktivnost. Ko izbiramo rastline, želimo najti take, ki imajo endofite z veliko biotsko raznovrstnostjo (10). Resni kandidati za študije so:

- rastline znotraj edinstvenih okolij, zlasti tiste z nenavadno biologijo in tiste, ki so razvile nove strategije za preživetje,
- rastline, ki imajo etnobotanično zgodovino (uprabljajo jih domorodci), ki se nanaša na specifično uporabo,
- endemne rastline, ki imajo nenavadno dolgo življenjsko dobo oz. rastline, ki rastejo na starih področjih Zemlje,
- rastline, ki rastejo na območjih z veliko biotsko raznolikostjo (13).

1.3.3 Endofiti in fitokemija

Glivni endofiti se prenašajo med rastlinami s sporami. Spore prenašajo dež, veter ali insekti na drevesna tkiva, ki še niso okužena, zlasti na novo zraslo listje in vejevje. Endofiti, ki proizvajajo hidrofobne spore, se raje prenašajo z vetrom ali živalskimi vektorji. Do infekcije rastlinskega tkiva najpogosteje pride preko rastlinskih ran, kjer so se hranili insekti ter preko mehanskih poškodb. Rastline imajo verjetno nivo nasičenja infekcije, ki se ga ne da prekoračiti. Obstajajo endofiti, ki lahko okužijo katerokoli rastlino, pa tudi endofiti, ki specifično naseljujejo le določene rastline, katere prepoznajo po določenih kemijskih lastnostih (21). Iz ene vrste gostiteljev je pogosto izoliranih veliko endofitov, a le eden od njih v kulturi proizvaja biološko aktivne spojine (15).

Nekateri endofiti proizvajajo spojine, ki so primarno značilne za gostiteljsko rastlino, kar je verjetno posledica genetske rekombinacije endofita z gostiteljem. Tak je primer endofitske glive, ki je prisotna na tisi in proizvaja paklitaksel (10). Študija rastline *Gentiana macrophylla*, tradicionalne kitajske zdravilne rastline, je pokazala, da endofitske glive, izolirane iz nje, proizvajajo sekoiridoid gentiopikrin, ki je sicer značilen proizvod omenjene rastline. Primarni presejalni test z Dragendorfovimi reagentom ter analiza s TLC in HPLC so pokazali, da dva od izoliranih endofitskih sevov res proizvajata gentiopikrin (22). Endofiti lahko proizvajajo iste redke in pomembne bioaktivne snovi kot njihove gostiteljske rastline, to pa zmanjša potrebo po počasi rastočih in redkih rastlinah ter preprečuje svetovni upad biološke raznovrstnosti zaradi sečnje. Poleg tega je mikrobní vir lažje in bolj ekonomično gojiti, kar zmanjša ceno pridobivanja določene spojine (10).



Spojina 1: Paklitaksel, protirakova spojina, ki jo producirajo številne endofitske glive (10).

Obstaja malo informacij o biokemiji in fiziologiji interakcije endofit-gostitelj. Na primeru lesnatih endofitov bomo prikazali dejavnike, kot so starost gostitelja, sezona, okolje in lokacija, ki vplivajo na biologijo endofita (15, 21).

Časovni potek infekcijskih vzorcev endofitov

Listi, ki brstijo, so navadno brez endofitov, saj še niso bili izpostavljeni endofitnim sporam. Stopnja okuženosti narašča s časom, s staranjem rastlinskega tkiva. Daljši kot je čas izpostavljenosti rastlinskega tkiva sporam, večja je verjetnost, da pride do infekcije. Narejenih je bilo več študij, ki so pokazale, da v prvi polovici življenja listov poteka porast infekcije z endofiti, nato okužba doseže plato, zatem rahel padec. Rezultat eksperimenta Helanderja in sodelavcev na boru (*Pinus sylvestris*) je pokazal, da stopnja okuženosti v mladih iglicah (starih eno leto) narašča znotraj sezone, v starih iglicah (pet let) pa ne (21).

Prostorski vzorci endofitske infekcije

a) variacija med lokacijami

Gostiteljska rastlina je pogosto okužena z endofiti, ki se nahajajo v njihovem naravnem okolju. Fisher je skupaj s sodelavci odkril, da so bila endofitska združenja v listih drevesa *Quercus ilex* podobna v drevesih, ki so rasla v dveh oddaljenih geografskih območjih (Majorka in Švica) v nativnem gostiteljskem habitatu. Endofitska združenja v listih istega drevesa v nenativnem okolju (Anglija) pa so se razlikovala od prvih dveh. Na prisotnost posameznih endofitov vpliva nativno oz. nenativno okolje. V primeru, da rastlino, ki v je v nativnem okolju poseljena s specifičnimi endofiti, premaknemo v drugo okolje, kjer takih endofitov ni, jo bodo poselili bolj nespecifični oz. pogosti endofiti, kot sta npr. *Alternaria* in *Cladosporium*, ki prevladujejo v teh okoljih. Na nativnih lokacijah je nižja pojavnost okužbe z bolj pogostimi endofiti manjša, kar je verjetno posledica izključevanja z bolj specifičnimi endofiti. Lokacija vpliva na vrsto in na gostoto endofitov. Wilson in Faeth sta v študiji pregledala drevesne endofite na drevesu *Quercus emory*. Prvi hrast je rasel v plitvi soteski ob reki, drugi pa na sosednjem kamnitem obronku. Na obeh sta našla podobne vrste endofitov, večja gostota je bila na drevesu, ki je bil izpostavljen spiranju z vodo, poleg tega je bilo na tem hrastu večje število redkih endofitskih vrst (21).

b) variacija med drevesi v isti lokaciji

Variacija v okužbi z endofiti se pojavlja med drevesi na isti lokaciji. V študiji sta Wilson in Faeth opazila variacijo v infekcijski gostoti, ne pa tudi v prisotnosti posameznih vrst endofitov. Vzrok za razliko je različna velikost listov med drevesi. Majhni listi imajo večjo infekcijsko gostoto v primerjavi z velikimi listi. Pomembno je tudi genetsko ozadje posameznega drevesa (21).

c) znotraj drevesna variacija

Študija je bila izvedena na listnih vzorcih vzetih iz različnih delov krošnje. Listi, ki se nahajajo najvišje v krošnji, so dlje od vira spor, zato je tu nižja gostota okužbe. Manj ugodne razmere za razvoj endofitskih gliv visoko v krošnji so tudi zaradi močnega UV sevanja in nižje vlažnosti. Na najvišje dele padejo nerazpršene dežne kaplje, ki odstranijo spore iz listov in tako preprečijo razvoj endofitov. Listi, ki rastejo na različnih smereh neba, vsebujejo enako gostoto endofitov. V zgodnji sezoni imajo listi v senci/notranji listi/večjo gostoto endofitov kot osončeni/zunanji/listi. Osončeni listi so med pomladjo in poletjem bolj izpostavljeni UV sevanju, kar inhibira okužbo z endofiti. V jesenskih

mesecih, ko je UV izpostavljenost osončenih listov nižja, listi pa so manjši od tistih v senci, je gostota endofitov v teh listih večja (21).

d) znotraj listni vzorci kolonizacije

Pri iglavcih in listavcih je bil opažen podoben trend porazdelitve endofitske gostote. Največja gostota endofitskih gliv je prisotna ob sredinski listni žili tik ob peclju, nato pa upada vzdolžno proti distalnemu koncu. Obstajajo tudi izjeme. Na različno prisotnost endofitov znotraj lista vpliva različno odlaganje spor in različna listna rast oz. širjenje. Številni endofiti se prenašajo in dispergirajo z dežjem, zato vpliva na odlaganje spor endofitov tudi različna afiniteta delov lista za deževnico. Bolj infeciran je del lista, po katerem je usmerjena dežna kaplja, torej ob sredinskem listnem rebri. Na odlaganje spor vpliva tudi gostota dlačic, ki služijo kot zanke, na katere se ujamejo spore endofitov, in so različno gosto razporejene na listih. Dežni kanal poteka po sredini listne žile in je usmerjen k peclju lista. Gostota dlačic je največja ob sredinski listni žili in pada od peclja do konca lista. Nekatere infekcije se pojavijo takoj po brstenju, ko se list še vedno razvija oziroma razširja. Na delu lista, ki se je bolj širil (distalni in laminarni del), postane infekcija bolj razredčena in s tem nižja infekcijska gostota. Listi, ki so upognjeni tako, da se dež steka po kanalih do distalnega dela lista in ne proti peclju, imajo večjo gostoto endofitov na tem delu lista. Listi, ki nimajo kanalov, po katerih bi tekla dež in listi, katerih pokritost z dlačicami je enakomerna po celotni površini, ne kažejo razlike v poseljenosti z endofiti (21).

1.3.4 Vzorčenje, izolacija in določanje endofitov

Po izboru rastline za izolacijo, je le to potrebno identificirati in ji določiti lokacijo s pomočjo GPS naprave (10). Nabrani delčki rastlin, kot so listi, korenine, korenike, cvetovi, plodovi, stebela in lubje, naj bodo majhni. Vzorcem odstranimo odvečno vlago, nato jih zapremo v hermetično plastično vrečko. Do pričetka izolacijskih postopkov vzorce hranimo pri 4°C (23).

V laboratoriju površino rastlinskega materiala temeljito očistimo s 70 % etanolom in ga posušimo v komori z laminarnim pretokom zraka. S tem odstranimo morebiti prisotne površinske mikroorganizme (10, 15). Nekateri epifiti oblikujejo subkutikularne strukture in čeprav se pojavljajo zunaj celic gostiteljevih tkiv, jih po površinski sterilizaciji lahko določamo kot endofite. Na drugi strani pa lahko spore in delčke hif endofitov, ki še

niso vraščene v celice rastlin, uničimo s površinsko sterilizacijo (24). Po površinski sterilizaciji rastlinskim delom izrežemo notranje tkivo in jih položimo na gojišča v petrijevkah. Delamo pod sterilnimi pogoji, v komori z laminarnim pretokom zraka, in uporabljamo sterilni nožek. Po nekaj dneh inkubacije pri sobni temperaturi odvezamo hifne konice gliv ter jih prenesemo na trdno gojišče s krompirjevim izvlečkom z glukozo (PDA gojišče) ali drugo primerno gojišče. Endofitske glive lahko spodbujamo k tvorbi spor z dodatkom posebnih za njih ugodnih rastlinskih snovi (10, 15). Številni endofiti lahko zapustijo vzorec, vendar ni nujno, da bodo vsi zrasli na gojišču. Glive precepljamo, dokler ne dobimo čiste kulture (12).

Različna morfologija, oblika in barva nam pomagajo pri razločevanju mikroorganizmov (12). Hife endofitske glive navadno ne oblikujejo vrstno specifičnih morfoloških struktur, tako da tudi določitev glive na osnovi morfologije hif ni mogoča. Večina endofitskih gliv oblikuje spore v kulturi, ki jih lahko določimo s svetlobnim mikroskopom. V primeru, da gliva ne tvori trosišč, ji moramo spremeniti rastne pogoje (temperatura, svetloba) ali hranilno podlago. Nastanek spor je možno inducirati z UV svetlobo (24). Najbolj zanesljivo endofitske glive in bakterije identificiramo z uporabo verižne reakcije s polimerazo (PCR) in sekveniranjem (določitev zaporedja DNA). PCR izvedemo na gojenih endofitih z uporabo oligonukleidnih začetnikov (primerjev), ki pomnožujejo DNA, ki kodira ribosomalno RNA (rRNA). S sekveniranjem pomnožene DNA in primerjavo s podatkovnimi bazami lahko določimo ali gre za novo vrsto ali ne. V primeru, da je zaporedje znano, lahko vrsto identificiramo (12).

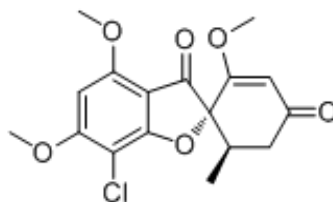
Ko dobimo čisto kulturo endofita, naredimo izvlečke micelija na trdnem gojišču, le-te pa testiramo na biološko aktivnost. V primeru, da je izvleček aktiven, začnemo endofit gojiti v večjem obsegu, da bi s tem dobili večjo količino učinkovine. Z uporabo različnih medijev in rastnih razmer preverimo ali ga je mogoče gojiti površinsko ali v suspenzijski kulturi. Ko najdemo optimalne razmere za rast, ko endofiti izločajo bioaktivne spojine, začnemo z gojenjem. Temu sledi ekstrakcija, izolacija in karakterizacija spojin (10, 15). Za določitev strukture spojin navadno uporabimo masno spektrometrijo (MS) in jedrsko magnetno resonanco (NMR). V primeru, da spojina ustrezno kristalizira, lahko uporabimo tudi rentgensko difrakcijo (12).

1.3.5 Naravne protimikrobne spojine endofitov

Velikokrat se zgodi, da endofiti v naravnem okolju izločajo aktivne sekundarne metabolite, ko jih gojimo v kulturi, pa ne proizvajajo aktivnih spojin. Temperatura, sestava medija in stopnja prezračevanja vplivajo na vrsto in količino spojin, ki jih proizvajajo endofitske glive (15).

