

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Sašo JANČIČ

EKOFIZIOLOGIJA IN TAKSONOMIJA GLIV IZ RODU

Wallemia

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Sašo JANČIČ

EKOFIZIOLOGIJA IN TAKSONOMIJA GLIV IZ RODU *Wallemia*

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**ECOPHYSIOLOGY AND TAXONOMY OF THE FUNGI FROM
GENUS *Wallemia***

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo v laboratorijih skupine za biologijo mikroorganizmov Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete je na seji dne 5. 6. 2009 za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Nino Gunde-Cimerman in za somentorico doc. dr. Polono Zalar ter dne 6. 5. 2011 za recenzentko prof. dr. Ano Plemenitaš in predsednico prof. dr. Marjano Regvar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Marjana Regvar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Nina Gunde-Cimerman

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Polona Zalar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Ana Plemenitaš

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Datum zagovora: 31. 08. 2011

Podpisani se strinjam z objavo svoje diplomske naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji. Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Sašo Jančič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- UDK 581.526.52:582.28(043.03)=163.6
- KG glive / rod *Wallemia* / kserofilni mikroorganizmi / ozmotsko stresna okolja / vzorčenje / ITS rDNA / taksonomija / fiziologija / ekologija
- AV JANČIČ, Sašo
- SA GUNDE-CIMERMAN, Nina (mentorica) / ZALAR, Polona (somentorica) / PLEMENITAŠ, Ana (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2011
- IN EKOFIZIOLOGIJA IN TAKSONOMIJA GLIV IZ RODU *Wallemia*
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XII, 96 str., 15 pregl., 8 sl., 4 pril., 65 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI *Wallemia* je filogenetsko star in nenavaden rod bazidiomicetnih gliv, ki zajema ene izmed najbolj ekstremofilnih evkariontskih organizmov opisanih doslej, saj vsi predstavniki rodu kažejo kserotoleranten oz. kserofilni značaj. V okviru diplomske naloge smo z vzorčenjem zelo raznolikih ozmotsko stresnih okolij pridobili 65 izolatov rodu *Wallemia*, vendar smo jih samo dve tretjini identificirali do treh znanih vrst (*W. sebi*, *W. muriae* in *W. ichthyophaga*). Na podlagi molekularno-genetske in filogenetske analize nukleotidnega zaporedja ITS rDNA smo prepoznali tri nove taksona. Kot *Wallemia* sp. smo poimenovali novo vrsto, ki predstavlja vezni člen med vrsto *W. ichthyophaga* in ostalimi vrstami rodu *Wallemia*, *Wallemia* aff. *sebi* in *Wallemia* aff. *muriae* pa vključujeta izolate, ki se genotipsko razlikujejo, fenotipsko pa so identični vrsti *W. sebi*. Vrste rodu *Wallemia* so si po morfoloških značilnostih med seboj zelo podobne, zato smo iskali dodatne fenotipske lastnosti, na podlagi katerih bi jih ločevali. Izvedli smo encimske in asimilacijske teste ter testirali toleranco na različne soli (NaCl, MgCl₂ in MgSO₄). Medtem ko se encimski in asimilacijski profili med vrstami bistveno razlikujejo, predvsem rast na MgCl₂ omogoča ločevanje med njimi. Ekološko se le vrsta *W. ichthyophaga* razlikuje od ostalih. Zaradi njene ekstremno halofilne narave naseljuje samo izjemno slana okolja, kot je izjemno slana voda solin, kristali soli in slana hrana. Ostali predstavniki rodu zaradi kserotolerantne oz. kserofilne narave naseljujejo pester izbor bolj ali manj ozmotsko stresnih okolij. Izolirali smo jih tako iz izjemno slane vode solin kot tudi iz sladke, slane in suhe hrane ter drugih suhih okolij. Kljub temu, da so soline umetno ustvarjeno okolje, so verjetno glavni habitat za vse vrste rodu *Wallemia*.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Dn
- DC 581.526.52:582.28(043.03)=163.6
- CX fungi / genus *Wallemia* / xerophilic microorganisms / osmotic stressful environments sampling / ITS rDNA / taxonomy / physiology / ecology
- AU JANČIČ, Sašo
- AA GUNDE-CIMERMAN, Nina (supervisor) / ZALAR, Polona (co-advisor) / PLEMENITAŠ, Ana (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2011
- TI ECOPHYSIOLOGY AND TAXONOMY OF THE FUNGI FROM GENUS *Wallemia*
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO XII, 96 p., 15 tab., 8 fig., 4 ann., 65 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB *Wallemia* is a phylogenetically old and unusual basidiomycetous genus of fungi. The genus comprises species that are amongst the most extremophilic eukaryotic organisms ever described – all of them are xerophilic or at least xerotolerant. In the presented work, 65 isolates of genus *Wallemia* were obtained from a wide variety of osmotically stressful environments. Only two-thirds of the isolates belonged to one of the three known species (*W. sebi*, *W. muriae* and *W. ichthyophaga*). Based on the phylogenetic analysis of ITS rDNA sequences three new taxa were recognized. A new species, *Wallemia* sp. represents a link between the *W. ichthyophaga* and other species of the genus. *Wallemia* aff. *sebi* and *Wallemia* aff. *muriae* comprise isolates that are genotypically different, but phenotypically identical to *W. sebi*. Species of *Wallemia* have very similar morphological characteristics, therefore we searched for phenotypic characteristics that could be used to distinguish them. We performed enzymatic and assimilation tests and tested for tolerance to different salts (NaCl, MgCl₂ and MgSO₄). While the enzymatic and assimilation profiles among the species do not differ significantly, growth in medium with MgCl₂ allows the separation between individual species. Ecologically only *W. ichthyophaga* is different from others. Its extremely halophilic nature enables it to inhabit only hypersaline environments, such as hypersaline water, salt crystals and salty foods. Other representatives of the genus are xerophilic or at least xerotolerant, so they inhabit a wide variety of more or less osmotic stressful environments. They were isolated from hypersaline water of saltern, from sweet, salty, dry foods and other dry environments. Salterns are an anthropogenic environment, but represent an important habitat for all species of the genus *Wallemia*.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	IV
KEY WORDS DOCUMENTATION	V
KAZALO VSEBINE.....	VI
KAZALO SLIK.....	X
KAZALO PREGLEDNIC.....	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI.....	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PREGLED POJMOV	3
2.1.1 Ekologija, ekološka niša in ekofiziologija.....	3
2.1.2 Ekstremna okolja, ekstremofili, kserofili, halofili, ozmofili, kaofili.....	3
2.2 EKSTREMNA OKOLJA	4
2.2.1 Ozmotsko stresna okolja.....	4
2.2.1.1 Voda in njena dostopnost v ozmotsko stresnih okoljih.....	4
2.2.1.2 Izjemno slana okolja.....	5
2.2.1.3 Hrana z nizko vodno aktivnostjo.....	7
2.2.1.3.1 Suha hrana	7
2.2.1.3.2 Sladka hrana	7
2.2.1.3.3 Slana hrana	8
2.2.2 Stresna okolja s kaotropnim in kozmotropnim delovanjem	8
2.2.2.1 Kaotropni in kozmotropni efekt topljencev.....	8
2.2.2.2 Kaotropni efekt MgCl ₂	9
2.2.2.3 Življenje pod kaotropnimi pogoji.....	10
2.3 ŽIVLJENJE V OZMOTSKO STRESNIH OKOLJIH	10
2.3.1 Življenje v izjemno slanah okoljih z znižano a_w	11
2.3.2 Življenje na hrani z znižano a_w	12

2.4	PRILAGODITVE NA OZMOTSKO STRESNO OKOLJE	12
2.4.1	Fiziološke prilagoditve na ozmotsko stresno okolje	13
2.4.2	Morfološke prilagoditve na ozmotsko stresno okolje	15
2.4.3	Molekularne prilagoditve na ozmotsko stresno okolje	16
2.5	ROD <i>Wallemia</i>	17
2.5.1	Taksonomija in filogenija	18
2.5.2	Fiziologija in ekofiziologija	19
2.5.3	Morfologija	20
2.5.4	Ekologija	21
2.5.5	Prilagoditve na okolja z znižano vodno aktivnostjo	23
2.5.6	Mikotoksini in patogeneza	23
3	MATERIALI IN METODE	24
3.1	KEMIKALIJE, PRIBOR IN APARATURE	24
3.1.1	Kemikalije	24
3.1.2	Laboratorijski pribor	25
3.1.3	Aparature	26
3.2	GOJIŠČA, RAZTOPINE, ZMESI IN PUFRI	27
3.2.1	Gojišča	27
3.2.2	Raztopine	30
3.2.3	Pufri, reagenti in druge zmesi	31
3.3	METODE DELA	32
3.3.1	Vzorčenje ozmotsko stresnih okolij	32
3.3.2	Izolacija do čistih kultur	32
3.3.3	Molekularno-genetska karakterizacija gliv iz rodu <i>Wallemia</i>	33
3.3.3.1	Izolacija genomske DNA	33
3.3.3.2	Pomnoževanje dela nukleotidnega zaporedja z verižno reakcijo s polimerazo	33
3.3.3.3	Gelska elektroforeza	34
3.3.3.4	Določanje in obdelava nukleotidnega zaporedja	35
3.3.4	Fiziološka karakterizacija gliv iz rodu <i>Wallemia</i>	35
3.3.4.1	Rast na MEA/MEA 10% NaCl	35
3.3.4.2	Encimska aktivnost gliv iz rodu <i>Wallemia</i>	35