Antibiotiki so naravni produkti mikroorganizmov z nizko molekulsko maso in delujejo v nizkih koncentracijah proti drugim mikroorganizmom. Pogosto so vir teh endofiti (10). Ti sekundarni metaboliti inhibirajo ali ubijejo različne mikroorganizme, od bakterij, gliv pa do praživali, ki škodljivo vplivajo na ljudi in rastline (15). Do danes so iz endofitov izolirali več spojin, ki imajo protimikrobno aktivnost in pripadajo različnim strukturnim razredom, kot so alkaloidi, peptidi, steroidi, terpenoidi, fenoli in kinoni (19).

Veliko bioaktivnih spojin, vključno z antimikotiki, so izolirali iz rodu *Xylaria*, iz različnih rastlin. Sordaricin in multiplolid A in B delujejo proti glivi *Candida albicans*. Griseofulvin, spirobenzofuranski protiglivični antibiotik, deluje proti živalskim in humanim mikoizam (19).

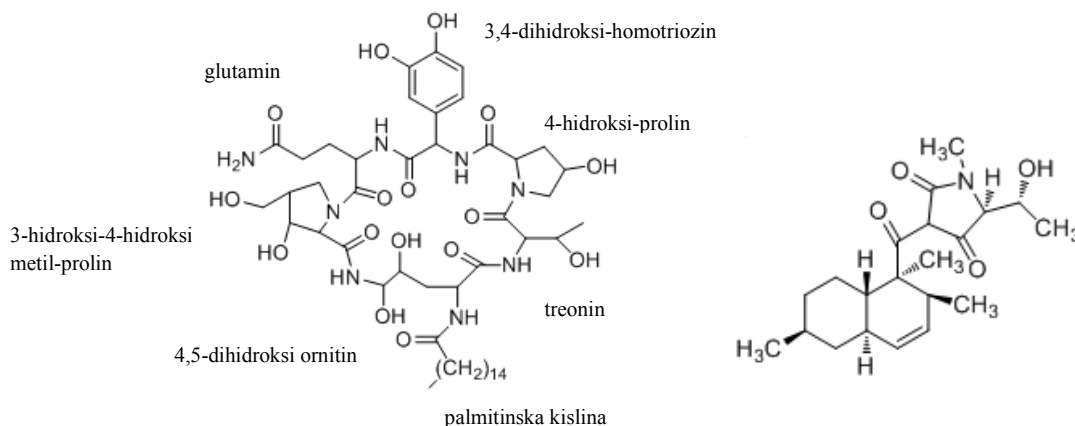


Spojina 2: Griseofulvin, protiglivični antibiotik (20).

Koronamicin, peptidni antibiotik izoliran iz *Streptomyces* sp., deluje proti glivičnemu patogenu *Cryptococcus neoformans* in parazitu malarije, *Plasmodium falciparum* (19).

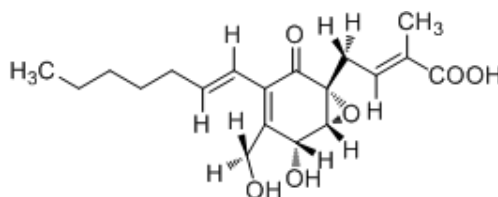
Bioaktivna spojina endofitske glive *Cryptosporiopsis quercina*, ki je izkazala protiglivično učinkovitost proti *Candida albicans* in *Trichophyton* spp., je edinstven peptidni antimikotik imenovan kriptokandin. Učinkovit je proti večjemu številu rastlinskih patogenih gliv, kot sta *Sclerotinia sclerotiorum* in *Botrytis cinera*. Kriptokandin in njemu sorodne učinkovine se danes uporabljajo proti glivam, ki povzročajo bolezni kože in nohtov. Znano je, da lahko določen mikrob proizvaja več bioaktivnih spojin. Tako so iz iste glive *Cryptosporiopsis quercina* izolirali še druge protiglivične učinkovine, med njimi

tudi kriptocin. Ta spojina ima močan učinek proti številnim rastlinskim patogenim glivam, kot je na primer *Pyricularia oryzae*, ne pa tudi na humano patogene glive (10, 15).



Spojini 3 in 4: Kriptokandin A, protiglivni peptid (levo) in kriptocin, protiglivna spojina (desno), pridobljena iz endofitske glive *C. quercina* (10).

Pestalotiopsis microspora je endofit tropskega deževnega gozda. Številni sevi te glive izdelujejo veliko različnih sekundarnih metabolitov. Ena teh je ambuinska kislina, protiglivična učinkovina. *P. microspora*, izolirana iz ogroženega drevesa *Torreya taxifolia*, proizvaja več proti glivnih učinkovin, med drugimi aromatični glikozid pestalozid in dva pirona, pestalopiron in hidroksipestalopiron. Te spojine so fitotoksične. *P. microspora*, izolirana iz *Taxus brevifolia*, izdeluje kariofilenske seskviterpene, najpomembnejša sta pestalotiopsin A in B (10, 15).



Spojina 5: Ambuinska kislina, protiglivna učinkovina (10).

Odkrivanje novih protimikrobnih metabolitov iz endofitov predstavlja pomembno alternativo pri premagovanju vse večje odpornosti rastlinskih in humanih patogenov na poznana zdravila in pri nezadostnem številu učinkovitih antibiotikov na različne vrste bakterij (19). Do sedaj so endofite najobširneje proučevali glede na njihovo sposobnost sinteze protibakterijskih, protivirusnih, protitumorih, antioksidativnih, antidiabetičnih in imunosupresivnih spojin. Pričakujemo, da bodo postali pomemben vir v proizvodnji novih naravnih bioaktivnih spojin (23).

1.4 PROTIMIKROBNE UČINKOVINE

1.4.1 Osnovne značilnosti

Antibiotiki so snovi, ki zavirajo razmnoževanje in rast mikroorganizmov, in so proizvod živih celic. Navadno jih izdelujejo glive in bakterije. Kemoterapevtiki so antimikrobna zdravila, ki so izdelana s sintezo ali s kemijsko modifikacijo naravnega antibiotika (11). Meja med obema skupinama spojin je danes močno zabrisana, saj nekatere antibiotike že lahko sintetiziramo s kemičnimi postopki. Pri obeh skupinah gre za spojine, ki uničujejo bakterije, viruse, glive in zajedavce (25). Zato je za antibiotike in kemoterapevtike primeren izraz protimikrobne učinkovine. Te lahko opredelimo kot naravne (antibiotiki), polysintezne in sintezne. Učinkovine se med seboj zelo razlikujejo v fizikalnih, kemijskih in farmakoloških lastnostih, v spektru mikrobov, proti katerim delujejo, in v mehanizmu delovanja (1).

Protimikrobne učinkovine imajo v bakterijski celici različna ciljna mesta. Glede na mehanizem delovanja razlikujemo 4 vrste protimikrobnih učinkovin, in sicer takšne, ki:

- preprečujejo sintezo celične stene: glikopeptidi, bacitracin, betalaktami (cefalosporini, penicilini, karbapenemi, monobaktami),
- delujejo na sintezo beljakovin: aminoglikozidi, tetraciklini, kloramfenikol, makrolidi, linkozamidi, fucidinska kislina,
- vplivajo na sintezo jedrnih kislin: kinoloni (inhibirajo DNA girazo in topoizomerozo IV), sulfonamidi (inhibirajo dihidropteroat sintetazo), trimetoprim (inhibira dihidrofolat reduktazo), rifampicin (inhibira bakterijsko od DNK odvisno RNK polimerazo),
- ovirajo dejavnosti povezane s citoplazemsko membrano: polimiksini, amfotericin, nistatin, imidazol (26).

Glede na to, na katere organizme delujejo, učinkovine razdelimo v:

- protibakterijske učinkovine,
- protivirusne učinkovine,
- protiglivne učinkovine,
- antiprotozoike,
- antihelmintike.

Ta delitev ni najboljša, saj so nekatere spojine učinkovite znotraj več skupin. (1)

Po učinkih na bakterije so protimikrobne učinkovine baktericidne in bakteriostatične. Baktericidne spojine poškodujejo mikroorganizem tako, da se ni več zmožen razmnoževati, medtem ko bakteriostatične razmnoževanje samo zavrejo (26). Razvrstitev na bakteriostatične in baktericidne učinkovine ni preveč dobra, saj sta omenjena učinka odvisna od koncentracije učinkovine, časa, razmer pri inkubaciji in bakterijskega seva (1).

Protibakterijske učinkovine razvrščamo glede na kemijsko strukturo v naslednje skupine:

- sulfonamide
- kloramfenikol
- ostale
- pirimidine
- makrolide
- učinkovine z
- kinolone
- piranozide
- različnimi
- betalaktame
- polimiksine
- strukturami (1).
- aminoglikozide
- glikopeptide
- tetracikline
- polipeptide

1.4.2 Bakterijska rezistenca

Po 60 letih uporabe antibiotikov nekateri od njih niso več primerni za zdravljenje bakterijskih okužb. Bakterije so zaradi izpostavljenosti naravnim, polysinteznim in sinteznim spojinam razvile mehanizme za izogitev njihovim inhibitornim učinkom. Rezistenca je neizogiben odgovor evolucije na uporabo protimikrobnih učinkovin. Že v prvih letih uporabe penicilina se je tako pojavil velik delež rezistentnih sevov *Staphylococcus aureus*, temu pa so sledile številne vrste bakterij, ki so zaradi uporabe novih antibiotikov postale multirezistentne (1). Okužbe z bakterijskimi sevi, ki so odporni proti več različnim antibiotikom, so danes resen zdravstveni problem. To so zlasti okužbe z MRSA (na meticilin odporni in multirezistentni sevi *Staphylococcus aureus*), s sevi stafilokokov z zmanjšano občutljivostjo za glikopeptide, z VRE (na vankomicin neobcutljivi sevi enterokokov), s proti penicilinu odpornimi pnevmokoki in s po Gramu negativnimi bacili, ki so odporni proti vsem aminoglikozidom (1, 27).

O naravni (intrinzični) odpornosti bakterij proti antibiotikom govorimo, kadar je vsa bakterijska vrsta odporna proti neki skupini antibiotikov. Posamezne bakterijske vrste ali rodovi so naravno odporni proti nekaterim antibiotikom, če nimajo tarčnih mest, na katera antibiotiki delujejo oz. imajo značilno sestavo celične stene, katera preprečuje

antibiotikom prodor do tarčnega mesta njihovega delovanja. Tako so vse bakterije rodu *Mycoplasma* naravno odporne proti penicilinskim antibiotikom, ker nimajo celične stene, ki je osnovna tarča delovanja teh antibiotikov. Sulfonamidi ne morejo delovati na bakterijske vrste, kot so enterokoki in laktobacili, ki jemljejo folno kislino iz okolja in je ne sintetizirajo same. Vse bakterije so naravno odporne proti polienskim antibiotikom (npr. amfotericin B), ker ne vsebujejo sterolov v citoplazemski membrani (27).

Pridobljeno odpornost bakterij proti antibiotikom imajo v nasprotju z naravno samo posamezni sevi neke bakterijske vrste ali rodu. Lahko je posledica mutacije kromosomskega ali plazmidnega gena posamezne bakterijske celice ali pridobitve nove genetske informacije z genskim prenosom iz druge bakterijske celice predvsem s konjugacijo, transformacijo ali transdukcijo (1, 27).

Poznamo 5 osnovnih mehanizmov bakterijske odpornosti proti antibiotikom:

- sprememba tarčnega mesta oz. prijemališča antibiotika (npr. sprememba penicilin vežočih beljakovin – PBP);
- encimska razgradnja antibiotika (npr. hidroliza betalaktamskih antibiotikov z beta laktamazami);
- neprepustnost oz. zmanjšana prepustnost celične membrane za antibiotik;
- sprememba presnovne poti, na katero deluje antibiotik (npr. preprečena sinteza timina v bakterijski celici povzroči odpornost proti sulfonamidom in trimetoprimu);
- aktivno izčrpavanje antibiotika iz bakterijske celice z aktivnim prenosom (npr. odpornost po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij proti tetraciklinom) (27).

Rezistenca na protimikrobne učinkovine se posebej 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 (1).

Navidezna bakterijska odpornost proti antibiotikom se lahko pojavi zaradi nenavadne presnove posameznega antibiotika pri nekaterih bolnikih. Obstaja nekaj primerov neuspešnega zdravljenja sifilisa s sicer ustreznimi odmerki penicilina, ker so nekateri bolniki presnavljali oz. izločali penicilin veliko hitreje kot drugi (27).

Najučinkovitejši ukrepi za preprečevanje širjenja bakterijskih sevov, odpornih proti antibiotikom so:

- dosledno preprečevanje nepravilne, neustrezne in nekritične uporabe antibiotikov,

- dober nadzor nad pojavljanjem odpornih sevov,
- nadzor okužb v bolnišnicah (27).