3.3.4.2.1	Komercialni encimski kit API ZYM (Biomerieux).....	36
3.3.4.2.2	Merjenje proteolitične aktivnosti s komercialnim kitom Sigma	37
3.3.4.2.3	Presevne encimske metode po Petersonu	37
3.3.4.2.4	Encimska razgradnja konjugiranih polisaharidov	37
3.3.4.3	Asimilacijski profil gliv iz rodu <i>Wallemia</i>	38
3.3.4.4	Testiranje tolerance na MgCl ₂ in MgSO ₄	40
3.3.5	Shranjevanje izoliranih gliv.....	41
4	REZULTATI.....	42
4.1	VZORČENJE Z NAMENOM IZOLACIJE SEVOV RODU <i>Wallemia</i>	42
4.1.1	Vzorčenje ozmotsko stresnih okolij	42
4.1.1.1	Vzorci iz izjemno slanah okolij.....	42
4.1.1.2	Vzorci iz hrane z znižano vodno aktivnostjo.....	43
4.1.1.3	Vzorci iz drugih okolij.....	43
4.1.2	Pridobitev sevov iz različnih mikrobioloških zbirk.....	50
4.2	IDENTIFIKACIJA IN TAKSONOMSKA ANALIZA	51
4.3	FIZIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA GLIV IZ RODU <i>Wallemia</i>	58
4.3.1	Encimska aktivnost gliv iz rodu <i>Wallemia</i>	58
4.3.1.1	API ZYM test	58
4.3.1.2	Proteolitična aktivnost ocenjena z encimskim kitom Sigma.....	59
4.3.1.3	Presevni encimski testi na agarnih gojiščih.....	59
4.3.1.4	Encimska razgradnja konjugiranih polisaharidov	60
4.3.1.5	Primerjava encimske aktivnosti med vrstami rodu <i>Wallemia</i>	61
4.3.2	Asimilacijski profil gliv iz rodu <i>Wallemia</i>	62
4.3.2.1	Asimilacijski profil vrste <i>W. sebi</i>	62
4.3.2.2	Asimilacijski profil vrste <i>W. muriae</i>	63
4.3.2.3	Asimilacijski profil vrste <i>W. ichthyophaga</i>	65
4.3.3	Testiranje tolerance gliv iz rodu <i>Wallemia</i> na MgCl₂ in MgSO₄.....	66
4.3.3.1	Toleranca na MgCl ₂	66
4.3.3.2	Toleranca na MgSO ₄	68
4.3.3.3	Toleranca na mešanico soli NaCl, MgCl ₂ in MgSO ₄	69
4.3.3.4	Mikromorfologija gliv rodu <i>Wallemia</i> na gojišču z dodatkom soli.....	69
4.4	EKOLOGIJA GLIV IZ RODU <i>Wallemia</i>	71

5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	73
5.1	RAZPRAVA.....	73
5.1.1	Vzorčenje z namenom izolacije sevov rodu <i>Wallemia</i>	73
5.1.2	Molekularno-genetska in fiziološka karakterizacija.....	74
5.1.3	Taksonomija in ekofiziologija gliv iz rodu <i>Wallemia</i>	78
5.2	SKLEPI.....	85
6	POVZETEK.....	87
7	VIRI	89

ZAHVALA

PRILOGA A1: ASIMILACIJA VIROV C in N SEVOV VRSTE *W. sebi* NA GOJIŠČU Z DODATKOM 17% NaCl.

PRILOGA A2: ASIMILACIJA VIROV C in N SEVOV VRSTE *W. sebi* NA GOJIŠČU BREZ DODATKA NaCl.

PRILOGA A3: ASIMILACIJA VIROV C in N SEVOV VRSTE *W. muriae* NA GOJIŠČU Z DODATKOM 17% NaCl.

PRILOGA A4: ASIMILACIJA VIROV C in N SEVOV VRSTE *W. ichthyophaga* NA GOJIŠČU Z DODATKOM 17% NaCl.

KAZALO SLIK

Slika 1: Vpliv topljencev s kaotropnim in kozmotropnim učinkom na celično membrano in makromolekule (Williams in Hallsworth, 2009: 3300).....	9
Slika 2: Filogenetsko drevo na osnovi nukleotidnih zaporedij ITS rDNA na novo pridobljenih in referenčnih tipskih sevov gliv iz rodu <i>Wallemia</i>	57
Slika 3: Encimska razgradnja konjugiranih polisaharidov vrst iz rodu <i>Wallemia</i>	60
Slika 4: Mikromorfološki opis vrst <i>W.sebi</i> (EXF-958) in <i>W. muriae</i> (EXF-951) na gojiščih YNB in YCB s 17 % NaCl in z nekaterimi viri ogljika in dušika.	64
Slika 5: Mikromorfološki opis vrste <i>W. ichthyophaga</i> (EXF-994) na gojiščih YNB in YCB s 17% NaCl in z nekaterimi viri ogljika in dušika.....	65
Slika 6: Rast vrst rodu <i>Wallemia</i> na gojišču MEA z dodatkom MgCl ₂	67
Slika 7: Mikromorfologija rodu <i>Wallemia</i> na gojiščih MEA z dodatkom soli NaCl, MgCl ₂ in MgSO ₄	70
Slika 8: Rast gliv iz rodu <i>Wallemia</i> na različnih substratih.	71

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Kemikalije uporabljene pri raziskovalnem delu.	24
Preglednica 2: Aparature uporabljene pri raziskovalnem delu	26
Preglednica 3: Program za pomnoževanje dela nukleotidnega zaporedja ITS rDNA.	34
Preglednica 4: Encim, substrat in oznaka; presevna encimske metode (Peterson, 1995)..	37
Preglednica 5: Količina $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, ki jo potrebujemo za pripravo 1000 ml (X) in 100 ml (Y) gojišča.	40
Preglednica 6: Količina $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, ki jo potrebujemo za pripravo 1000 ml (A) in 100 ml (B) gojišča.	40
Preglednica 7: Pregled vzorcev pridobljenih iz ozmotsko stresnih okolij, način izolacije ter datum vzorčenja.	44
Preglednica 8: Izolati gliv iz rodu <i>Wallemia</i> in njihove oznake, substrat, država izvora ter sposobnost rasti na gojišču MEA /MEA + 10% NaCl.	54
Preglednica 9: API ZYM test; ocena koncentracij (nM) ekstracelularnih encimov gliv iz rodu <i>Wallemia</i>	58
Preglednica 10: Encimska razgradnja konjugiranih polisaharidov vrst iz rodu <i>Wallemia</i> .	60
Preglednica 11: Encimska aktivnost gliv iz rodu <i>Wallemia</i> na gojiščih z dodatkom soli.	61
Preglednica 12: Primerjava posplošenih asimilacij ogljika in dušika.....	63
Preglednica 13: Rast gliv iz rodu <i>Wallemia</i> na gojišču MEA z dodanimi različnimi koncentracijami MgCl_2	66
Preglednica 14: Rast gliv iz rodu <i>Wallemia</i> na tekočem gojišču MEA z dodanimi različnimi koncentracijami MgSO_4	68
Preglednica 15: Rast gliv iz rodu <i>Wallemia</i> na gojišču MEA z 1 M NaCl, 1 M MgCl_2 in 1 M MgSO_4	69

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

°C	stopinje Celzija
%	odstotek
µl	mikroliter (10^{-6} L)
µm	mikrometer (10^{-6} m)
aff.	sorodnost (»affinity«)
CBS	mikrobiološka zbirka gliv Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht
CTAB	cetil trimetil amonijev bromid
ddH ₂ O	bidestilirana voda
DMSO	dimetil-sulfonio-propionat
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
EDTA	etidiaminotetrocetna kislina
EXF	Mikrobiološka zbirka ekstremofilnih gliv
ITS	notranji distančniki, ki ločujejo rDNA posameznih ribosomskih podenot (»internal transcribed spacer«)
M	molarno
MEA	agar s sladnim ekstraktom (»malt extract agar«)
MZKI	mikrobiološka zbirka Kemijskega inštituta
NCBI	(»National Center for Biotechnology Information«)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (»polymerase chain reaction«)
pH	negativni logaritem koncentracije protonov
rDNA	zaporedje DNA, ki kodira ribosomsko RNA
RNA	ribonukleinska kislina
sp.	vrsta (»species«)
SSS	raztopina za pripravo suspenzije spor (»spore suspension solution«)
TBE	Tris-borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
V	volt
x	krat-(ni)

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Wallemia je filogenetsko star in nenavaden rod bazidiomicetnih gliv, ki zajema ene izmed najbolj ekstremofilnih evkariontskih organizmov opisanih doslej. Rod *Wallemia* zaenkrat zajema le tri vrste: *W. sebi*, *W. muriae* in *W. ichthyophaga*, ki vse kažejo kserotoleranten značaj, to je sposobnost naseljevanja habitatov z znižano vodno aktivnostjo. Posebna filogenetska pozicija ter edinstvena morfologija (bazoavksalni tip konidiogeneze, dolipore, artrosporam podobni konidiji) in fiziologija (kserofilija) so dejstva, da rod *Wallemia* danes uvrščamo v svoj razred in red, *Wallemiomycetes* in *Wallemiales*, znotraj bazidiomicetnih gliv. Molekularno-genetske analize nukleotidnega zaporedja ITS rDNA so pokazale, da se vrsti *W. sebi* in *W. muriae* močno razlikujeta od vrste *W. ichthyophaga*. ITS rDNA nukleotidno zaporedje vrste *W. ichthyophaga* je daljše in se na mnogih mestih ne ujema z ostalimi vrstami v rodu, zato je možno, da je rod *Wallemia* kompleks taksonov, ki so že izumrli ali pa do danes še niso bili izolirani in opisani (Zalar in sod., 2005).

Podatkov o ekologiji gliv iz rodu *Wallemia* je malo, pa še ti so vezani večinoma na do leta 2005 edino priznano vrsto *W. sebi*. Vse tri vrste rodu, ki so jih leta 2005 opisali Zalar in sod., so ubikvitarne; izoliramo jih lahko iz slane, sladke in posušene hrane, solin, tal, zraka ter iz drugih substratov z omejeno dostopnostjo vode. Dostopnost vode je v takih okoljih eden glavnih fizikalno-kemijskih dejavnikov, ki vplivajo na rast, aktivnost in razporeditev mikroorganizmov. Kserofilni organizmi uspešno rastejo v okoljih z a_w 0,85 in manj, saj so se prilagodili z različnimi strategijami, ki temeljijo na vzdrževanju izoosmotske oz. hiperoosmotske citoplazme (Zalar in sod., 2005; Oren, 1999; Hallsworth, 2007). Za človeka je rod *Wallemia* pomemben kot mikotoksičen kontaminant in kvarljivec slane, sladke ter suhe hrane (Pitt in Hocking, 2009), vrsta *W. sebi* pa je bila opisana tudi kot alergen in povzročitelj pljučnih infekcij (»farmer's lung disease«) pri ljudeh (Lappalainen in sod., 1998). Vrsta *W. ichthyophaga* velja za najbolj halofilen evkariontski organizem opisan doslej, ki verjetno poseljuje izključno izjemno slana okolja in zato predstavlja nov modelni organizem za študije adaptacij evkariontov na tovrstna okolja.

1.2 CILJI

Cilj diplomske naloge je iz različnih ozmotsko stresnih okolij izolirati čim več sevov in pridobiti nova spoznanja o ekologiji, fiziologiji in taksonomiji posameznih vrst, ter najti povezave med ekološkimi, fiziološkimi in taksonomskimi značilnostmi gliv iz rodu *Wallemia*. Na podlagi dobljenih podatkov želimo čimbolj natančno definirati ekološko nišo posamezne vrste ter poiskati morebitne vezne člene med filogenetsko oddaljenimi do sedaj opisanimi vrstami znotraj rodu *Wallemia*.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

1. Predvidevamo, da glive iz rodu *Wallemia* poseljujejo vsa okolja, kjer je dostopnost vode omejena: izjemno slana voda, slana, sladka in suha hrana, cvetni prah, žita, seno, soline, zrak, puščave in ostali suhi substrati. Vrsto *W. sebi* bomo najverjetneje izolirali tudi iz substratov, ki nimajo znižane vodne aktivnosti, medtem ko predvidevamo, da bomo vrsti *W. muriae* in predvsem *W. ichthyophaga* zaradi njune halofilne narave izolirali iz izjemno slanah substratov.

2. Predvidevamo, da bodo vsi izolirani sevi večinoma pripadali eni izmed že znanih vrst (*W. sebi*, *W. muriae* in *W. ichthyophaga*), vendar zaradi sorodstvene oddaljenosti med vrstami pričakujemo tudi potencialno nove vrste, ki bi predstavljale vezne člene med že opisanimi vrstami.

3. Predvidevamo, da se bodo razlike med posameznimi vrstami pojavljale tudi na fiziološki ravni (asimilacija virov ogljika in dušika, encimska aktivnost, toleranca na NaCl, MgCl₂ in MgSO₄).

4. Kljub temu, da so soline umetno okolje, predvidevamo, da so najbolj verjeten habitat za halofilno vrsto *W. ichthyophaga*, verjetno pa tudi za preostali dve halotolerantni vrsti. Predvidevamo, da lahko s soljenjem (s soljo iz solin) in z dodajanjem sladkorja kontaminiramo hrano z glivami rodu *Wallemia*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PREGLED POJMOV

2.1.1 Ekologija, ekološka niša in ekofiziologija

Po Haecklu (1869) je **ekologija** temeljna biološka znanost, ki proučuje vpliv okolja na organizem in odgovor organizma na okolje. Zaradi stalne težnje po popolnosti se je definicija ekologije tekom zgodovine spreminjala. Odum (1971) jo definira kot proučevanje strukture in delovanja narave, medtem ko Elmen (1973) vpelje koncept prilagoditev organizmov okolju. Krebs (1985) ekologijo definira kot proučevanje odnosov med organizmi in njihovim okoljem, ki določajo razširjenost in številčnost organizmov. Današnja definicija je izpopolnjena in kompleksna, njen osnovni koncept pa predstavlja ekološka niša. **Ekološka niša** je »hipervolumen« v večdimenzionalnem ekološkem prostoru, ki omogoča vrsti razmnoževanje in preživetje. Dimenzije predstavljajo vse biotske in abiotske spremenljivke, ki so tako ali drugače pomembne za obstoj vrste. Koncept ekološke niše združuje zahteve in njeno vlogo v skupnosti (Hutchinson, 1959).

Povezava med mikrobno ekologijo in mikrobno fiziologijo je mikrobna **ekofiziologija**. Odziv mikrobne združbe na stresne vplive okolja je v prvi vrsti pogojen s fiziološkim odzivom posamezne celice na stres (McMeekin, 2010).

2.1.2 Ekstremna okolja, ekstremofili, kserofili, halofili, ozmofili, kaofili

Organizme, ki rastejo v okoljih, kjer vsaj ena spremenljivka predstavlja ekstremne razmere, imenujemo **ekstremofili**. Ekstremofili rastejo pri ekstremno nizkih ali visokih temperaturah, v ekstremno kislem ali bazičnem okolju, v razmerah osmotskega stresa, visokega sevanja ali pod visokim tlakom. Pravi ekstremofili izkazujejo optimalno rast v **ekstremnih okoljih** (Thomas in Cavicchioli, 2000).

Ekstremofilni mikroorganizmi, ki uspevajo v okoljih z povišano vsebnostjo topljencev, se delijo na tri ekofiziološke skupine, in sicer na soli tolerantne halofile, na sladkorje tolerantne ozmofile in na kserofile, ki tolerirajo nizko vodno aktivnost (Brown, 1990).

Organizmi, ki uspevajo v okoljih z znižano vodno aktivnostjo, neodvisno od tipa topljenca v rastnem mediju, so **kserofili**. Kserofilne glive preživijo v suhih okoljih, kjer vodna aktivnost (a_w) ne presega 0,85 in dobro rastejo v gojiščih z dodatkom 17% (m/V) NaCl ali 50% glukoze (Gunde-Cimerman in sod., 2004). **Halofilni** organizmi za rast potrebujejo sol, optimalno rast pa dosežejo pri višji koncentraciji soli, kot jo ima morska voda. **Halotolerantni** organizmi sol v gojišču le tolerirajo in ni potrebna za njihovo rast (Galinski in Truper, 1994). Pri glivah so halofilne tiste vrste, ki so sposobne rasti in vitro na gojišču z najmanj 17 % NaCl (Gunde-Cimerman in sod., 2004). **Ozmofili** so organizmi, ki uspešno rastejo v okoljih s povišano koncentracijo sladkorja (Snowdon in Cliver, 1996).

Raziskave kserofilnih mikroorganizmov, izoliranih iz različnih virov, so pokazale, da vodna aktivnost ni edini parameter, ki omejuje življenje v okoljih z zvišano vsebnostjo topljencev. Topljenci, ki imajo kaotropno ali kozmotropno aktivnost, direktno vplivajo na strukturo in funkcijo makromolekul in tako omejujejo življenje v okoljih z zvišano vsebnostjo topljencev. **Kaofili** so nova ekofiziološka skupina ekstremofilnih mikroorganizmov, ki optimalno rastejo pod kaotropnimi pogoji. Nekateri sevi glive *Xeromyces bisporus* rastejo najhitreje na gojišču s kaotropnimi pogoji in počasneje na gojišču z nevtralnimi ter kozmotropnimi pogoji (Williams in Hallsworth, 2009).

2.2 EKSTREMNA OKOLJA

2.2.1 Ozmotsko stresna okolja

2.2.1.1 Voda in njena dostopnost v ozmotsko stresnih okoljih

Voda ima glavno vlogo pri vseh bioloških procesih, zato so njena dostopnost, lastnosti in obnašanje glavni dejavniki, ki omejujejo življenje. Je eden glavnih fizikalno-kemijskih dejavnikov okolja, ki vplivajo na rast, aktivnost in razporeditev mikroorganizmov (Hallsworth, 2007). Dostopnost vode je opisana z izrazom vodna aktivnost (v nadaljevanju a_w), ki je definirana kot razmerje med parnim tlakom vode nad raztopino (p) in parnim tlakom čiste vode (p_0) pri enaki temperaturi. Odvisna je od množine topila (vode) n_1 in topljenca n_2 v raztopini. Zveza med omenjenimi količinami je opisana s formulo

$$a_w = p/p_0 = n_1/n_1 - n_2,$$

iz katere sledi, da je vrednost vodne aktivnosti za čisto vodo 1, s povečevanjem koncentracije topljenca v raztopini pa vrednosti padajo proti 0. Ker imajo različni topljenci (NaCl, glukoza, saharoza in drugi sladkorji) visoko afiniteto do vodnih molekul, so le-te nedostopne za mikroorganizme in takšno okolje je podobno sušnemu. Pomanjkanje biološko dostopne vode in posledično dehidracija celic je glavni stresni dejavnik v ozmotsko stresnih okoljih. Taka okolja so za mikroorganizme ekstremna (Blomberg in Adler, 1992; Horowitz, 1978).

Grant (2004) je opisal dva tipa ozmotsko stresnih okolij, kjer je dostopnost vode limitirajoči dejavnik za rast mikroorganizmov. Prvo okolje predstavljajo raztopine, kjer je dostopnost vode pogojena s koncentracijo topljenca v raztopini, drugo okolje pa predstavljajo fizikalno heterogena okolja (prst in druga kompleksna okolja), kjer je dostopnost vode pogojena s kapilarnostjo ter vezavo vodnih molekul na površine. Habitati, iz katerih je bilo izoliranih večina kserofilov, pripadajo dvema skupinama ozmotsko stresnih okolij: izjemno slana okolja, kjer je dostopnost vode omejena z visokimi koncentracijami soli (ponavadi NaCl) in hrana s povišano vsebnostjo sladkorjev. Takšna okolja so habitati izključno za kserofilne in halofilne mikroorganizme.