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 (1).

1.4.3 *In vitro* preizkušanje protimikrobnih učinkovin

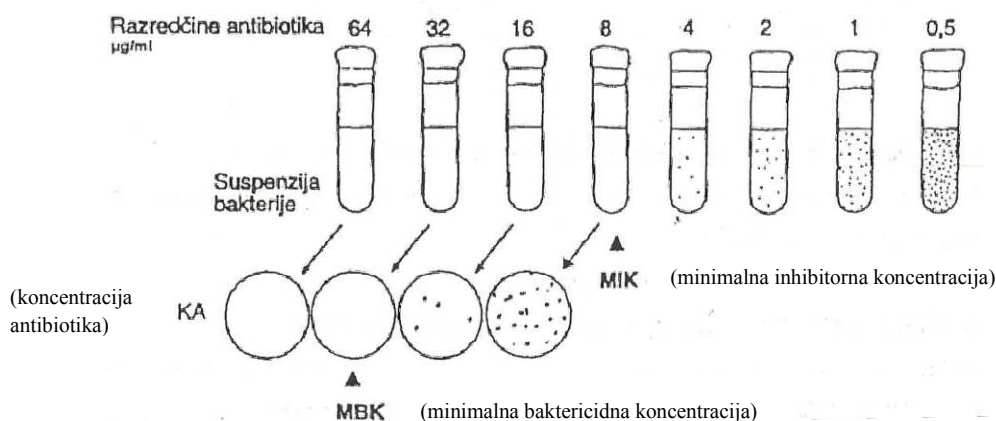
Postopek določanja občutljivosti za, ali odpornost mikroorganizmom proti antimikrobnim učinkovinam, imenujemo antibiogram (kadar je mikroorganizem bakterija). Antibiogram delamo vedno, kadar izoliramo klinično pomembno bakterijo iz različnih kliničnih vzorcev, z namenom ustreznega zdravljenja bolnikov (28).

Poznamo različne načine določanja občutljivosti mikroorganizmov za antimikrobne učinkovine. Da bi bili rezultati med posameznimi laboratoriji primerljivi, je potrebno, da postopke izvedemo po določenih mednarodnih pravilih. Poznamo mednarodne standarde, po katerih izvajamo teste tudi v Sloveniji. Ti natančno določajo načine izvedbe testov za določanje občutljivosti in kriterije za interpretacijo rezultatov za posamezne vrste bakterij (28).

Posamezni bakterijski sevi so različno občutljivi na protimikrobne učinkovine, zato so podatki, ki jih dobimo pri preizkušanju protimikrobnih učinkovin *in vitro*, zelo pomembni pri terapiji in iskanju novih protimikrobnih učinkovin. Za preizkušanje občutljivosti največkrat uporabljamo disk difuzijski, agar dilucijski in bujon dilucijski test (1).

Disk difuzijski test uporabljamo za kvalitativno ali semikvantitativno oceno občutljivosti določenega bakterijskega seva na protimikrobne učinkovine (1). To je preprosta in hitra metoda za določanje občutljivosti za antibiotike. Uporablja se pri hitro rastočih bakterijah (28). Pri tem testu merimo premer inhibicijskega območja okoli diska, prepojenega z raztopino učinkovine, po inkubaciji na agarju, ki je premazan s suspenzijo izbranega bakterijskega seva (1). Inhibicijsko območje nastane kot posledica difundiranja antibiotika iz diska v gojišče, ta pa zavre razmnoževanje na antibiotik občutljivih bakterij (28).

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), najmanjša koncentracija antibiotika, ki povzroči uničenje mikroorganizmov pa je minimalna baktericidna koncentracija (MBK). Bujon dilucijsko metodo je možno tudi avtomatizirati, pri čemer motnost gojišča ovrednotimo denzitometrično (1).



Slika 4: Metoda določanja minimalne inhibitorne in minimalne baktericidne koncentracije antibiotika (9).

Bujon dilucijski test je možno izvesti tudi v majhnem merilu z volumnom inkubacijske zmesi okoli 100 µL. Temu testu pravimo tudi mikrodilucijski test in je standardna referenčna metoda za preizkušanje občutljivosti aerobnih bakterij na protimikrobne učinkovine. S to metodo lahko kvantitativno opredelimo *in vitro* učinkovitost spojine na izbranem bakterijskem sev. 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, tako za preizkušanje naravnih kot plosinteznih in sinteznih učinkovin (1).

2 NAMEN DELA

Namen našega diplomskega dela bo ovrednotiti morebitno protibakterijsko učinkovitost izvlečkov endofitskih gliv pridobljenih iz iglic različnih iglavcev. Izvedli bomo naslednje dejavnosti:

- racionalno bomo izbrali primerne vzorce iglavcev, ki bodo vsebovali endofitske glive,
- rastline bomo identificirali, jim določili lokacijo, rastlinske vzorce bomo pravilno shranili do naslednje obdelave,
- po obdelavi rastlinskega materiala bomo endofitske glive kultivirali na primernem gojišču,
- glive bomo precepljali, da bomo dobili čim bolj čisto kulturo,
- na osnovi izgleda endofitskih kultur na trdem gojišču bomo poskušali ugotoviti krajevno ali vrstno odvisnost iglavcev za okužbo s posameznim endofitom,
- pripravili bomo trajne kulture in jih primerno shranili za morebiten ponovni odvzem in gojenje,
- pripravili bomo izvlečke gliv v treh po polarnosti različnih topilih,
- bakterije *Escherichia coli* ER2738 bomo nacepili na sterilno LB-gojišče, z mikrodilucijskim testom bomo določili protibakterijski učinek izvlečkov pripravljenih z različnimi topili in bioaktivnim izvlečkom kvalitativno določili jakost protibakterijskega delovanja.

3 MATERIALI IN METODE**3.1 REAGENTI**

reagenti	izdelovalec
krompirjev izvleček z glukozo (PDB)	Carl Roth Karlsruhe, Nemčija
96 % etanol (p.a.)	KEFO d.o.o., Ljubljana, Slovenija
tekoči parafin, Ph. Eur.	Sušnik, Ljubljana, Slovenija
metanol (p.a.); etilacetat (p.a.)	J.T.Baker, Deventer, Nizozemska
diklorometan (p.a.)	Carlo Erba reagenti, Rodano, Italija
Luria-Bertani agar	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
natrijev klorid	Scharlau chemie S.A., Barcelona, Španija
Tween [®] 80; ampicilin, natrijeva sol	Fluka, Buchs, Švica
Mueller-Hinton bujon	Merck, Darmstadt, Nemčija

70 % etanol: 96 % etanol..... 67 g

prečiščena voda..... 33 g

50 % metanol: metanol..... 500 mL

prečiščena voda.....do 1000 mL (v merilni bučki)

3.2 LABORATORIJSKI PRIBOR IN MATERIAL

material	izdelovalec
stekleničke (volumen 500 mL); stekleničke (volumen 100 mL)	Schott, Mainz, Nemčija
petrijevke Ø = 90 × 20 mm; plastične epruvete z volumnom 50 mL, samostoječa oblika; plastične epruvete 15 mL, konusna oblika; mikrotitrne ploščice z okroglim dnom	TPP, Trasadingen, Švica
parafilm	Pechiney plastic Packaging Company, Menadha, WI, ZDA
sterilne plastične eze za enkratno uporabo	Copan Italia S.p.A., Brescia, Italija
avtomatske pipete	Biohit, Helsinki, Finska

3.3 GOJIŠČA

Trdno gojišče s krompirjevim izvlečkom in glukozo (PDA):

suha mešanica.....39 g	sestava suhe mešanice (g): krompirjev izvleček.....4,0
prečiščena voda.....do 1000 g	glukoza.....20,0
	agar.....15,0

Luria-Bertani trdno gojišče (LBA):

suha mešanica..... 35 g	sestava suhe mešanice (g): tripton.....10,0
prečiščena voda.....do 1000 g	kvasni izvleček.....5,0
	natrijev klorid.....5,0
	agar.....15,0

Mueller-Hinton bujon:

suha mešanica.....21 g	sestava suhe mešanice (g): mesni izvleček.....2,0
prečiščena voda.....do 1000 g	kazeinski hidrolizat.....17,5
	škrob.....1,5

3.4 BIOLOŠKI MATERIAL

Bakterije:

Escherichia coli, sev ER2738, dobljena iz trajnih kultur na Katedri za farmacevsko biologijo na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

Glive:

Vzorci endofitskih gliv smo dobili iz iglavcev nabranih v botaničnem vrtu v Mariboru (N: 46°30'15", E: 015°37'25", n.v.: 342 m) in botaničnem vrtu v Ljubljani (N: 46°02'23", E: 014°30'49", n.v.: 292 m) dne 30.6.2010. Nabrani rastlinski del je bila v vseh primerih iglica.

Preglednica II: Oštevilčenje posameznih rastlin, ki smo jih vzorčili.

številka vzorca	gostiteljska rastlina
2	<i>Pinus nigra</i> Arnold - črni bor <i>Pinaceae</i> - borovke
3	<i>Cedrus libani</i> Glauca - sivomodra atlaška cedra <i>Pinaceae</i> - borovke
4	<i>Abies alba</i> Mill. - bela/navadna jelka <i>Pinaceae</i> - borovke
5	<i>Picea pungens</i> Koster - bodeča smreka, srebrni kultivar <i>Pinaceae</i> - borovke
6	<i>Picea orientalis</i> (L.) Link - zlata kavkaška smreka <i>Aureospicata</i> <i>Pinaceae</i> - borovke
7	<i>Picea mariana</i> - črna smreka, srebrnikast kultivar <i>Argentovariegata</i> <i>Pinaceae</i> - borovke
8	<i>Picea abies</i> - navadna smreka, stebrast kultivar <i>Cupressina</i> <i>Pinaceae</i> - borovke
9	<i>Abies pinsapo</i> Boiss. - španska jelka <i>Pinaceae</i> - borovke
10	<i>Abies cephalonica</i> Loud. - grška jelka <i>Pinaceae</i> - borovke
11	<i>Abies lasiocarpa</i> Glauca - skalna jelka, srebrnosiv kultivar <i>Pinaceae</i> - borovke
12	<i>Abies procera</i> Glauca - žlahtna jelka, srebrnosiv kultivar <i>Pinaceae</i> - borovke
13	<i>Abies nordmanniana</i> (Stev.) Spach - kavkaška jelka <i>Pinaceae</i> - borovke
14	<i>Abies koreana</i> - korejska jelka, srebrnikasto vabljev kultivar Silberlocke <i>Pinaceae</i> - borovke
15	<i>Abies concolor</i> (Gord. et Gleud.) Lindl. ex. Hildebr - koloradska jelka <i>Pinaceae</i> - borovke

Preglednica II: ...nadaljevanje s prejšnje strani.

16	<i>Abies grandis</i> (Dougl. ex D. Don) Lindl. velika/obalna/kalifornijska jelka <i>Pinaceae</i> - borovke
17	<i>Pseudotsuga menziesii</i> (Mirb.) Franco - duglazija <i>Pinaceae</i> - borovke
18	<i>Tsuga canadensis</i> (L.) Carr. - kanadska čuga <i>Pinaceae</i> - borovke
19	<i>Larix gmelinii</i> (Rupr.) Kuzen. Var. <i>olgensis</i> Henry - vzhodno sibirski macesen <i>Pinaceae</i> - borovke
20	<i>Cryptomeria japonica</i> - japonska kriptomerija, kultivar Elegans <i>Taxodiaceae</i> - taksodijevke
21	<i>Taxodium distichum</i> (L.) L. C. Rich - dvoredna močvirska cipresa/dvoredni taksodij <i>Taxodiaceae</i> - taksodijevke
22	<i>Metasequoia glyptostroboides</i> Hu et Cheng - metasekvoja <i>Taxodiaceae</i> - taksodijevke
23	<i>Sciadopitys verticillata</i> (L.) (Thunb.) Sieb. et. Zucc. - vretenčasti senčnik/japonska dežnikasta jelka <i>Sciadopityaceae</i> - senčnikovke
24	<i>Sequoia sempervirens</i> (D. Don) Endl. - obalna sekvoja <i>Taxodiaceae</i> - taksodijevke
25	<i>Cunninghamia lanceolata</i> (Lamb.) Hook - suličevka/kitajska jelka <i>Taxodiaceae</i> - taksodijevke
26	<i>Pinus mugo</i> Turra - rušje <i>Pinaceae</i> - borovke
27	<i>Cephalotaxus harringtonia</i> - Harringtonova patisa/stebrast kultivar Fastigiata <i>Cephalotaxaceae</i> - patisovke
28	<i>Taxus baccata</i> (L.) - tisa <i>Taxaceae</i> - tisovke

Preglednica II: ...nadaljevanje s prejšnje strani.