2.2.1.2 Izjemno slana okolja

Slana voda je glavna sestavina Zemljinega površja. Oceani, morja, podzemna slana jezera in površinska slana jezera predstavljajo 99% vse vode na Zemlji, le 1% je sladke, hkrati pa tudi približno ena četrtnina Zemljine skorje vsebuje več 100 metrov debele slane depozite. Soli imajo glavno vlogo v biosferi, kajti določajo dostopnost biološke vode in z različnimi aktivnostmi (ionski, kozmotropni in kaotropni efekt) vplivajo na biološke sisteme. Najpogostejša sol v izjemno slanah okoljih je NaCl, predvsem slanice in depoziti pa so bogati z drugimi solmi, kot je na primer $MgCl_2$ (Hallsworth, 2007).

Izjemno slana okolja imajo višjo koncentracijo soli kot morska voda. Raztopine soli s koncentracijo nad 3,5% NaCl najdemo tako v naravnih kot umetnih ekosistemih. Med

naravne ekosisteme prištevamo globokomorske izjemno slane bazene, slana močvirja, slana in alkalna jezera, medtem ko med umetna hiperslana okolja prištevamo soline in s soljo konzervirana živila (Galinski in Trüper, 1994). Poleg omenjenih, obstaja še veliko slabo raziskanih izjemno slanah okolij (izjemno slana prst, puščavske rastline, stenske poslikave, slana področja naftnih polj in depoziti soli v Zemljini skorji) (Oren, 2002).

Izjemno slane vode glede na izvor delimo na talasohaline in atalasohaline. Talasohaline vode so derivat morske vode, zato je ionska sestava talasohaline vode enaka morski. Tipično talasohalino okolje je izjemno slana voda sončnih solin, ki nastane med evaporacijo morske vode. Prihaja do precipitacije in kristalizacije halita (NaCl), kalcita (CaCO₃), silvita (KCl) in nekaterih drugih mineralov, ostane pa z Mg²⁺ in Cl⁻ bogata slanica, ki je bolj kislota kot morska voda. Z nutrienti bogata slanica je posebna ekološka niša znotraj solin, kjer živijo le organizmi, ki tolerirajo ekstremno visoke koncentracije Mg²⁺ (Grant, 2004). Ionska sestava atalasohalinih vod je odvisna od geološke podlage, zato zanje niso značilne visoke vsebnosti kloridnih in natrijevih ionov (Galinski in Trüper, 1994). Ionska sestava je odvisna od geološke podlage, na kateri je nastalo jezero ali morje. Takšen primer je Mrtvo morje, ki je nastalo na obsežnih depozitih magnezijevih mineralov, zato Mg²⁺ prevladuje nad Na⁺ in Cl⁻ (Grant, 2004).

Izjemno slane habitate predstavljajo tudi s soljo in kisom konzervirana živila ter nekateri slani fermentirani izdelki kot je na primer sojina omaka. S soljo so pogosto konzervirani mesni izdelki in ribe. Tudi koža ljudi in živali ter površine aridnih rastlin so zaradi izločanja soli ugodna slana okolja za rast halofilnih in halotolerantnih mikroorganizmov (Galinski in Trüper, 1994). Vrednost a_w v izjemno slanah okoljih ne pade pod 0,75, kar sovpada z mejno vrednostjo koncentracije, pri kateri je dosežena točka nasičenja NaCl (5,2 M). Izjema so nekatera nezmrznjena antarktična jezera, ki so znana po zelo visoki koncentraciji CaCl₂. Raztopljene soli lahko presežejo 47%, kar ustreza a_w okoli 0,45 (Siegel, 1979).

2.2.1.3 Hrana z nizko vodno aktivnostjo

Rast gliv na hrani oz. kvarjenje hrane se prepreči z znižanjem vodne aktivnosti. Odvzem biološko dostopne vode, ki ga dosežemo s sušenjem (evaporacija, zmrzovanje) in dodajanjem topljencev, največkrat soli in sladkorjev, sta dva načina s katerima znižamo vodno aktivnost in inhibiramo rast gliv. Glede na način odvzeme biološko dostopne vode delimo hrano na suho, s sladkorji koncentrirano in slano (Pitt in Hocking, 2009).

2.2.1.3.1 Suha hrana

Suha hrana je definirana kot trda hrana z malo vlage, topnimi ogljikovimi hidrati in soli. Med suha živila sodijo žita (pšenica, ječmen, riž, oves, rž), moka, testenine, pekovski izdelki, koruza in koruzni izdelki, stročnice (soja, fižol, čičerika, mungo fižol), orehi, oreščki, arašidi, lešniki, mandlji, pistacija, kokosova moka, začimbe, kavna zrna, mleko v prahu in suho meso. Za ohranjanje suhe hrane je torej ključno vzdrževanje nizke a_w v skladiščnem prostoru, saj takšno hrano kvarijo kserofilne glive, ki so sposobne počasne rasti pri a_w od 0,75 do 0,68. Pomembno vlogo pri kvarjenju tovrstne hrane imajo *W. sebi* in vrste iz rodu *Aspergillus* in *Eurotium*. Žita so pogosto kontaminirana z glivami iz rodu *Penicillium*, medtem ko so orehi in oreščki občutljivi na invazijo gliv iz rodu *Aspergillus* (Pitt in Hocking, 2009).

2.2.1.3.2 Sladka hrana

S sladkorjem konzervirano hrano lahko dobimo z dodajanjem sladkorja ali pa s sušenjem sadja. Sladka hrana oziroma hrana z visoko vsebnostjo sladkorja se deli na čokolado, ne čokoladne produkte, tekoče sladkorje, sirupe in med. Med ne čokoladne produkte spadajo trdi in gumijasti bonboni, karamela, marcipan, kreme, želeji ter torte. Skupna lastnost vseh produktov z visoko vsebnostjo sladkorjev je nizka vodna aktivnost, ki znaša med 0,20 in 0,80. Nizka vodna aktivnost inhibira rast vseh patogenih bakterij in bakterij, ki povzročajo kvarjenje, le nekatere ozmofilne kvasovke in kserofilne glive so sposobne rasti na sladki hrani. Takšna hrana je idealen habitat za najbolj kserofilna mikroorganizma znana doslej, *Xeromyces bisporus* in *Zygosaccharomyces rouxii* (Pitt in Hocking, 2009).

Tipična hrana z visoko vsebnostjo sladkorja je med. Med je gosto tekoč ali kristaliziran naravni proizvod čebel, ki poleg enostavnih sladkorjev (fruktoza in glukoza), vsebuje še manjši del saharoze in druge sladkorje. Poleg ogljikovih hidratov med vsebuje še vodo, organske kisline, aminokisline in beljakovine, encime, vitamine, druge dušikove spojine, barvila, minerale in trdne delce. Vodna aktivnost medu je zelo nizka, med 0,50 in 0,60. Mikroorganizmi lahko v medu rastejo le, če se prilagodijo na visoko vsebnost sladkorja, kislost in antimikrobne snovi. Mnoge glive preidejo v med posredno preko čebel, rastlin ali cvetnega prahu, zato so v medu navadno navzoče v majhnem številu (Snowdon in Cliver, 1996).

2.2.1.3.3 Slana hrana

Minimalna a_w , ki se doseže z dodatkom NaCl, je 0,75. S soljo konzervirana živila (mesni izdelki, ribe) in slani fermentirani produkti (sojina omaka) spadajo med hiperslane habitate. Sol zniža vodno aktivnost, kar onemogoča rast številnim mikroorganizmom, ki bi živilo hitro pokvarili (Galinski in Trüper, 1994). Glavni soljen prehranski proizvod, ki se lahko pokvari zaradi naseljenih gliv, so soljene ribe. Le-te se kot prehranski produkt pojavljajo po celem svetu, predvsem v tropskih in zmernih klimatskih pasovih, kjer sol predstavlja glavno zaščitno sredstvo za ohranjanje svežosti živil. *W. sebi* je glavni kvarljivec tovrstne hrane (Frank in Hess, 1941), medtem ko so v Braziliji na soljenih ribah evidentirali tudi rast črne kvasovke *Hortaea werneckii*, ki velja za povzročitelja obarvanosti kože dlani («tinea nigra»). Tudi soljene in posušene ribe ter soljene in dimljene ribe so ugoden habitat za rast gliv (Pitt in Hocking, 2009).

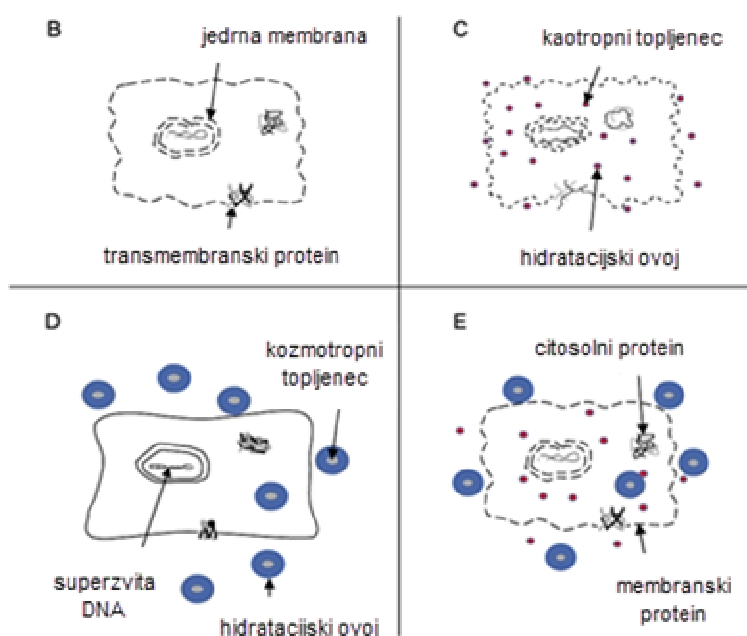
2.2.2 Stresna okolja s kaotropnim in kozmotropnim delovanjem

2.2.2.1 Kaotropni in kozmotropni efekt topljencev

Topljenci s kaotropnim efektom (formamid, etanol, urea, etilen glikol, butanol, NH_4NO_3 , glicerol fenol, natrijev benzoat, CaCl_2 in MgCl_2 (Brown, 1990)) podobno kot visoka temperatura destabilizirajo celične strukture, medtem ko jih topljenci s kozmotropnim efektom (saharoza, NaCl, MgSO_4) podobno kot nizka temperatura stabilizirajo

(Hamaguchi, 1962). Topljeneci s kozmotropnim učinkom zmanjšajo inhibično delovanje topljencev s kaotičnim učinkom (Hallsworth, 2007).