29	<i>Cedrus libani</i> A. Rich. - libanonska cedra <i>Pinaceae</i> - borovke
30	<i>Cedrus deodara</i> (D. Don) G. Don. - himalajska cedra <i>Pinaceae</i> - borovke
32	<i>Pinus parviflora</i> - japonski beli bor, kultivar Negishi <i>Pinaceae</i> - borovke
33	<i>Pinus jeffreyi</i> Grev. et Balf. ex. A. Murr. - Jeffreyev bor <i>Pinaceae</i> - borovke
34	<i>Pinus ponderosa</i> Dougl. ex. Laus. - rumeni bor <i>Pinaceae</i> - borovke
35	<i>Pinus leucodermis</i> Ant. - munika <i>Pinaceae</i> - borovke
36	<i>Pinus sylvestris</i> L. - rdeči bor <i>Pinaceae</i> - borovke
37	<i>Pinus pinea</i> L. - pinija <i>Pinaceae</i> - borovke
38	<i>Pinus sylvestris</i> - rdeči bor, pritlikavi kultivar, Watereri <i>Pinaceae</i> - borovke
39	<i>Pinus sylvestris</i> - rdeči bor, stebrasti kultivar, Fastigiata <i>Pinaceae</i> - borovke
40	<i>Pinus halepensis</i> Mill. - alpski bor <i>Pinaceae</i> - borovke
41	<i>Pinus cembra</i> - cemprin, jedrnat, čvrsti kultivar, Compacta <i>Pinaceae</i> - borovke
42	<i>Pinus wallichiana</i> »Densa Hill.« - himalajski bor, kultivar <i>Pinaceae</i> - borovke
43	<i>Picea glehnii</i> (Fr. Schmidt) Mast. - sahalinska smreka <i>Pinaceae</i> - borovke
44	<i>Picea omorika</i> (Panč.) Purk. - omorika/Pančičeva smreka <i>Pinaceae</i> - borovke

Preglednica II: ...nadaljevanje s prejšnje strani.

45	<i>Picea engelmannii</i> (Glauca) - Engelmannova smreka, sivomodrozelen kultivar <i>Pinaceae</i> - borovke
46	<i>Juniperus squamata</i> Buch. - Ham. ex. D. Don. »Blue star« - luskasti modrozeleni brin, srebrnomodri kultivar <i>Cupressaceae</i> - cipresovke
47	<i>Podocarpus lawrencei</i> Hook. f. (<i>Podocarpus alpinus</i> R. Br. ex. Hook. f.) »Blue gem« - tasmanski alpski podokarp, kultivar <i>Podocarpaceae</i> - podokarpovke
48	<i>Abies balsamea</i> (L. Mill. »Nana« - balzamasto dišeča jelka, pritlikavi kultivar <i>Pinaceae</i> - borovke
49	<i>Picea glauca</i> (Moench) Voss., »Alberta Globe« - bela smreka, okrogel pritlikavi kultivar <i>Pinaceae</i> - borovke
50	<i>Tsuga canadensis</i> (L.) Carriere - kanadska čuga <i>Pinaceae</i> - borovke
51	<i>Pinus mugo</i> Turra - rušje <i>Pinaceae</i> - borovke
52	<i>Taxus cuspidata</i> Sieb. & Succ. - japonska tisa <i>Taxaceae</i> - tisovke
53	<i>Picea abies</i> (L.) Karsten - navadna smreka <i>Pinaceae</i> - borovke
54	<i>Abies alba</i> Mill.- bela jelka <i>Pinaceae</i> - borovke
55	<i>Abies cephalonica</i> Loud. - grška jelka <i>Pinaceae</i> - borovke
56	<i>Sequoia sempervirens</i> (D. Don) Endl. - obalna sekvoja <i>Taxodiaceae</i> - taksodijevke
57	<i>Cryptomeria japonica</i> D. Don - japonska srpovka <i>Taxodiaceae</i> - taksodijevke

Preglednica II: ...nadaljevanje s prejšnje strani.

58	<i>Abies koreana</i> Wils. - korejska jelka <i>Pinaceae</i> - borovke
59	<i>Cephalotaxus harringtonia</i> (Forbes) K. Koch var. <i>drupacea</i> (Sieb. & Zucc.) Koidz. - tisovnik <i>Cephalotaxaceae</i> - patisovke
60	<i>Taxus baccata</i> L. - tisa <i>Taxaceae</i> - tisovke
61	<i>Metasequoia glyptostroboides</i> Hu & Cheng - metasekvoja <i>Taxodiaceae</i> - taksodijevke
62	<i>Pinus wallichiana</i> A. B. Jackson - himalajski bor <i>Pinaceae</i> - borovke
63	<i>Abies normanniana</i> (Steven) Spach - kavkaška jelka <i>Pinaceae</i> - borovke
64	<i>Picea obovata</i> Ledeb. - sibirski smreka <i>Pinaceae</i> - borovke
65	<i>Cedrus atlantica</i> (Endl.) Carr. - atlaška cedra <i>Pinaceae</i> - borovke
66	<i>Pinus nigra</i> Arnold - črni bor <i>Pinaceae</i> - borovke
67	<i>Picea omorika</i> (Pančić) Purkyne - omorika/Pančičeva smreka <i>Pinaceae</i> - borovke
68	<i>Sequoiadendron giganteum</i> (Lindley) Buchholz - orjaška sekvoja/mamutovec <i>Taxodiaceae</i> - taksodijevke

3.5 APARATURE

aparatura	izdelovalec
analizna tehtnica KERN ALS 120-4	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Nemčija
tehtnica PC 2000	Mettler, Greifensee, Švica
hladilnik, 4°C	Liebherr, Nemčija
avtoklav 2540 EL	Systec, Wetttemberg, Nemčija
LAF komora PIO LFVP 12; ultrazvočna kadička SONIS 3	Iskra PIO d.o.o., Šentjernej, Slovenija
homogenizator	IKA, Staufen, Nemčija
vakuumski rotacijski uparjalnik, rotavapor R-200	Büchi, Flawil, Švica
zamrzovalnik, -23 °C	Gorenje, Velenje, Slovenija
plinski gorilnik Labogaz 206	Campingaz, Saint Genis Laval, Francija
UV/VIS spektrofotometer Lambda 20	Perkin - Elmer, Wellesley, ZDA

3.6 MIKRODILUCIJSKI TEST

Mikrodilucijski test smo naredili v skladu s smernicami nacionalnega komiteja za klinične laboratorijske standarde (NCCLS) (3).

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 NABIRANJE IN SHRANJEVANJE VZORCEV

Odločili smo se, da vzorce dobimo iz dveh različnih območij. S tem namenom smo obiskali Botanični vrt Univerze v Mariboru v Pivoli pri Hočah ter Botanični vrt Univerze v Ljubljani. Vzorčili smo iglavce. Za vzorec smo izbrali le en del drevesa, in sicer iglico. Izbrane rastline smo identificirali, jim določili lokacijo ter vsaki s pinceto odvzeli nekaj iglic. Te so predstavljale vzorce za naše nadaljnje raziskave.

Rastlinski del smo nato shranili v označenih hermetično zaprtih plastičnih epruveh. Ob povratku na fakulteto smo le te postavili v hladilnik na 4°C in jih tam pustili teden dni, dokler nismo začeli s postopki izolacije endofitov.

4.2 IZOLACIJA ENDOFITOV

Pripravili smo 75 trdnih gojišč s krompirjevim izvlečkom in glukozo (PDA). Gojišče v prahu smo suspendirali v ustrezni količini prečiščene vode. Tako smo dobili 1500 mL gojišča, ki smo ga v 2 steklenicah avtoklavirali 20 minut pri 121°C in nadtlaku vodne pare 1 bar.

Medtem smo v sterilno komoro z laminarnim pretokom zraka prinesli 75 petrijev. Te smo pred postavitvijo v LAF komoro razkužili s 70 % EtOH ter jih za 30 minut izpostavili UV svetlobi.

Po zaključeni sterilizaciji gojišča, smo raztopino prenesli v sterilno komoro z laminarnim pretokom zraka. Pustili smo, da se je tu ohladila na 80°C. Ohlajeno raztopino smo vlili v petrijevke premera 90 mm, v vsako po približno 20 g. Počakali smo, da se je gojišče v zaprtih petrijevkah strdilo, nato pa smo jih ovili s parafilmom. Petrijevke z gojiščem smo 3 dni pustili na sobni temperaturi v komori za gojenje gliv na pladnju premazanem z vazelinom za zaščito pred pršicami in s posodo z vodo za vzdrževanje vlažnosti.

Po treh dneh smo pregledali gojišča ter tako preverili, ali ni kakšno od njih morebiti okuženo z bakterijami. Neokužene petrijevke z gojišči smo pol ure sterilizirali pod UV lučko v sterilni komori.

V avtoklav smo dali pribor, ki smo ga uporabili pri postopku izolacije. Vzorce iglic smo iz hladilnika prenesli v sterilno komoro. Po eno iglico iz vsakega vzorca smo s pinceto vzeli iz epruvete, jo temeljito očistili s 70 % EtOH in jo na sterilni gazi osušili. Nato smo vzeli sterilni nožek in iglico poševno zarezali. Nožek smo vsakič pred rezanjem nove iglice obrisali s sterilno gazo prepojeno s 70 % etanolom. Rezali smo tako, da je bila površina notranjosti iglice čim večja. Iglico smo položili na gojišče tako, da se je z zarezano površino dotikala gojišča. Petrijevke z vzorci smo ovili s parafilmom ter jih odnesli v komoro za gojenje gliv na pladenj premazan z vazelinom in s posodico z vodo za vzdrževanje vlažnosti. Vseh 67 vzorcev smo pustili nekaj dni, dokler se glive niso popolnoma razrastle po gojišču.

4.3 PRECEPLJANJE GLIV

Po razrastu vzorcev smo že s prostim očesom opazili, da se na posamezni petrijevki nahaja več različnih kultur. Iz posamezne iglice smo želeli dobiti čim bolj čisto kulturo, zato smo delo nadaljevali s precepljanjem.

Pripravili smo 155 trdnih gojišč s krompirjevim izvlečkom in glukozo (PDA). Gojišče v prahu smo suspendirali v ustrezni količini prečiščene vode. Tako smo dobili 3100 mL gojišča, ki smo ga v 4 steklenicah avtoklavirali 20 minut pri 121°C in nadtlaku vodne pare 1 bar. Medtem smo v sterilno komoro z laminarnim pretokom zraka prinesli 155 petrijevk, ki smo jih predhodno razkužili s 70 % EtOH in jih 30 min pustili pod UV lučjo. Po zaključeni sterilizaciji smo raztopino prenesli v sterilno komoro z laminarnim pretokom zraka. Pustili smo, da se je tu ohladila na 80°C. Raztopino smo vlili v petrijevke premera 90 mm, v vsako približno 20 g gojišča. Počakali smo, da se je gojišče v zaprtih petrijevkah strdilo, nato smo jih ovili s parafilmom. Petrijevke z gojiščem smo 3 dni pustili pri sobni temperaturi v komori za gojenje gliv na pladnju premazanem z vazelinom za zaščito pred pršicami in s posodo z vodo za vzdrževanje vlažnosti.

Po treh dneh smo pregledali gojišča ter tako preverili, ali ni kakšno od njih morebiti okuženo z bakterijami. Neokužene petrijevke z gojišči smo pol ure sterilizirali pod UV lučko v sterilni komori. S sterilno mikrobiološko zanko (ezo) smo na gojišča precepili micelije naslednjih vzorcev gliv: 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 42, 49, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64,

65, 66, 67, 68. S sterilno plastično zanko smo odrezali košček glive skupaj z gojiščem v velikosti 0,5 cm × 0,5 cm. Pomembno je bilo, da smo košček glive odvezli na robu razraslega micelija. Delali smo tako, da smo za vsako novo vrsto glive vzeli novo sterilno zanko. Petrijevke z glivami smo ponovno ovili s parafilomom, jih odnesli v komoro za gojenje gliv ter jih tam pustili toliko časa, dokler se glive niso razrasle. Z glivami prerasle petrijevke smo primerjali med seboj.

4.4 PRIPRAVA TRAJNIH KULTUR

Pripravili smo 1000 mL gojišča s krompirjevim izvlečkom in glukozo. Suspenzijo smo nato avtoklavirali 20 minut pri 121°C in nadtlaku vodne pare 1 bar. Nato smo raztopino ohladili na 80°C. V sterilne, 50 mL plastične samostoječe epruvete, ki smo jih predhodno razkužili z 70 % etanolom in izpostavili UV lučki v LAF komori, smo nalili po 20 mL agarja. Epruvete smo nato zaprli z zamaškom ter jih postavili pod kotom 30°. V tem položaju smo jih pustili, dokler se ni gojišče popolnoma strdilo. Pripravljena poševna gojišča smo odnesli v komoro za gojenje gliv, kjer smo jih pustili 3 dni.