Slika 1 shematsko prikazuje vpliv topljencev s kaotičnim in kozmotropnim učinkom na makromolekule v primerjavi s celico, ki ni pod stresom (B). Posledice izpostavljenosti topljencem s kaotičnim učinkom so šibke elektrostatske interakcije in destabilizacija makromolekul (C), medtem ko so posledice izpostavljenosti topljencem s kozmotropnim učinkom močnejše elektrostatske interakcije in stabilizacija makromolekul (D). Kozmotropni učinek kompenzira kaotičnega (E) (Williams in Hallsworth, 2009).



Slika 1: Vpliv topljencev s kaotičnim in kozmotropnim učinkom na celično membrano in makromolekule (Williams in Hallsworth, 2009: 3300).

2.2.2.2 Kaotični učinek $MgCl_2$

Soli imajo pomembno vlogo v biosferi, kajti določajo dostopnost biološke vode in z različnimi aktivnostmi (ionski, kozmotropni in kaotični učinek) vplivajo na biološke sisteme. Najpogostejša sol v izjemno slanosti okoljih je NaCl, predvsem slanice in depoziti pa so bogati z drugimi solmi, kot je na primer $MgCl_2$. Največje zaloge $MgCl_2$ predstavljajo depoziti bišofita ($MgCl_2 \times 6H_2O$) v Zemljini skorji. Magnezij je v obliki $MgCl_2$ in $MgSO_4$

tretji najbolj zastopan element v morski vodi in splošno razširjen na Zemlji in drugih planetih v našem osončju. $MgCl_2$ je dobro topen v vodi, saj lahko doseže visoke koncentracije ($> 5 M$) v izjemno slanih vodah. V naravnih okoljih se koncentracija $MgCl_2$ gradientno giblje od 0,05 M do 5,05 M. Tak primer je obsežno izjemno slano jezero na dnu Sredozemskega morja, čigar voda je ponekod nasičena z $MgCl_2$ (Hallsworth, 2007).

Raztopina $MgCl_2$ je stresna za celico, zato je življenje v njej omejeno. Prva stresna aktivnost $MgCl_2$, ki omejuje življenje, je znižanje vodne aktivnosti, druga pa kaotropni efekt. Kaotropni efekt $MgCl_2$, sicer v manjši meri kot omejena dostopnost vode, omejuje življenje z destabilizacijo biološko aktivnih makromolekul. V *in vitro* pogojih že 1 M raztopina $MgCl_2$ popolnoma inhibira encime, medtem ko je rast mikroorganizmov inhibirana na gojiščih z dodanim 1,26 M $MgCl_2$. Z raziskavami mRNA, ki v okolju velja za pokazatelja aktivne mikrobne rasti, so pokazali, da je zgornja koncentracija $MgCl_2$, ki še omogoča življenje, 2,3 M (Hallsworth, 2007).

2.2.2.3 Življenje pod kaotropnimi pogoji

Kserofilne glive so najbolj odporni organizmi na vodni stres, saj preživijo v okoljih z vodno aktivnostjo pod 0,72, ki velja za mejno vrednost, ki še omogoča življenje. Pri teh organizmih vodna aktivnost ni limitirajoč dejavnik za življenje, ampak drugi okoljski dejavniki (kaotropni in kozmotropni efekt), ki vplivajo na strukturo makromolekul. Kaotropni topljenci ne denaturirajo makromolekul, ampak tudi zaščitijo tiste, ki so bolj stabilne (Hallsworth, 2007). Williams in Hallsworth (2009) sta kaofile definirala kot novo ekofiziološko skupino ekstremofilnih mikroorganizmov, ki optimalno rastejo pod kaotropnimi pogoji. Nekateri sevi glive *X. bisporus* rastejo najhitreje na gojišču s kaotropnimi pogoji in počasneje na gojišču z nevtralnimi ter kozmotropnimi pogoji.

2.3 ŽIVLJENJE V OZMOTSKO STRESNIH OKOLJIH

Za organizme, ki naseljujejo zelo slana ali zelo sladka okolja, je nizka količina biološko dostopne vode glavni omejujoči dejavnik. Glavni stresni dejavnik v takih okoljih je tako dehidracija, ki ji kserofilni organizmi kljubujejo na različne načine (Blomberg in Adler,

1992). Za mikroorganizme, ki so sposobni rasti v okoljih z znižano a_w , uporabljamo dva termina in sicer kserofili ter kserotolerantni mikroorganizmi. Medtem ko je potreba po znižani a_w pri kserofilih obligatna, lahko kserotolerantni mikroorganizmi rastejo tudi v okoljih brez znižane a_w . V splošnem so kserofili sposobni rasti pri nižjih a_w kot kserotolerantni mikroorganizmi, čeprav so bili oboji izolirani iz nasičene raztopine soli (Vreeland, 1987; Brown, 1990). Veliko kserofilov tolerira znižano a_w neodvisno od vrste topljenca, pri nekaterih pa se stopnja kserotolerance razlikuje v odvisnosti od vrste topljenca. Mikroorganizmi, ki rastejo v slanih okoljih z znižano a_w , so prilagojeni na povišane koncentracije soli, zato so pogosteje definirani kot halofili ter halotolerantni mikroorganizmi (Grant, 2004).

2.3.1 Življenje v izjemno slanih okoljih z znižano a_w

Mikroorganizmi so v izjemno slanih habitatih poleg nizke vodne aktivnosti, spreminjajoče se koncentracije soli (večinoma zelo visoke, občasno tudi nizke koncentracije soli), izpostavljeni še visokim temperaturam, UV sevanju, nizkim koncentracijam kisika, ki je slabo topen v okolju z visoko slanostjo in reaktivnim kisikovim spojinam, ki nastanejo zaradi slanostnega stresa (Petrovič, 2006).

Zgornja koncentracija NaCl, ki omogoča življenje vretenčarjem in nevretenčarjem, je 1.5 M, izjema je solinski rakec (*Artemia salina*), ki živi v izjemno slani vodi solin, če le-ta ni preveč alkalna (Oren, 1994). Alga *Dunaliella salina*, je dolgo veljala za edini evkariontski organizem izjemno slanih okolij, nato pa so Gunde-Cimerman in sodelavci (2000) iz izjemno slane vode solin izolirali številne kserofilne, halofilne in halotolerantne glive. Najpogostejši halofilni in halotolerantni predstavniki so melanizirane glive iz skupine črnih kvasovk (*Hortaea werneckii*, *Phaeothea triangularis*, *Trimmatostroma salinum*). Danes je črna kvasovka *Hortaea werneckii* najboljše opisan evkariontski halofil in primeren model za študije ozmoadaptacije halofilnih gliv, saj je glavna halofilna vrsta izolirana iz izjemno slanih vod.

2.3.2 Življenje na hrani z znižano a_w

Mikroorganizmi, ki poseljujejo hrano z znižano a_w , so izpostavljeni različnim stresnim dejavnikom. Poleg pomanjkanja vode so tu še temperatura, pH, kisik in različni inhibitorji, ki vplivajo na mikrobnou populacijo. Vrednost a_w večine sveže hrane je od 0,95 do 0,99, zato je ugoden substrat za vse mikroorganizme. Minimalna a_w za večina bakterij je 0,90, zato hrano z a_w pod to vrednostjo kolonizirajo predvsem kserofilne in kserotolerantne glive (Brewer, 1999). Večina mikroorganizmov, ki so patogeni za človeka, ne raste pod a_w 0,90, edina izjema je bakterija *Staphylococcus aureus*, ki je ekstremno kserotolerantna in preživi v slani hrani z a_w okoli 0,82 (Houtsma, 1996).

Zaradi točke nasičenja se vodna aktivnost slane hrane ne spusti pod 0,75. Nižje vrednosti doseže le hrana, ki vsebuje različne organske topljence, največkrat glukozo in fruktozo. Podobno vrednost doseže tudi sušena hrana, zaradi efekta vezave vodnih molekul na različne površine. Hrana na osnovi medu, sadnih sirupov, džemov, marmelad in suhega sadja, je glavni habitat kserofilnih gliv in kvasovk. Spodnja meja a_w , ki inhibira rast večine kserofilnih gliv in kvasovk, je med 0,80 in 0,75. Posebnost je gliva *X. bisporus*, ki edina raste pri a_w 0,61 in zato velja za najbolj kserofilen organizem opisan do danes. *X. bisporus* je obligatni kserofil, ker ne raste pri a_w večji od 0,97. (Pitt in Hocking, 2009).

Zygosaccharomyces rouxii je druga ekstremno kserofilna gliva kvasovka, ki raste pri a_w 0,62, hkrati pa tolerira tudi 20% NaCl (m/V) v substratu, kar ustreza a_w 0,85 (Tokuoka, 1993). Naseljuje in kviri tako koncentrirano sladko sadno hrano kot tudi vloženo in slano zelenjavo, raste pa tudi pod ekstremno kislimi pogoji. Med fermentacijo sladkorjev proizvaja CO₂, zato lahko zaradi povečanega notranjega pritiska pride do počenja steklenih embalaž (Eriksen in McKenna, 1999).

2.4 PRILAGODITVE NA OZMOTSKO STRESNO OKOLJE

Mikroorganizmi, ki so izpostavljeni okolju z znižano a_w , morajo razviti različne mehanizme, s katerimi se izognejo izgubljanju vode z osmozo. S tem ohranjajo minimalni turgorski pritisk, ki je potreben za celično preživetje in rast (Brown, 1990). Večina mikroorganizmov preživi le v okolju z a_w 0,9 in več. Gliva *Neurospora crassa* raste

optimalno v okoljih z a_w med 0,98 in 0,90, pod a_w 0,90 se njeno razmnoževanje in rast ustavita. V nasprotju pa kserofilni organizmi uspešno rastejo v okoljih z a_w 0,85 in manj. Zaustavitev rasti lahko preprečijo s prilagoditvijo na življenje v takih okoljih (Galinski, 1995). Prilagodijo se z različnimi strategijami, ki temeljijo na vzdrževanju izoosmotske citoplazme. Te prilagoditve so energetsko zahtevne (Oren, 1999).

Ko so organizmi za daljši čas izpostavljeni ekstremnim razmeram, so prilagoditveni odzivi odločilnega pomena za njihov obstoj. Prilagoditveni proces je kompleksen in se odvija tako na fiziološki, strukturni kot tudi molekularni ravni. Spreminjanje osmotskega pritiska sproži serijo biokemijskih odgovorov usmerjenih v vzdrževanje pozitivnega celičnega turgorja, ki je potreben za rast in preživetje celic (Larsson, 1990).

Celična plazemska membrana je prosto prepustna za vodo, zato vodna aktivnost v celici ne sme presegati vodne aktivnosti okolja. Visoke koncentracije topljenca v okolju namreč povzročijo izhajanje vode iz celice in posledično izgubo turgorja. Celice morajo biti v tesnem osmotskem razmerju z zunanjim medijem, kar se pri celicah s celično steno uravnovesi s hidrostatskim pritiskom skozi membrano (Horowitz, 1978).

2.4.1 Fiziološke prilagoditve na ozmotsko stresno okolje

Ozmoadaptacija pri kserofilnih in halofilnih mikroorganizmih na fiziološkem nivoju poteka z dvema strategijama. Prva je strategija produkcije ali akumulacije nizko molekularnih organskih molekul ali kompatibilnih topljencev, ki je značilna za vse kserofile in večina halofilov, druga pa je strategija vnosa anorganskih ionov oziroma soli v celico, ki je značilna za nekatere halofile. Obe strategiji zagotavljata ozmotsko stabilnost v celici (Brown, 1990).

Kompatibilni topljenci so majhne in polarne molekule, ki so produkt lastne sinteze ali pa so privzete iz okolja in pripomorejo k ozmotskemu ravnovesju. Njihova glavna značilnost je, da omogočajo učinkovito delovanje encimov in zato ne motijo presnovnih procesov v celicah. Pri fiziološkem pH so nenabite ali v obliki ionov dvojčkov (Oren, 1999).

Kompatibilni topljenci ščitijo proteine (encime) in druge makromolekulske strukture pred inaktivacijo, inhibicijo in denaturacijo v okoljih z znižano vodno aktivnostjo. Po definiciji kompatibilni topljenci nimajo direktnih interakcij s proteini, zato so preferenčno izključeni iz površine proteinov in hidratacijskega ovoja. Izključitev kompatibilnih topljencev iz hidratacijskega ovoja je termodinamski proces, ki zmanjša stopnjo entropije sistema in posledično stabilizira proteine (Wiggins, 1990).

Strukturno so razvrščeni v naslednje skupine: polioli (glicerol, arabitol, manitol), sladkorji in njihovi derivati (trehaloza, saharoza, glukozil-glicerol), betaini (dimetilsulfonijev propionat), amino kisline in njihovi derivati (prolin, glutamin, glutamat) in ektoini (Grant, 2004). Dimetilsulfonijev propionat je količinsko najbolj zastopan kompatibilni topljenec na Zemlji, saj ga sintetizira večina morskih alg. Razpad dimetilsulfonijskega propionata do atmosferskega vodikovega sulfida (H_2S) predstavlja pomemben člen kroženja žvepla v biosferi (Archer, 2001). Glavni kompatibilni topljenci pri bakterijah, ki kvarijo hrano, so prolin, glutamat, trehaloza in glicin betain, medtem ko kserofilne glive kopičijo predvsem glicerol in arabitol. Polioli, z glicerolom in arabitolom na čelu, so značilni za večino kserotolerantnih in kserofilnih rastlin ter za halofilne evkariontske mikroorganizme (*Dunaliella salina*), niso pa značilni za halofilne prokariote (Brown, 1990). Disaharidi in aminokisline imajo omejen potencial kot kompatibilni topljenci in so nakopičeni v nizkih koncentracijah medtem ko ektoine kopičijo halofilni mikroorganizmi, ki so sposobni rasti pri nasičenih koncentracijah NaCl (5,2 M) (Galinski, 1995).

Pri glivah so najbolj razširjeni polioli, med njimi so najpogostejši glicerol, treitol, eritritol, ribitol, arabitol, ksilitol, sorbitol, manitol in galaktitol. Večina gliv proizvaja glicerol in arabitol, nekatere med njimi tudi manjše količine eritritola (Galinski in Trüper, 1994). Glicerol je najbolj razširjen osmolit med evkarionti, kajti za njegovo zadrževanje v celici so potrebne posebne prilagoditve membran, ki so razvite samo pri evkariontih. Poleg tega je vodotopen in dobro ohranja aktivnost celičnih encimov. Njegova enostavna kemijska zgradba in nizka molekulska masa omogočata najnižjo porabo energije pri njegovi sintezi. Glicerol je energetsko zato najugodnejši kompatibilni topljenec, sledijo mu ektoin, glicin betain, glukozil glicerol, saharoza in trehaloza (Oren, 1999).

Nekatere celice vzdržujejo hiperozmotsko citoplazmo s kopičenjem anorganskih ionov. Tako zagotavljajo visoko znotrajcelično koncentracijo K^+ ionov, ki je osmotsko enakovredna ali večja kot zunanja koncentracija Na^+ ionov. Mehanizem vnosa soli temelji na izločanju Na^+ iz celice in akumulaciji K^+ v celici. Izločanje Na^+ iz celice je aktiven proces, ki ga omogoča Na^+/H^+ antiporter. Proces vodi protonski gradient, kar pomeni, da se del protonske gibalne sile porabi za vzdrževanje kalijevega gradienta v razmerju 100:1. (Galinski in Trüper, 1994).

Zagotavljanje ozmotskega ravnotežja z vnosom anorganskih ionov, najpogosteje s KCl, je značilno za halofilne prokariote, predvsem haloarheje iz reda *Halobacteriales* in anaerobne bakterije iz reda *Haloanaerobiales*. Ta strategija je energetsko varčnejša, vendar zahteva specifične prilagoditve znotrajceličnih struktur na povišano vsebnost KCl. V celicah aerobnih arhej in anaerobnih bakterij so encimi prilagojeni na povišano slanost, celični proteini pa kažejo specifične molekulske prilagoditve, kot je vsebnost velikih količin kislih aminokislin (glutamat in aspartat) ter majhne količine bazičnih (lizin in arginin) ter hidrofobnih aminokislin (Oren, 1999). Zaradi posebne aminokislinske strukture je površina proteinov negativno nabita in zato nestabilna, kar lahko vodi v denaturacijo. K^+ in drugi kationi so torej potrebni za nevtralizacijo negativnega naboja in posledično za stabilizacijo proteinov (Mevarech, 2000).

2.4.2 Morfološke prilagoditve na ozmotsko stresno okolje

Celična membrana predstavlja primarno bariero med celico in njenim zunanjim okoljem, zato je prilagodljivost membrane pomembna za preživetje celice. Organizem mora biti sposoben prilagajati lipidno sestavo spremembam razmer v okolju (Gunde-Cimerman in Plemenitaš, 2006). Pri glivah prvo obrambno linijo pred stresom v okolju predstavlja celična stena, zato je njena vloga ključna pri zagotavljanju preživetja v ekstremnih okoljih (Kapteyn in sod., 1999; Mager in sod., 2002).

Ključna lastnost, ki mora biti zagotovljena za normalno delovanje membrane, je fluidnost. Fluidnost membrane je odvisna od dolžine, razvejanosti in nasičenosti verig maščobnih kislin, polarnosti fosfolipidnih glav in vsebnosti sterolnih komponent. Večjo fluidnost

zagotavljajo kratkoverižne nenasičene maščobne kisline in čim manjša vsebnost sterolov v lipidnem dvosloju (Russell, 1989).

Bakterije se na spreminjajoče razmere v okolju prilagajajo z nenehnim spreminjanjem dolžine in nasičenosti repov maščobnih kislin in tako ohranjajo stalno fluidnost membrane. Fluidnost v slanem okolju ima odločilen pomen, saj stopnja fluidnosti določa prepustnost membrane za kompatibilne topljence. Bolj urejen lipidni dvosloj ima manjšo fluidnost in s tem tudi manjšo prepustnost za kompatibilne topljence (Oren, 1999).

Pri evkariontskih organizmih je prilagoditev na osmotsko stresna okolja v veliki meri odvisna od prepustnosti celične membrane za glicerol, ki velja za najpomembnejši kompatibilni topljenec med evkarionti. Celična membrana lahko samo s posebnimi prilagoditvami zagotavlja zadostno količino glicerola v celici. Ključno vlogo pri tem imajo steroli, ki povečujejo rigidnost celične membrane in zmanjšujejo prepustnost za glicerol (Oren, 1999). Fluidnost membrane halofilnih gliv je odvisna od lipidne sestave in od razmerja med fosfolipidi in steroli. Slanostni stres je pri črnih kvasovkah *Hortaea werneckii*, *Phaeotheca triangularis* in *Aureobasidium pullulans* povzročil spremembe v nasičenosti maščobnih kislin in vzdrževanje nizkega razmerja med fosfolipidi in steroli (Turk, 2004).

Glive se na ozmotsko stresna okolja odzovejo z reorganizacijo celične stene in citoskeleta (Slaninova, 2000) ter z prerazporeditvijo melanina, ki daje glivi temno barvo. Pri višji slanosti so granule melanina v celični steni tesneje organizirane kot pri nižji slanosti (Kogej, 2007). Celična stena gliv iz rodu *Wallemia*, ki so bile izpostavljene slanostnemu stresu, je odebeljena in strukturirana, kar povečuje celično integriteto in zagotavlja preživetje v okolju z znižano vodno aktivnostjo (Kralj Kunčič in sod., 2010).