Po preteklem času smo gojišča pregledali, da bi ugotovili, če niso morebiti okužena z bakterijami. Neokužena poševna gojišča smo 30 min sterilizirali pod UV svetlobo v LAF komori. Na poševna gojišča smo s sterilno zanko precepili micelije gliv. Tudi tokrat smo vzorec odvezli iz roba preraslega gojišča. Za vsako vrsto glive smo vzeli novo sterilno zanko. Epruvete smo po precepitvi rahlo zaprli z zamaškom ter jih postavili v komoro za gojenje gliv na pladenj premazan z vazelinom in posodico z vodo za vzdrževanje vlažnosti.

Ko so glive prerasle poševna gojišča, smo jih odnesli v LAF komoro ter vsako gojišče z glivo prelili z 10 mL tekočega parafina. Slednjega smo predhodno dvakrat zapored sterilizirali 20 minut pri 121°C in nadtlaku 1 bar ter ga pred zlitjem v epruveto ohladili na sobno temperaturo. Epruvete smo rahlo zaprli z zamaški in jih shranili v hladni sobi na temperaturi 4-6°C.

4.5 PRIPRAVA IZVLEČKOV ENDOFITSKIH GLIV

Ko so glive prerasle gojišča v eprugetah, smo naredili njihove izvlečke s tremi različnimi topili: polarnim metanolom, manj polarnim etilacetatom in najmanj polarnim diklorometanom.

Gojišče, preraslo z glivo, smo homogenizirali z električnim homogenizatorjem, tako da smo dobili velikost delcev približno 5 mm. Nastalo homogeno zmes smo s spatulo prenesli v elenmajerico z brusom. V digestoriju smo ji prilili še 70 mL ustreznega topila ter jo zaprli s steklenim zamaškom. Vsako kulturo gliv smo tako macerirali v vseh topilih: v metanolu, v etilacetatu in v diklorometanu. Homogenizirana gojišča z micelijem smo macerirali pri sobni temperaturi po 15 minut v ultrazvočni kadički, nato 24 ur brez ultrazvoka in zatem še 15 minut v ultrazvočni kadički. Zmes smo nato filtrirali skozi naguban filtrirni papir in preostanek na papirju sprali še trikrat s po 10 mL ustreznega topila.

Filtrat smo prelili v predhodno stehtano stekleno bučko. Topilo smo iz bučke odstranili s pomočjo vakuumskega rotacijskega uparjalnika pri temperaturi 40°C in ustreznem tlaku do suhega ostanka. Bučko smo temeljito obrisali s papirjem, jo osušili s sušilcem ter počakali, da se je ohladila na sobno temperaturo. Bučko z izvlečkom smo stehtali. Razlika med polno in prazno bučko nam je podala količino dobljenega izvlečka. Izvleček smo raztopili v 50 % metanolu, tako da smo dobili koncentracijo 1 mg/mL. Pri raztapljanju smo si pomagali z ultrazvočno kadičko. Raztopine izvlečkov smo nato v zaprtih plastičnih epruveh shranili v zamrzovalniku na -23°C. Vzorci so počakali do določevanja njihove antibakterijske aktivnosti.

4.6 NACEPITEV BAKTERIJE *Escherichia coli* NA LURIA BERTANI GOJIŠČE

17,5 g LB-agarja smo suspendirali v 500 mL prečiščene vode in suspenzijo sterilizirali 20 minut pri 121°C in nadtlaču vodne pare 1 bar. Raztopino smo ohladili na 80°C in jo v sterilni komori nalili po približno 20 mL v 15 sterilnih petrijevkih premera 90 mm. Počakali smo, da se je gojišče strdilo. Zaprte petrijevke smo ovili s parafilmom ter jih do uporabe hranili v hladilniku na 4°C. Petrijevke smo obrnili tako, da je bilo gojišče obrnjeno navzgor.

Na sterilno LB-gojišče smo nacepili bakterije *Escherichia coli* ER2738, ki smo jih vzeli iz ene kolonije. Pri tem smo uporabili sterilno zanko in gorilnik. Petrijevke smo ponovno ovili s parafilmom, jih postavili v termostat tako, da je bilo gojišče na vrhu. Gojišča z bakterijami smo inkubirali v termostatski komori 24 ur pri 37°C.

4.7 MIKRODILUCIJSKI TEST - preizkušanje protibakterijskega učinka izvlečkov trdnega gojišča z micelijem, pripravljenih s tremi po polarnosti različnimi topili

Pripravili smo vse potrebne tekočine, ki smo jih uporabili pri izvedbi mikrodilucijskega testa.

Sterilno raztopino 0,9 % NaCl smo naredili tako, da smo 1440 mg NaCl raztopili v 160 mL prečiščene vode ter raztopino sterilizirali 20 minut pri 121°C in nadtlaku vodne pare 1 bar.

50 mL sterilne raztopine Tween® 80 smo pripravili s sterilno filtracijo 10µL Tween® 80 v 50 mL prečiščene vode.

Mueller-Hinton bujon smo pripravili tako, da smo suspendirali 1680 mg suhe mešanice v 80 mL vode ter to sterilizirali 20 minut pri 121°C in nadtlaku vodne pare 1 bar.

Raztopino kontrolnega antibiotika s koncentracijo 1 mg/mL smo pripravili tako, da smo že pripravljeno osnovno raztopino natrijeve soli ampicilina s koncentracijo 50 mg/mL redčili s 50 % (V/V) metanolom. Pri tem smo vzeli 20 µL osnovne raztopine antibiotika in jo redčili s 1000 µL 50 % (V/V) metanola. Do uporabe smo ga shranili pri -23°C.

Bakterije smo iz ene sveže zrasle kolonije s sterilno zanko prenesli in suspendirali v 10 mL sterilne 0,9 % raztopine natrijevega klorida. Nato smo nadaljevali z redčenjem z 0,9 % NaCl tako, da je bila absorbanca suspenzije pri $\lambda=625$ nm med 0,08 in 0,1. To namreč ustreza 0,5 enote motnosti po McFarlandu. Tako pripravljena suspenzija vsebuje 10^8 bakterij CFU/mL. 800 µL te suspenzije smo nato redčili s 25 mL sterilne raztopine Tween® 80.

Mikrodilucijski test smo izvedli v mikrotitrskih ploščicah z okroglim dnom. Plošča je imela 96 vdolbin, volumen vdolbinice pa je bil 200 µL. Raztopine in suspenzije smo vanjo vnesli z mikropipetami. Test smo izvedli v dveh paralelah. Vsaka plošča je vsebovala kontrolno raztopino natrijeve soli ampicilina s koncentracijo 1 mg/mL in njene redčitve s 50 % (V/V) metanolom v razmerju 1:1, izvlečke gliv s koncentracijo 1 mg/mL, pozitivno kontrolo in negativno kontrolo.

1. MIKROTITRSKA POLŠČICA:

- **Kontrolni antibiotik A1-A12:** 1: 10 µL raztopine natrijeve soli ampicilina s koncentracijo 1 mg/mL, 2-12: redčitve s 50 % (V/V) metanolom v razmerju 1:1 + 90 µL Mueller-Hinton bujona + 10 µL suspenzije *E. coli*

- **Metanolni izvlečki B1-B12:** 10 µL izvlečka 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19 s koncentracijo 1 mg/mL + 90 µL Mueller-Hinton bujona + 10 µL suspenzije *E. coli*
- **Etilacetatni izvlečki C1-C12:** 10 µL izvlečka 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19 s koncentracijo 1 mg/mL + 90 µL Mueller-Hinton bujona + 10 µL suspenzije *E. coli*
- **Diklorometanski izvlečki D1-D12:** 10 µL izvlečka 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19 s koncentracijo 1 mg/mL + 90 µL Mueller-Hinton bujona + 10 µL suspenzije *E. coli*
- **Pozitivna kontrola E1-E12:** 10 µL 50 % (V/V) metanola + 90 µL Mueller-Hinton bujona + 10 µL suspenzije *E. coli*
- **Negativna kontrola F1-F12:** 10 µl 50 % (V/V) metanola + 90 µL Mueller-Hinton bujona

2. MIKROTITRSKA PLOŠČICA:

- **Kontrolni antibiotik A1-A12:** **1:** 10 µL raztopine natrijeve soli ampicilina s koncentracijo 1 mg/mL, **2-12:** redčitve s 50 % (V/V) metanolom v razmerju 1:1 + 90 µL Mueller-Hinton bujona + 10 µL suspenzije *E. coli*
- **Metanolni izvlečki B1-B12:** 10 µL izvlečka 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 35, 36, 38, 39 s koncentracijo 1 mg/mL + 90 µl Mueller-Hinton bujona + 10 µL suspenzije *E. coli*
- **Etilacetatni izvlečki C1-C12:** 10 µL izvlečka 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 35, 36, 38, 39 s koncentracijo 1 mg/mL + 90 µL Mueller-Hinton bujona + 10 µL suspenzije *E. coli*
- **Diklorometanski izvlečki D1-D12:** 10 µL izvlečka 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 35, 36, 38, 39 s koncentracijo 1 mg/mL + 90 µL Mueller-Hinton bujona + 10 µL suspenzije *E. coli*
- **Pozitivna kontrola E1-E12:** 10 µl 50 % (V/V) metanola + 90 µL Mueller-Hinton bujona + 10 µL suspenzije *E. coli*
- **Negativna kontrola F1-F12:** 10 µL 50 % (V/V) metanola + 90 µL Mueller-Hinton bujona

3. MIKROTITRSKA PLOŠČICA:

- **Kontrolni antibiotik A1-A12:** **1:** 10 µL raztopine natrijeve soli ampicilina s koncentracijo 1 mg/mL, **2-12:** redčitve s 50 % (V/V) metanolom v razmerju 1:1 + 90 µL Mueller-Hinton bujona + 10 µL suspenzije *E. coli*
- **Metanolni izvlečki B1-B12:** 10 µL izvlečka 40, 41, 42, 49, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 s koncentracijo 1 mg/mL + 90 µL Mueller-Hinton bujona + 10 µL suspenzije *E. coli*
- **Etilacetatni izvlečki C1-C12:** 10 µL izvlečka 40, 41, 42, 49, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 s koncentracijo 1 mg/mL + 90 µL Mueller-Hinton bujona + 10 µL suspenzije *E. coli*
- **Diklorometanski izvlečki D1-D12:** 10 µL izvlečka izvlečka 40, 41, 42, 49, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 s koncentracijo 1 mg/mL + 90 µL Mueller-Hinton bujona + 10 µL suspenzije *E. coli*
- **Pozitivna kontrola E1-E12:** 10 µL 50 % (V/V) metanola + 90 µL Mueller-Hinton bujona + 10 µL suspenzije *E. coli*
- **Negativna kontrola F1-F12:** 10 µL 50 % (V/V) metanola + 90 µL Mueller-Hinton bujona

4. MIKROTITRSKA PLOŠČICA:

- **Kontrolni antibiotik A1-A12:** **1:** 10 µL raztopine natrijeve soli ampicilina s koncentracijo 1 mg/mL, **2-12:** redčitve s 50 % (V/V) metanolom v razmerju 1:1 + 90 µL Mueller-Hinton bujona + 10 µL suspenzije *E. coli*
- **Metanolni izvlečki B1-B12:** 10 µL izvlečka 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 s koncentracijo 1 mg/mL + 90 µL Mueller-Hinton bujona + 10 µL suspenzije *E. coli*
- **Etilacetatni izvlečki C1-C12:** 10 µL izvlečka 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 s koncentracijo 1 mg/mL + 90 µL Mueller-Hinton bujona + 10 µL suspenzije *E. coli*
- **Diklorometanski izvlečki D1-D12:** 10 µL izvlečka 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 s koncentracijo 1 mg/mL + 90 µL Mueller-Hinton bujona + 10 µL suspenzije *E. coli*
- **Pozitivna kontrola E1-E12:** 10 µL 50 % (V/V) metanola + 90 µL Mueller-Hinton bujona + 10 µL suspenzije *E. coli*

- **Negativna kontrola F1-F12:** 10 μL 50 % (V/V) metanola + 90 μL Mueller-Hinton bujona

Mikrotitrne ploščice smo zaprli s samolepilno folijo ter jih postavili v termostatsko komoro, kjer smo jih inkubirali 24 ur pri 37°C. Po zaključeni inkubaciji smo jih pregledali.

4.8 MIKRODILUCIJSKI TEST - preizkušanje jakosti protibakterijskega učinka z metanolom redčenih aktivnih izvlečkov trdnega gojišča z micelijem

Mikrodilucijski test smo izvedli v mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinami z okroglim dnom in volumnom 200 μL . Raztopine in suspenzije smo vanjo vnesli z mikropipetami. Test smo izvedli v dveh paralelah. Vsaka plošča je vsebovala: kontrolno raztopino natrijeve soli ampicilina s koncentracijo 1 mg/mL in njene redčitve s 50 % (V/V) metanolom v razmerju 1:1, izvlečka s koncentracijo 1 mg/mL in njune redčitve s 50 % (V/V) metanolom v razmerju 1:1, pozitivno kontrolo in negativno kontrolo.

1. MIKROTITRSKA PLOŠČICA:

- **Kontrolni antibiotik A1-A12:** **1:** 10 μL raztopine natrijeve soli ampicilina s koncentracijo 1 mg/mL, **2-12:** redčitve s 50 % (V/V) metanolom v razmerju 1:1 + 90 μL Mueller-Hinton bujon + 10 μL suspenzije *E. coli*
- **B1-B12:** **1:** 10 μL etilacetatnega izvlečka 38 s koncentracijo 1 mg/mL **2-12:** redčitve s 50 % (V/V) metanolom v razmerju 1:1 + 90 μL Mueller-Hinton bujon + 10 μL suspenzije *E. coli*
- **C1-C12:** **1:** 10 μL diklorometanskega izvlečka 38 s koncentracijo 1 mg/mL **2-12:** redčitve s 50 % (V/V) metanolom v razmerju 1:1 + 90 μL Mueller-Hinton bujon + 10 μL suspenzije *E. coli*
- **Pozitivna kontrola D1-D12:** 10 μL 50 % (V/V) metanola + 90 μL Mueller-Hinton bujon + 10 μL suspenzije *E. coli*
- **Negativna kontrola E1-E12:** 10 μL 50 % (V/V) metanola + 90 μL Mueller-Hinton bujon

S samolepilno folijo zaprte mikrotitrne ploščice smo inkubirali 24 ur pri 37°C. Po zaključeni inkubaciji smo jih pregledali.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 NABIRANJE IN SHRANJEVANJE GLIV

Naš namen je bil izbrati rastline, ki bi vsebovale endofitske glive s protibakterijsko aktivnostjo. Prav zato je bilo pomembno odločiti se, kaj bodo naši vzorci in kje jih bomo dobili. Pri tem smo upoštevali literaturni podatek, da so resni kandidati rastline, ki rastejo na območjih z veliko biotsko raznolikostjo (13). Na podlagi tega smo se odločili, da vzorce zberemo v botaničnem vrtu v Mariboru ter botaničnem vrtu v Ljubljani. V obeh vrtovih uspevajo številne vrste iglavcev, zato smo se odločili, da bomo iz njih izolirali endofitske glive. Njihove iglice so predstavljale naše vzorce. Zbrali smo 67 vzorcev.

Vsak vzorec smo zaprli v hermetično zaprto epruveto z namenom, da plini in tekočina iz okolja ne bi prišli do njih. S tem smo tudi preprečili, da bi iglice prehitro ovenele in mikroorganizmi v njih pomrli. Shranjevanje na 4°C je prav tako pomembno. Z zadostitvijo tema dvema pogojema in hitro izolacijo (po 2 dneh) smo želeli zagotoviti, da bi glive ostale žive.

5.2 IZOLACIJA ENDOFITOV

Pripravili smo suspenzijo gojišča, katera bi zadostovala za polnjenje 75 petrijevok. Imeli pa smo le 67 vzorcev. Malo več gojišča smo sterilizirali, ker smo maso polnili približno, pa tudi zato, da bi dobili nekaj petrijevok z gojiščem več, v primeru, da bi se na katero od gojišč naselile bakterije.

Pri ohlajanju gojišča na 80°C nismo bili natančni. Gojišče smo začeli vlivati, ko se je toliko ohladilo, da smo steklenico lahko prijeli. Paziti je bilo potrebno le to, da nismo ohlajali predolgo in se agar ni začel strjevati v steklenici.

Sterilno delo, kot je čiščenje s 70 % EtOH, izpostavljanje UV svetlobi, avtoklaviranje in ovitje petrijevok s parafilmom, je pri gojenju gliv zelo pomembno. Če bi se gojišča okužila z bakterijami, bi lahko dobili napačne rezultate protibakterijske aktivnosti vzorcev. Zaradi določenih bakterij lahko nekatere glive sploh ne bi zrastle.

Rastlinski material smo v laboratoriju površinsko očistili s 70 % EtOH. S tem postopkom smo odstranili glive in druge mikroorganizme, ki živijo na površini iglic

(epifite) (10). To smo storili tako, da smo rastlinski del pomočili v alkohol in ga obrisali z gazo. Pomembno je bilo, da iglic nismo držali predolgo v 70 % etanolu, saj bi lahko uničili tudi endofite, zlasti tiste, ki oblikujejo subkutikularne strukture.

Pri samem rezanju iglice smo opazili, da so nekatere zelo trde in tanke. Zelo težko jih je bilo odrezati tako, da smo dobili dovolj veliko površino. Želeli smo, da bi bila površina zareze čim večja, saj bi tako več endofitov izpostavili gojišču. Določene iglice so bile tako mehke, da jih nismo mogli postaviti na PDA gojišče tako, da bi se z notranjostjo dotikale agarja. Z neposrednim stikom endofitskih gliv in agarja smo želeli povečati verjetnost, da bi se glive razrasle po gojišču.

Po štirih tednih smo pregledali petrijevke z agarjem in ugotovili, da so glive zrasle v 45 petrijevkah. Za gojišča, ki so ostala neporaščena, smo poizkušali poiskati nekaj možnih vzrokov: iglice so lahko bile neokužene z glivami, iglic nismo dobro odrezali oz. položili na gojišče, glivam niso ustrezali pogoji okolja, kot so temperatura, vlažnost, svetloba in sestava gojišča (nekatere glive zahtevajo zelo specifična okolja, katerim lahko zadosti le okolje določene rastline).

5.3 PRECEPLJANJE GLIV

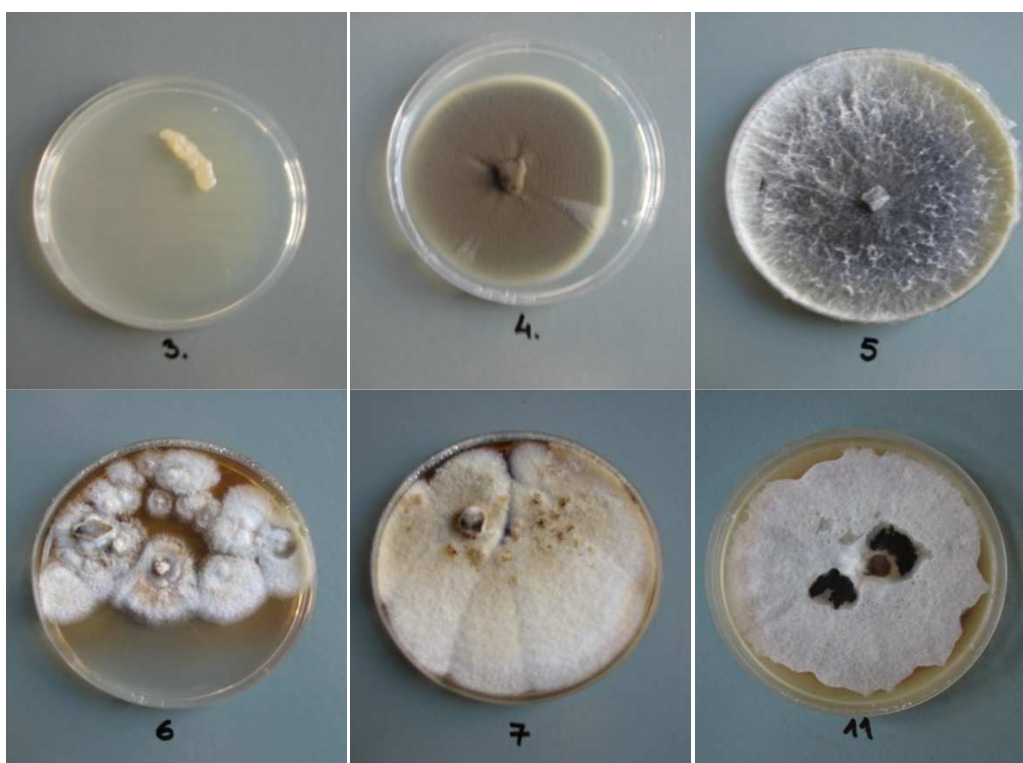
Predvidevali smo, da so glive iz iglic, ki so se razrasle po gojišču, iz različnih kultur. Pregled petrijevke nam je predvidevanja še dodatno podkrepil, saj je bilo na enem gojišču moč opaziti več kultur, ki so bile različne oblike in barve (12). Mi smo hoteli dobiti čiste kulture, zato smo se odločili, da glive precepimo na novo gojišče. Kljub temu, da smo želeli dobiti le eno kulturo iz posamezne iglice, ne moremo zagotovo vedeti, ali nam je to res uspelo. Bolj gotovi bi bili, če bi precepitev izvedli večkrat.

Glive iz ene iglice smo precepili na tri gojišča. To je bilo potrebno, ker smo v nadaljevanju našega dela želeli narediti izvlečke trdnih gojišč z micelijem v treh različnih topilih.

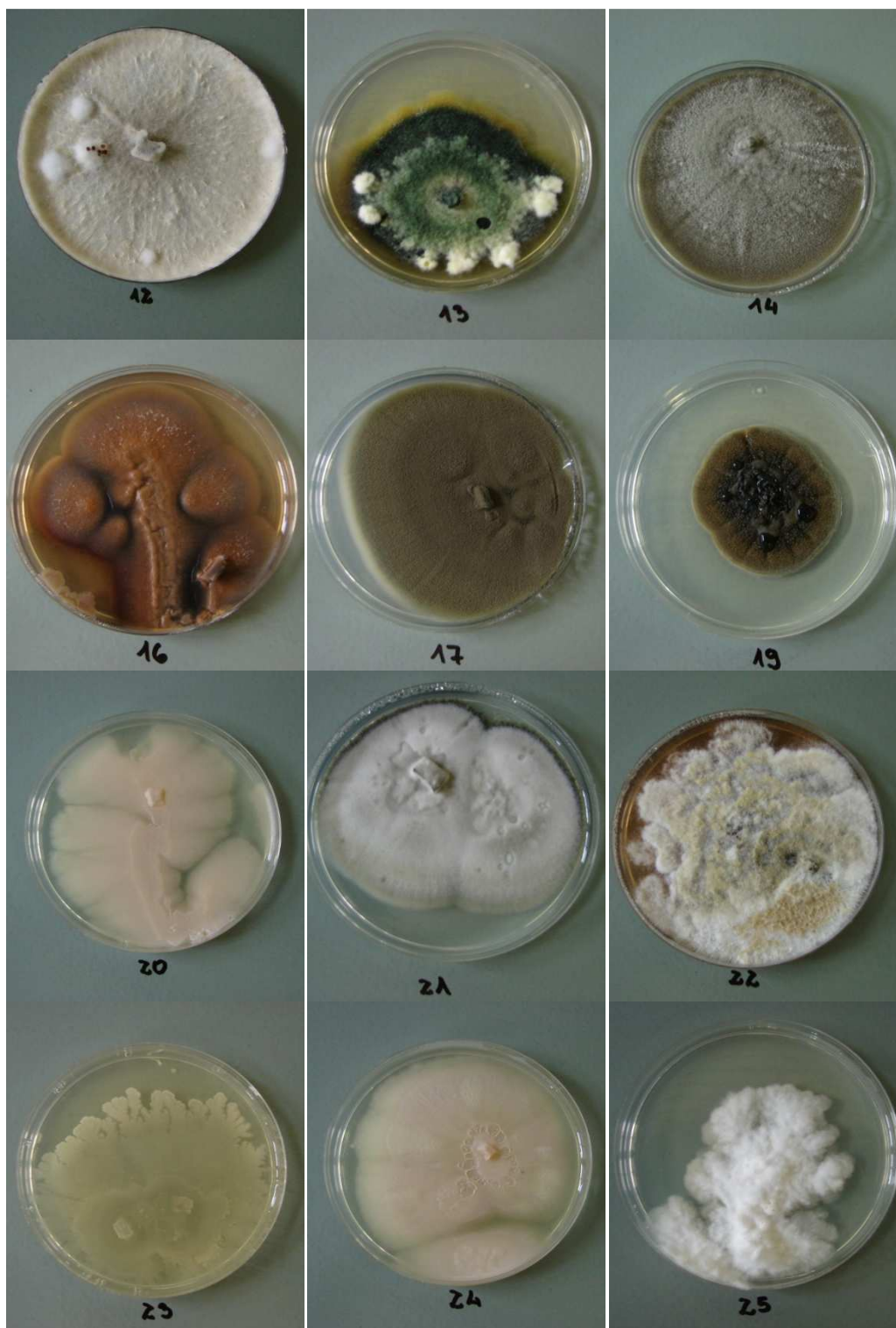
Pri precepljanju smo glive z gojiščem rezali na zunanem delu. Na robu razraslega micelija so bile mlade glive, ki so bile najbolj vitalne in za katere je bila največja verjetnost, da bi se razrasle po novem gojišču. Glive so se namreč razraščale od znotraj navzven in so bile na sredini micelija že postarane, zato odvzem od tu ne bi bil smiseln. Košček glive z gojiščem smo položili na nov agar tako, da se je gliva le z robom dotikala

gojišča. Če bi jo na krompirjev agar z glukozo položili s celo ploskvijo, bi glivam lahko preprečili dostop do kisika in te bi propadle.