2.4.3 Molekularne prilagoditve na ozmotsko stresno okolje

Ozmotski stres lahko na nivoju izražanja genov sproži prilagoditvene procese. Molekularne prilagoditve se izražajo na metabolnih procesih kot je npr. sinteza glicerola ali povečanje integritete celične stene. Poznavanje genov, ki sodelujejo pri prilagoditvenih

procesih na okolja z nižano a_w , pomaga razumeti strategije za preživetje organizmov v teh okoljih. Raziskava izražanja genov na celotnem genomu je bila izvedena na genomu črne kvasovke vrste *Hortaea werneckii*, pri kateri je bilo odkritih 95 genov, ki se bolj izražajo pri povišani slanosti okolja. Raziskava je pokazala, da med celičnimi procesi ozmoadaptacije pri halotolerantnih in na sol občutljivih glivah obstajajo pomembne razlike (Vaupotič in Plemenitaš, 2007).

Spremembe v osmotskem pritisku, ki nastanejo zaradi spremembe v koncentraciji soli, vodijo v transkripcijo mnogih odzivnih genov. Pri tem nastali proteini pomagajo pri prilagajanju na stres. Med najpomembnejšimi biokemijskimi odzivi je biosinteza in kopičenje glicerola v citosolu, s katerim se vzpostavi osmotsko ravnovesje med zunanjim okoljem in celico (Vaupotič in Plemenitaš, 2007).

Pri zaznavanju hiperozmotskega šoka, ima glavno vlogo signalna pot HOG (»high osmolarity glycerol«). Ta signalna pot je najbolj poznana kaskada signalne poti MAPK (»mitogen-activated protein kinase«). Signalna pot HOG je ključna za regulacijo večine glavnih genov, ki so potrebni za odgovor na hiperozmotski stres. Signalna pot HOG zaščiti celico tudi pred temperaturnim in oksidativnim stresom, prav tako pa so produkti signalne poti vpleteni tudi v vzdrževanje integritete celične stene (Hohmann, 2002).

2.5 ROD *Wallemia*

Wallemia je kozmopolitski rod kserofilnih bazidiomicetnih gliv, ki so pomemben vzrok za kvarjenje sladke (sadje, marmelada, peciva, sladkor), slane (ribe, meso, arašidi) in sušene hrane (kruh, moka, žita, poper, riž, soja) (Pitt in Hocking, 1997). Prvotno so glivo *Wallemia sebi* opisali kot halofilno (Frank in Hess, 1941), kasneje pa so jo uvrstili med kserofilne predstavnike bazidiomicetnih gliv, saj so jo osamili iz okolij z nižano vodno aktivnostjo, neodvisno od vrste topljenca (Pitt in Hocking, 1977). Rod *Wallemia* je prvič opisal Johan-Olsen leta 1887 in sicer kot kserofilno glivo, ki raste zelo počasi in tvori posebno oblikovane konidije. Poimenoval jo je *W. ichthyophaga*. Leta 1970 je bil opisan rod *Sporendonema* Desm. kot sinonim rodu *Wallemia*, znotraj katerega je bila opisana nova kombinacija *Sporendonema sebi* Fries za vrsto *Wallemia sebi* (Fries). Na podlagi

edinstvene morfologije, evolucije in kserotolerance pri izolatih iz slane vode Sečoveljskih solin, so izvedli obsežno taksonomsko raziskavo, na podlagi katere so opisali tri vrste znotraj rodu *Wallemia*: *W. ichthyophaga*, *W. muriae* in *W. sebi*. Rod *Wallemia* uvrščajo v svoj razred in red, *Wallemiomycetes* in *Wallemiales*, znotraj bazidiomicetnih gliv (Zalar in sod., 2005).

2.5.1 Taksonomija in filogenija

Moore (1986) je rod *Wallemia* (družina *Wallemiaceae*) na podlagi ultrastrukture septalnih por in parentosoma uvrstil v red *Filobasidiales* znotraj bazidiomicetnih gliv. Posebna filogenetska pozicija ter edinstvena morfologija (bazoavksalni tip konidiogeneze, dolipore, artrosporam podobni konidiji) in fiziologija (kserofilija) so dejstva, ki rod *Wallemia* danes uvrščajo v svoj razred in red, *Wallemiomycetes* in *Wallemiales*, znotraj bazidiomicetnih gliv. Predstavlja zgodaj odcepljeno vejo znotraj debla Basidiomycota, kamor spadajo še rje (*Pucciniomycotina*), sneti (*Ustilaginomycotina*) in gobe (*Agaricomycotina*).

Rod *Wallemia* je bil podvržen prilagoditvenemu evolucijskemu procesu na osmotsko stresna okolja, zato ima verjetno ločeno pozicijo v skupini bazidiomicetnih gliv. Predstavlja enega filogenetsko najstarejših taksonov gliv in je redek rod med bazidiomicetnimi glivami, ki ga najdemo v okoljih z nizko vodno aktivnostjo. Filogenetska pozicija rodu *Wallemia* je bila narejena s pomočjo primerjav nukleotidnih zaporedij majhne jedrne podenote ribosomske DNK (SSU rDNK) referenčnih sevov (Matheny in sod., 2006; Zalar in sod., 2005).

Za rod *Wallemia* so značilne tudi številne substitucije nukleotidov v SSU rDNK, ki jih pri drugih taksonih gliv ne najdemo. Te so se nakopičile med evolucijo ali pa obstajajo zaradi izumrtja bližnjih sorodnikov rodu *Wallemia*, kar nakazuje filogenetsko starost rodu (Zalar in sod., 2005).

Kljub morfološki in fiziološki podobnosti obstajajo velike razlike v nukleotidnem zaporedju ITS rDNA med *W. ichthyophaga* na eni strani ter *W. sebi* in *W. muriae* na drugi strani. Radialni dendrogram, ki temelji na ITS rDNA, kaže na veliko sorodnost *W. sebi* in

W. muriae in od njiju molekularno oddaljeno vrsto *W. ichthyophaga* (Zalar in sod., 2005). Sekvenci ITS rDNA *W. sebi* in *W. muriae* se dobro pokrivata, medtem ko se sekvenca *W. ichthyophaga* slabo pokriva s sekvencami *W. sebi* in *W. muriae*, predvsem zaradi številnih manjkajočih nukleotidov znotraj sekvence *W. ichthyophaga*. Razlog za to so izumrle ali pa do danes še ne opisane vrste med *W. ichthyophaga* ter *W. sebi* in *W. muriae* (Zalar in sod., 2005).

2.5.2 Fiziologija in ekofiziologija

Predstavniki rodu *Wallemia* so iz ekofiziološkega stališča tipični kserofili. Raziskave kserofilije so pokazale, da rod *Wallemia* spada med najbolj kserofilne taksone gliv. Kserofilija je bolj značilna za askomicetne glive (*Aspergillus*, *Eurotium*, *Xeromyces*), pri bazidiomicetnih glivah pa je izjemno redka. Za vrsti *W. ichthyophaga* in *W. muriae* je potreba po nižani vodni aktivnosti substrata obvezna, medtem ko *W. sebi* lahko aktivno raste tudi v okolju brez dodatnih topljencev, to je pri a_w blizu 1. Med vsemi tremi vrstami najbolj kserofilni značaj kaže *W. ichthyophaga*, ki raste v okolju z a_w od 0,96 do 0,77, optimalno rast doseže pri a_w 0,90. *W. ichthyophaga* je hkrati tudi najbolj halofilni evkariontski organizem opisan doslej. Tudi na substratu z nasičeno raztopino soli je metabolno aktivna in izkazuje posebne morfološke lastnosti. *W. muriae* raste pri a_w od 0,98 do 0,83, optimalno rast doseže pri a_w 0,96. Vrsta *W. sebi* lahko raste na substratih brez znižane a_w 0,99 do 0,83, optimalno rast doseže pri a_w med 0,97 in 0,95 (Zalar in sod., 2005).

Vrste iz rodu *Wallemia* rastejo v tekočem gojišču YNB z dodatkom NaCl v razponu od 0 do 32% NaCl. *W. ichthyophaga* raste v gojišču s koncentracijo NaCl od 9-32%, rastni razpon *W. muriae* sega od 4-25% NaCl v gojišču YNB, medtem ko je *W. sebi* edina vrsta, ki raste v gojišču YNB brez dodanega NaCl; zadnje gojišče YNB, v katerem je še uspela rasti, je vsebovalo 27% NaCl (Kralj Kunčič in sod., 2010).

Tudi različni topljenci, pH in temperatura vplivajo na inaktivacijo konidijev vrste *W. sebi*. Gliva bolje raste v gojiščih z dodatkom glukoze in sorbitola kot v gojiščih z NaCl. Njeni konidiji so občutljivi na temperaturo nad 48 °C. Optimum predstavlja temperatura med

23°C in 25 °C, pri 5 °C gliva ni več zmožna rasti, maksimum dosežejo pri 36 °C (Patriarca in sod., 2001). Vrsta *W. sebi* optimalno raste pri pH 6,5 in še vedno izkazuje rast pri pH 3,71 (Beuchat in Pitt, 2001). Slednji podatki se nanašajo na do nedavnega edino opisano vrsto *W. sebi*, za katero pa danes vemo, da je v resnici kompleks vrst.

2.5.3 Morfologija

Vse tri vrste imajo morfološko podobne konidiofore, kjer nastajajo artrosporom podobni konidiji, ki so značilno združeni v enotah po štiri. Morfologija konidioforov in bazoavksalni tip konidiogeneze sta edinstvena v kraljestvu gliv in posebno značilna za vrsto *W. sebi*, vendar sta značilna tudi za ostali dve vrsti. *W. ichthyophaga* kaže drugačne morfološke značilnosti kot ostali dve vrsti, ki sta med seboj zelo podobni, kar kaže na njeno molekulsko odmaknjenost (Zalar in sod., 2005).