V času preraščanja gojišča smo petrijevke večkrat pregledali. Opazili smo, da so nekatere glive začele preraščati gojišča že po enem tednu, druge šele po dveh tednih. Po treh tednih so bila vsa gojišča prerasla. Micelij gliv se je pri tem radialno širil in oblikoval okroglo kolonijo. Posamezne glive so rasle s konstantno hitrostjo in pri tem absorbirale hranila iz gojišča. Poleg tega so glive prodirale tudi v samo gojišče ter vanj sproščale različne pigmentne snovi. Ob pregledu gojišča smo namreč opazili, da so ta različno obarvana. Na različno hitrost rasti so verjetno vplivali pogoji okolja, kot so hranila, temperatura, vlaga, svetloba. Verjetno so hitreje rastočim glivam dani pogoji bolj ustrezali, počasneje rastočim pa manj.



Slika 5: Glivne kolonije na PDA gojišču.



Slika 5: ...nadaljevanje s prejšnje strani.



Slika 5: ...nadaljevanje s prejšnje strani.



Slika 5: ...nadaljevanje s prejšnje strani.



Slika 5: ...nadaljevanje s prejšnje strani.

Z glivami prerasle petrijevke smo primerjali med seboj po izgledu, vonju in konsistenci. Opazili smo, da določene petrijevke vsebujejo enake vrste gliv.

Preglednica III: Petrijevke, ki vsebujejo enake oz. različne vrste gliv.

	skupina	št. petrijevk
ENAKA VRSTA GLIV	1.	4, 14, 17, 66
	2.	5, 12, 42, 54, 55, 58, 65
	3.	6, 7, 22, 28, 49, 52, 56, 62
	4.	20, 21, 23, 24, 36, 63
	5.	25, 53, 59
	6.	57, 61, 67
RAZLIČNE VRSTE GLIV	7.	3, 11, 13, 16, 19, 26, 35, 38, 39, 40, 41, 60, 64, 68

Določene vrste endofitskih gliv so se pojavile v mariborskem in ljubljanskem botaničnem vrtu (skupine: 1., 2., 3., 4., 5.). Več enakih vrst gliv je raslo na različnih drevesih znotraj istega okolja. Le nekatera drevesa, ki so rasla v neposredni bližini znotraj iste lokacije, so bila poraščena z enakimi endofitskimi glivami (št. petrijevk 54 in 55 ter št. petrijevk 20, 21, 23, 24). Opazili pa smo tudi endofitske glive, ki so se pojavile samo na eni vrsti drevesa in na le eni lokaciji (glive iz 7. skupine).

5.4 PRIPRAVA TRAJNIH KULTUR

Za pripravo poševnega gojišča smo predhodno pripravili stojala, ki so zagotavljala, da so epruvete, v katere smo vlili tekoč agar, res stale pod kotom približno 30° in se niso premikale. Le tako smo lahko zagotovili uspešno pripravo poševnih gojišč. Pripravili smo 50 epruvet z gojiščem v relativno majhnem prostoru, zato smo epruvete postavili precej skupaj. S tem smo ustvarili toplotno območje, v katerem so se gojišča zelo počasi strjevala. Šele po treh urah so se popolnoma strdila.

Po pregledu poševnih gojišč smo opazili, da so nacepljene glive le-ta prerasla v dveh tednih. Gojišča z glivami smo prelili s parafinom, ki smo ga zaradi njegove viskoznosti kar dvakrat zaporedoma avtoklavirali. S tem smo povečali verjetnost, da je bila sterilizacija popolna. Parafin smo na prerasla gojišča dali z namenom, da bi upočasnil delovanje metabolizma in rast gliv, saj le-ta zmanjša dostop do kisika. Poleg tega ima parafin tudi zaščitno funkcijo, saj preprečuje dehidracijo.

Zavedali smo se, da bi prevelika količina tekočega parafina predstavljala nevarnost, da gliva ne bi dobila zadostne količine kisika. To bi vodilo v njen propad. Vedeli pa smo tudi, da bi premajhna količina parafina povzročila izhlapevanje vode iz agarja oz. micelija in kultura bi se izsušila. Tudi to bi vodilo v propad glivne kulture. Zato je bilo pomembno, da smo pripravili poševno gojišče, kjer je bil vsaj del micelija izpostavljen optimalnim pogojem, kar je zagotovilo uspešno preživetje glive.

Gojišča z glivami je bilo pomembno shranjevati v hladni sobi, saj je pri nizkih temperaturah metabolizem gliv upočasnjen. V takih pogojih lahko trajne kulture ostanejo stabilne tudi do trideset let, vseeno pa je za zagotovitev živih kultur priporočljivo precepljati glive v intervalih 1-2 let (29). Ker smo glive primerno shranili, jih bomo lahko v prihodnosti odvzeli iz trajnih kultur in jih ponovno gojili.

5.5 PRIPRAVA IZVLEČKOV ENDOFITSKIH GLIV

Izvečke gliv smo pripravili v različno polarnih topilih z namenom, da bi videli, ali bo aktivna substanca izkazovala polarne ali nepolarne lastnosti in s čim bi jo bilo v nadaljnjih raziskavah, če bi do tega prišlo, smiselno ekstrahirati.

Ker protibakterijske učinkovine gliv lahko najdemo v miceliju pa tudi v samem gojišču, smo homogenizirali kar celotno gojišče z micelijem (1). S spatulo smo temeljito postrgali gosto zmes in jo homogenizirali, da bi bilo čim manj izgub. Z razbitjem gojišča in micelija ter uporabo ultrazvoka smo omogočili, da so se aktivne spojine tem bolj ekstrahirale z ustreznim topilom.

Filtracija je najpočasneje potekala pri metanolnih izvlečkih. Za 100 mL filtracije metanolne raztopine smo v povprečju porabili 20 minut, medtem ko smo za filtracijo enake količino etilacetatnih in diklorometanskih izvlečkov potrebovali le 2-3 minute. Predpostavili smo, da se je v metanol izločilo največ snovi. Nismo pa vedeli ali gre za aktivne spojine ali za balastne snovi.

Dobljene filtrate smo v 50 mL okroglih bučkah z vakuumskim rotacijskim uparjalnikom uparili do suhega ostanka, ki smo ga stehtali. Vrednosti mase za posamezne vzorce in ustrezna topila so podane v preglednici IV.

Preglednica IV: Mase suhih izvlečkov gliv.

glive	topilo	masa suhega izvlečka (mg)
3	metanol	44,4
	etilacetat	4,5
	diklorometan	1,3
4	metanol	130,0
	etilacetat	7,4
	diklorometan	2,2
5	metanol	88,9
	etilacetat	3,8
	diklorometan	0,3
6	metanol	243,0
	etilacetat	16,4
	diklorometan	15,4
7	metanol	104,5
	etilacetat	17,9
	diklorometan	14,4

Preglednica IV: ...nadaljevanje s prejšnje strani

11	metanol	112,1
	etilacetat	10,3
	diklorometan	1,9
12	metanol	94,9
	etilacetat	10,7
	diklorometan	3,2
13	metanol	136,1
	etilacetat	8,4
	diklorometan	5,3
14	metanol	38,5
	etilacetat	0,8
	diklorometan	0,2
16	metanol	328,8
	etilacetat	3,2
	diklorometan	1,2
17	metanol	49,3
	etilacetat	19,8
	diklorometan	5,3
19	metanol	215,4
	etilacetat	1,6
	diklorometan	0,7
20	metanol	65,5
	etilacetat	8,3
	diklorometan	1,4
21	metanol	63,7
	etilacetat	9,8
	diklorometan	2,8
22	metanol	78,7
	etilacetat	24,7
	diklorometan	3,4

Preglednica IV: ...nadaljevanje s prejšnje strani.

23	metanol	133,2
	etilacetat	18,1
	diklorometan	4,5
24	metanol	76,3
	etilacetat	10,9
	diklorometan	1,3
25	metanol	173,9
	etilacetat	1,9
	diklorometan	1,5
26	metanol	283,6
	etilacetat	10,2
	diklorometan	7,2
28	metanol	100,4
	etilacetat	14,6
	diklorometan	5,2
35	metanol	71,0
	etilacetat	22,8
	diklorometan	1,1
36	metanol	260,0
	etilacetat	26,8
	diklorometan	6,2
38	metanol	216,9
	etilacetat	13,9
	diklorometan	0,5
39	metanol	340,6
	etilacetat	5,3
	diklorometan	0,6
40	metanol	311,3
	etilacetat	33,0
	diklorometan	0,2

Preglednica IV: ...nadaljevanje s prejšnje strani.

41	metanol	272,7
	etilacetat	3,2
	diklorometan	0,5
42	metanol	93,3
	etilacetat	27,0
	diklorometan	2,2
49	metanol	96,9
	etilacetat	18,2
	diklorometan	14,6
52	metanol	119,1
	etilacetat	12,5
	diklorometan	4,6
53	metanol	201,2
	etilacetat	0,6
	diklorometan	0,5
54	metanol	132,0
	etilacetat	29,2
	diklorometan	2,5
55	metanol	28,1
	etilacetat	3,5
	diklorometan	0,7
56	metanol	104,0
	etilacetat	34,8
	diklorometan	1,7
57	metanol	120,4
	etilacetat	8,7
	diklorometan	5,2
58	metanol	63,2
	etilacetat	18,5
	diklorometan	6,9

Preglednica IV: ...nadaljevanje s prejšnje strani.

59	metanol	335,3
	etilacetat	2,1
	diklorometan	1,8
60	metanol	181,9
	etilacetat	61,9
	diklorometan	1,1
61	metanol	149,9
	etilacetat	41,7
	diklorometan	5,6
62	metanol	124,4
	etilacetat	51,3
	diklorometan	6,8
63	metanol	168,9
	etilacetat	52,0
	diklorometan	23,0
64	metanol	164,1
	etilacetat	0,6
	diklorometan	0,2
65	metanol	86,9
	etilacetat	55,9
	diklorometan	6,1
66	metanol	94,6
	etilacetat	34,2
	diklorometan	5,6
67	metanol	97,9
	etilacetat	5,6
	diklorometan	0,9
68	metanol	98,1
	etilacetat	36,1
	diklorometan	5,5

Zaradi pomanjkanja steklovine smo eksperiment malce priredili. Bučke z izvlečki bi morali prepahali z argonom oz. dušikom, ker sta oba plina kemično inertna in predstavljata idealno zaščito pred kisikom. Tako se morebiti prisotne učinkovine ne bi mogle oksidirati in s tem izgubiti učinka oz. ne bi mogle reagirati s snovmi, ki bi nastale pod vplivom kisika ter tako postati neučinkovite. Tako zaščitene snovi v bučki bi morali shraniti v zamrzovalnik na -23°C . Stehtane suhe ekstrakte smo raztopili v 50 % (V/V) metanolu tako, da smo dobili koncentracijo 1 mg/mL, jih prelili v plastične epruvete in do uporabe hranili v zmrzovalniku pri -23°C .

Tako nizke koncentracije izvlečkov (1 mg/mL) smo pripravili zato, da ne bi prišlo do obarjanja sestavin izvlečka in s tem do zamotnitve raztopine v vdolbinici na mikrotitrski ploščici takoj ob dodatku izvlečka. Motnost samega izvlečka nam bi onemogočila proučevanje učinkov z mikrodilucijskem testom.

5.6 NACEPITEV BAKTERIJE *Escherichia coli* NA LURIA BERTANI GOJIŠČE

Petrijevke z gojiščem smo v hladilnik postavili obrnjene na glavo in tako preprečili, da bi se na gojišču nabral kondenzat, ki bi nam otežil nacepitev bakterij.

Bakterije smo za nacepitev vzeli le iz ene kolonije. Pomembno je bilo, da smo bakterije pri nanosu enakomerno razmazali po površini petrijevke, da so bile kolonije, ki so zrasle po termostataranju, med seboj ločene.

5.7 MIKRODILUCIJSKI TEST - preizkušanje protibakterijskega učinka izvlečkov trdnega gojišča z micelijem, pripravljenih s tremi po polarnosti različnimi topili

Mikrodilucijski test, ki smo ga uporabili za dokazovanje protimikrobnega učinka glivnih izvlečkov, je standardna in referenčna metoda in je bil kot tak primeren tudi za preizkušanje naših izvlečkov (1).

Kot topilo smo uporabili 50 % (V/V) metanol. Da bi preverili ali je *E. coli* sposobna prenesti takšne razmere, smo naredili pozitivno kontrolo. Bakterije so v 50 % (V/V) metanolu zrasle, kar smo videli kot motnost vdolbinice. S tem smo dokazali, da bakterije niso občutljive na 50 % (V/V) metanol in ga lahko uporabimo kot topilo. Naredili

smo tudi negativno kontrolo in dokazali, da uporabljena količina metanola ne obarja sestavin bujona.

Po opravljenem poizkusu smo ugotovili, da sta le dva izmed 135 izvlečkov protibakterijsko učinkovita proti testnemu mikroorganizmu *Escherichia coli* ER2738. Oba izvlečka sta pripadala isti rastlini, in sicer pritlikavemu rdečemu boru (*Pinus sylvestris* Watereri). Šlo je za etilacetatni in diklorometanski izvleček. Na podlagi tega smo sklepali, da so protimikrobne spojine relativno lipofilne narave. Kot alternativne metode za preizkušanje zato ne bi mogli uporabiti disk difuzijske metode, saj spojine zaradi svoje lipofilnosti težko difundirajo iz diskov v hidrofilno trdno gojišče.

Za preostale izvlečke, ki niso izkazali učinkovitosti, obstajata dve možnosti. Ali glive res niso izločale protibakterijskih učinkovin ali pa so jih izločale, pa jim zaradi različnih razlogov njihovega protibakterijskega učinka nismo uspeli dokazati. Morda so protibakterijske učinkovine bile prisotne, a v prenizki koncentraciji, da bi jih lahko dokazali. Lahko, da glivam niso ustrezali pogoji, kot so temperatura, sestava gojišča, količina hranil, stopnja prezračevanja, ali jim je manjkal določen pogoj iz naravnega okolja in zato ni prišlo do tvorbe sekundarnih metabolitov, tudi protimikrobnih učinkovin.

Zavedati se moramo, da glive, ki niso izkazale aktivnosti proti *E. coli*, niso nujno neaktivne proti drugim vrstam gram negativnih oz. pozitivnih bakterijam. Poleg tega bi lahko neaktivni izvlečki delovali proti drugim mikroorganizmom, na primer virusom, glivam, praživalim. Obstaja še kar nekaj možnosti, ki jih z našim testom nismo dokazovali.

Preglednica V: Rezultati mikrodilucijskega testa izvlečkov trdnega gojišča z micelijem s tremi različnimi topili - 1. PLOŠČA.

(legenda: (-) bistro gojišče po inkubaciji, (+) motno gojišče po inkubaciji)

št. vzorca		3	4	5	6	7	11	12	13	14	16	17	19
Na ampicilin	A	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
izvlečki	B metanolni	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	C etilacetatni	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D diklorometanski	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pozitivna kontrola	E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
negativna kontrola	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Preglednica VI: Rezultati mikrodilucijskega testa izvlečkov trdnega gojišča z micelijem s tremi različnimi topili - 2. PLOŠČA.

(legenda: (-) bistro gojišče po inkubaciji, (+) motno gojišče po inkubaciji)

št. vzorca		20	21	22	23	24	25	26	28	35	36	38	39
Na ampicilin	A	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
izvlečki	B metanolni	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	C etilacetatni	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	D diklorometanski	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
pozitivna kontrola	E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
negativna kontrola	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Preglednica VII: Rezultati mikrodilucijskega testa izvlečkov trdnega gojišča z micelijem s tremi različnimi topili - 3. PLOŠČA.

(legenda: (-) bistro gojišče po inkubaciji, (+) motno gojišče po inkubaciji)

št. vzorca		40	41	42	49	52	53	54	55	56	57	58	59
Na ampicilin	A	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
izvlečki	B metanolni	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	C etilacetatni	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D diklorometanski	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pozitivna kontrola	E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
negativna kontrola	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Preglednica VIII: Rezultati mikrodilucijskega testa izvlečkov trdnega gojišča z micelijem s tremi različnimi topili - 4. PLOŠČA.

(legenda: (-) bistro gojišče po inkubaciji, (+) motno gojišče po inkubaciji)

št. vzorca		60	61	62	63	64	65	66	67	68			
Na ampicilin	A	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
izvlečki	B metanolni	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	C etilacetatni	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	D diklorometanski	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
pozitivna kontrola	E	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
negativna kontrola	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

5.8 MIKRODILUCIJSKI TEST - preizkušanje jakosti protibakterijskega učinka z metanolom redčenih aktivnih izvlečkov trdnega gojišča z micelijem

Po zastavljenem protokolu smo nadaljevali naše delo. Z mikrodilucijskem testom smo določili še protibakterijsko učinkovitost razredčenih izvlečkov trdnih gojišč z micelijem 38. vzorca in sicer njegov etilacetatni in diklorometanski izvleček.

Opazili smo, da sta izvlečka učinkovita v območju učinkovitosti natrijeve soli ampicilina. Oba izvlečka imata učinek le še po enkratnem redčenju s 50 % (V/V) metanolom, torej do koncentracije 0,1 mg/mL. Antibiotik je učinkovit do koncentracije 10^{-3} mg/mL. Zavedamo se, da smo imeli v naših vzorcih le izvlečke. Čista izolirana protibakterijska učinkovina bi verjetno imela močnejši učinek. Zato bi bile smiselne še nadaljnje raziskave v tej smeri.

Preglednica IX: Rezultati mikrodilucijskega testa etilacetatnega in diklorometanskega izvlečka trdnega gojišča z micelijem pri 38. vzorcu s koncentracijo 1 mg/mL in njunima redčitvama s 50 % (V/V) metanolom v razmerju 1:1.

(legenda: (-) bistro gojišče po inkubaciji, (+) motno gojišče po inkubaciji)

Število redčitev		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Na ampicilin	A	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
izvlečka	B etilacetatni	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	C diklorometanski	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pozitivna kontrola	E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
negativna kontrola	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

6 SKLEP

Zbrali smo 67 vzorcev iglic iglavcev, vendar pa so na PDA gojišču zrasle le endofitske glive iz 45 vzorcev iglic. Za to obstaja kar nekaj razlag, a nobeno od teh ni mogoče z gotovostjo potrditi. Možni vzroki za nerazrast endofitskih gliv po agarju so sledeči:

- Izbrali smo mlado iglico, ki še ni bila izpostavljena sporam.
- Iglica je bila okužena z endofitskimi glivami, a je bila njena koncentracija v listu tako nizka, da se glive niso preselile na agar (npr. nabrani sončni listi izpostavljeni premočnemu UV sevanju).
- V laboratoriju smo odrezali apikalni del lista, ki je bil daleč stran od peclja, h kateremu se je stekal dež in odlagal spore, oz. del lista, ki je bil najredkeje poseljen z dlačicami, ki zadržujejo spore.
- Iglico smo pri površinski sterilizaciji predolgo držali v 70 % EtOH. S tem smo poleg epifitov pobili tudi endofite.
- Mehkejšje iglice nismo dobro postavili na PDA agar. Notranjost rastlinskega tkiva in s tem endofiti se niso neposredno dotikali gojišča.
- Endofitske glive v iglici so bile počasi rastoče in se v času, ki smo ga namenili kultiviranju, niso hotele razrasti po PDA gojišču.
- Glivam niso ustrezala hranila in/ali pogoji, kot so: svetloba, temperatura, zračenje. Glive bi lahko potrebovale specifični rastlinski produkt.

Po pregledu zraslih endofitskih kultur smo ugotovili, da so se nekatere vrste gliv pojavile na različnih vrstah iglavcev, zato smo predpostavili, da okužbe s temi endofiti niso specifične za posamezno vrsto iglavca. Prav tako so se nekatere vrste gliv pojavile v obeh izbranih botaničnih vrtovih, torej te endofitske glive niso krajevno specifične. Enake vrste endofitskih gliv so poselile tako bližnja kot tudi oddaljena drevesa. Ugotovili smo, da ni povezave med neposredno bližino iglavcev in poseljenostjo z določenimi enakimi vrstami endofitov. Nekatere glive pa so se pojavile le na enem drevesu in le na eni lokaciji. Vrsta endofitskih gliv, ki je bila aktivna proti našemu testnemu mikroorganizmu, bakteriji *Escherichia coli* ER2738, je prav tako rasla le na enem drevesu, in sicer na boru *Pinus sylvestris* Watereri. Te endofitske glive, vključno z aktivnim vzorcem št. 38, bi lahko bile

specifične le za določeno vrsto drevesa. Obstaja tudi možnost krajevno odvisne poselitve z njimi. Za razjasnitev le-tega bi bile potrebne dodatne raziskave.

Iz zraslih endofitskih gliv smo po precepitvi naredili izvlečke (metanolne, etilacetatne, diklorometanske) in opravili mikrodilucijski test. Protibakterijska učinkovitost proti mikroorganizmu *Escherichia coli* ER2738 je bila dokazana etilacetatnemu in diklorometanskemu izvlečku glive iz pritlikavega rdečega bora *Pinus sylvestris* Watereri. Aktivne spojine niso polarne narave, saj metanolni izvleček ni bil učinkovit proti bakteriji. Po jakosti učinka se izvlečka med seboj nista razlikovala, oba sta bila proti bakteriji učinkovita v koncentraciji 0,1 mg/mL. Ta rezultat je precej obetaven, saj je že koncentracija 1mg/mL tista, ki predstavlja ločnico med izvlečki, ki so smiselni za nadaljnje raziskave in tistimi, ki imajo premajhno aktivnost, da bi jih bilo vredno obravnavati. Če primerjamo našo aktivnost z antibiotikom Na ampicilinat, vidimo, da je testni antibiotik za faktor 2 bolj učinkovit. Pri tem se moramo zavedati, da smo delali z izvlečkom, ta pa vsebuje številne nečistote. Čista snov bi verjetno izkazala večjo aktivnost. Obstaja verjetnost korelacije med bakterijo *E. coli* in drugimi Gram negativnim ter Gram pozitivnim bakterijam, zato bi bilo izvlečke smiselno preizkusiti tudi proti tem. Izvlečke bi lahko preizkusili še proti glivam, virusom in praživalim.

7 VIRI IN LITERATURA

1. Janeš D: Doktorska disertacija: Raziskave gliv kot virov novih protimikrobnih učinkovin. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2007: 1-24.
2. 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: 10-13.
3. Gubina M, Ihan A: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Medicinski razgledi, Ljubljana, 2002: 457-461.
4. Kendrick B: The Fifth Kingdom, 3rd ed. Focus Publishing, Newburyport, MA, USA, 2000: 1-8.
5. Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW: The fungi, 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA, USA, 2001: 11-84.
6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8205/> (datum dostopa 4.3.2011)
7. Kendrick B: The Fifth Kingdom, 3rd ed. Focus Publishing, Newburyport, MA, USA, 2000: 142-158.
8. Raspor P: Biotehnologija osnovna znanja. BIA, d.o.o., Ljubljana, 1996: 95-111.
9. Ružič-Sabljić E, Cerar T, Steyer A, Strašek K, Cvitković-Špik V: Osnutek praktikuma iz mikrobiologije namenjeno študentom farmacije. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana, 2007/08: 52-53.
10. Strobel G, Daisy B: Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67: 491-502.
11. Bacon CW, White JF: *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker, Inc., New York, 2000: 3-29.
12. Owen NL, Hundley N: Endophytes – the chemical synthesizers inside plants. *Sci Prog* 2004; 87 (2): 79-99.
13. Strobel GA: Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect* 2003; 5:535-544.
14. Ganley RJ, Brunsfeld SJ, Newcombe G: A community of unknown, endophytic fungi in western white pine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101 (27) 10107-10112.
15. Strobel G, Daisy B, Castillo U, Harper J: Natural products from endophytic microorganisms. *J Nat Prod* 2004; 67 (2): 257-268.

16. 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.
17. Saikkonen K, Wäli P, Helander M, Faeth SH: Evolution of endophyte - plant symbioses. *Trends Plant Sci* 2004; 9: 275-280.
18. Strobel GA: Rainforest endophytes and bioactive products. *Crit Rev Biotechnol* 2002; 22: 315-333.
19. Pimentel MR, Molina G, Dionísio AP, Maróstica Junior MR, Pastore GM: The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnol Res Int* 2011; 2011: 576286.
20. Zhao J, Shan T, Mou Y, Zhou L.: Plant – Derived Bioactive Compounds Produced by Endophytic Fungi. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2011; 159-168.
21. Bacon CW, White JF: *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker, Inc., New York, 2000: 389-420.
22. Yin H, Zhao Q, Sun FM, An T: Gentiopicrin- producing endophytic fungus isolated from *Gentiana macrophylla*. *Phytomedicine*, 2009;16(8):793-797.
23. <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/9/46> (datum dostopa 14.3.2011)
24. Pintar (Majcen) M: Diplomsko delo: Ugotavljanje protibakterijskega učinka nekaterih endofitskih gliv. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2008: 19-20.
25. Marolt-Gomišček M: Antibiotiki in kemoterapevtiki v vsakdanji praksi. *Tangram*, Ljubljana, 1992: 3-6.
26. Gubina M, Ihan A: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Medicinski razgledi, Ljubljana, 2002: 427-438.
27. Gubina M, Ihan A: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Medicinski razgledi, Ljubljana 2002: 439-446.
28. Ružić-Sabljić E, Cerar T, Steyer A, Strašek K, Cvitković-Špik V: Osnutek praktikuma iz mikrobiologije namenjeno študentom farmacije. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana, 2007/08: 68-72.
29. Smith D, Onions AHS: *The Preservation and Maintenance of Living Fungi*, 2nd ed. CAB International, Wallingford, UK, 1994: 15-65.