Kolonije vrste *W. sebi* so zelo raznolike, odvisno na katerem gojišču so zrasle. So točkaste, kompaktne, prašnate, rjave do škrlatno rjave barve. Kolonije se širijo v agar in na trdih gojiščih dosežejo premer 3,0-6,0 mm. Oblika kolonij je na različnih gojiščih različna, lahko dvignjena, značilno obrobljena s prepletom hif. Rob je bel ali enake barve kot kolonije, valovit, nepravilen, površina pa gladka, vendar žametna v centru. Zaradi močne sporulacije so kolonije lahko prašnate, včasih je prisoten eksudat. Hife vrste *W. sebi* so hialine, gladke, s tanko celično steno in tvorijo kompakten micelij. Konidiofori so gosti, pokončni, paralelno razvrščeni, nerazvejani, z gladko steno, proti vrhu rahlo zoženi, kjer nastajajo fertilne konidiogene celice. Fertilne konidiogene celice so cilindrične, iz teh se bazipetalno razvijejo po štiri artrosporom podobni konidiji. Konidiji so blede rjavi, na začetku kubični oziroma kratki in cilindrični, kasneje sferični. V premeru merijo 1,5-2,5 µm in tvorijo 1 mm dolge ravne verige. Verižice konidijev med sosednjimi konidiofori se tesno prepletajo, ostanejo združene v kolonijah ali se preprosto ločijo in tvorijo satelitske kolonije (Zalar in sod., 2005).

Kolonije vrste *W. muriae* so točkaste, orehove do rdeče-rjave barve. Kolonije se širijo v agar in na trdih gojiščih dosežejo premer 3,0-5,0 mm. Kolonije so rahlo dvignjene in značilno obrobljene s prepletom hif, zaradi močne sporulacije lahko izgledajo prašnate.

Včasih je prisoten eksudat v obliki rumenih kapljic. Hife vrste *W. muriae* so hialine, gladke, s tanko celično steno, debele 2,5-3,5 μm in tvorijo kompakten micelij. Konidiofori so nerazvejani in se dvigujejo lateralno od hife, proti vrhu so rahlo zoženi, kjer se podaljšujejo v fertilno konidiogeno celico. Fertilne konidiogene celice so cilindrične, iz teh se bazipetalno razvijejo po štiri artrosporam podobni konidiji. Konidiji so blede rjavi, na začetku cilindrični, nato sferični, s približno 1 μm debelo celično steno. V premeru merijo 2,5-3,0 μm in tvorijo verige (Zalar in sod., 2005).

Kolonije vrste *W. ichthyophaga* so točkaste, po obliki podobne možganom, prašnate, mehke, vlažne in različnih barv (od prozorne do temno rjave). Na trdnih gojiščih dosežejo premer 3,0-5,0 mm in višino 3 mm, eksudat ni opazen. Hife vrste *W. ichthyophaga* so hialine, gladke, 4,0-10,0 μm široke, celična stena do 2,0 μm debela. Hife tvorijo nepravilno razvejan micelij. Konidiofori so posamezni, nerazvejani z gladko steno, rahlo zoženi pod vrhom. Fertilne konidiogene celice so cilindrične, iz teh se bazipetalno razvijejo po štiri artrosporam podobni konidiji. Konidiji so blede rjavi, na začetku kratko cilindrični, nato postanejo sferični z debelo steno. Konidiji v premeru merijo do 10,0 μm , v skupkih lahko tvorijo sarcinam podobne strukture. Morfologija spominja na meristematske celične skupke črnih kvasovk, ko rastejo v okolju z visoko slanostjo (Zalar in sod., 2005).

2.5.4 Ekologija

Razlike v stopnji kserofilije med tremi vrstami rodu *Wallemia* ne sovpadajo s habitati, kjer se posamezna vrsta pojavlja. Predstavniki vseh treh vrst so bili izolirani tako iz hiperslane vode solin kot iz posušene hrane (Zalar in sod., 2005). Podatkov o ekologiji gliv iz rodu *Wallemia* je malo pa še ti so vezani samo na vrsto *W. sebi*. Kserofilija, hitra sporulacija ter majhne in enostavno disperzibilne spore so pogoj, da je *W. sebi* ubikvitarna (Pitt in Hocking, 1999). Znani so izolati iz Avstralije, Japonske, Jugovzhodne Azije, Evrope, Velike Britanije, Kanade, ZDA (Saito, 1971) in od drugod.

Dolgo je bila potrjena samo kot kvarljivka posušenih in slanih rib v tropskih območjih (Frank in Hess, 1941), kasneje pa so jo izolirali iz različnih vrst hrane, posebej iz posušenih proizvodov (suhe slive, rozine, grah, fižol), javorjevega sirupa, marmelad, riža

in začimb (suh čili, poper). Potrjeni so tudi izolati iz različnih žit, kruha, mleka, kondenziranega mleka, džemov, želejev, marcipanovih sladice, sala, ingverjevega kruha, orehov, mesnih proizvodov in testenin. *W. sebi* je bila na Tajskem najdena v koruzi, arašidih, indijskih oreščkih in soji, v Indoneziji v arašidih, koruzi, neoluščenem in brušenem rižu, soji in mungo fižolu (rdeča in zelena soja) ter na Filipinih v arašidih, koruzi, soji, mungo fižolu in črnem popru. V Severni Ameriki so *W. sebi* izolirali iz različnih žit (Pitt in Hocking, 1999).

Zalar in sod. (2005) so v raziskavo vključili tudi seve *W. sebi* izolirane iz sončničnih in drugih semen, medu, ječmena, rži ter različnih tort. Potrjeni so tudi sevi izolirani iz morske soli, hiperslane vode solin, kmečkega okolja, sena, silosov in slamnatega klobuka. *W. sebi* je prisotna tudi v zaprtih prostorih, vendar je redko evidentirana, ker se za vzorčenje zraka v zaprtih prostorih uporabljajo gojišča z visoko vodno aktivnostjo. Z uvedbo ustreznih gojišč, je bilo pridobljenih veliko izolatov *W. sebi* iz plesnivih zgradb. Takšna gojišča z znižano vodno aktivnostjo se uporabljajo tudi pri vzorčenju zraka v zaprtih prostorih za detekcijo kserofilnih gliv (Samson in Hoekstra, 1994).

W. sebi se pogosto pojavlja v kmetijskih okoljih v povezavi s suhim senom, slamo, žiti in skednji. S pomočjo vzorčenje zraka in detekcije s PCR na Švedskem, Kitajskem in v ZDA so pokazali, da je *W. sebi* ena izmed dominantnih gliv v kmetijskih okoljih. Na Švedskem so jo zasledili v 6% vzorcev zraka, kjer se pojavlja v obliki spor in hifnih fragmentov (Wang, 2004).

W. ichthyophaga se pojavlja v hiperslani vodi solin v Sloveniji in Namibiji, na soljenem mesu in ribah ter na kristalnih soli v obliki sarcinam podobnih celic. Čeprav lahko raste na sladkem gojišču, do zdaj še ni bila izolirana iz okolja z visoko vsebnostjo sladkorja. *W. muriae* je bila izolirana iz sladke hrane (med, torta), slane hrane (arašidi), hiperslane vode solin po celem svetu, suhih substratov (slama, semena), zaprtih prostorov in žuželk (poginula kobilica) (Zalar in sod., 2005).

2.5.5 Prilagoditve na okolja z znižano vodno aktivnostjo

Vrsta *W. sebi* kopiči glicerol kot glavni kompatibilni topljenec, ko raste na substratih z znižano a_w . Na gojišču z glukozo in fruktozo poleg teh dveh topljencev kopiči še glicerol in tudi manitol in arabitol (Hocking in Norton, 1983), medtem ko na gojišču z NaCl kopiči predvsem glicerol (Hocking, 1986). Pri nižji slanosti sta količini glicerola in arabitola precej podobni, pri višji slanosti pa se vsebnost glicerola poveča. Vsebnosti topljencev in kationov so nizke, kar kaže na to, da poteka osmoadaptacija pri glivah iz rodu *Wallemia* še na drugih nivojih. Vse tri vrste so imele v citoplazmi višje vrednosti Na^+ kot K^+ ne glede na slanost, pri višjih slanostih pa je bilo razmerje med K^+ in Na^+ nižje. Z dvodimenzionalno elektroforezo proteinov celične stene je potrjena prisotnost bazičnih proteinov. Pri višji slanosti se je pri *W. ichthyophaga* izražal protein, ki je vključen v glikolizo. Raziskava diferencialnega izražanja genov vrste *W. ichthyophaga* pri nizki in visoki slanosti je nakazala povezavo med procesi strukturiranja celične stene in glivne osmoadaptacije (Zajc, 2009).

2.5.6 Mikotoksini in patogeneza

Za človeka so glive iz rodu *Wallemia* oportunistični patogeni, saj so lahko vpletene v različna bolezenske stanja. Znanih je nekaj primerov okužb, katerih povzročitelj je bila *W. sebi* (Guarro in sod., 2008). Majhni in okrogli konidiji med dihanjem zlahka dosežejo pljučne bronhiole, kjer pride do alergijske reakcije, ki povzroča bronhialno astmo (Sakamoto, 1989). *W. sebi* je pomembna pri razvoju bolezni kmetovih pljuč v vzhodni Franciji (Reboux, 2001), povzroča pa tudi podkožne infekcije (de Hoog, 2000). Wood in sodelavci (1990) so iz nekaterih sevov *W. sebi* izolirali dva toksična metabolita, valeminol A in valeminol B oz. valeminon. Valeminol je po strukturi triciklični dihidroksi-seskviterpen, ki po do zdaj znanih podatkih pri človeku *in vivo* ne povzroča patoloških znakov. Valeminol pa ni edini aktivni metabolit, ki so ju določili pri *W. sebi*, saj sta opisani še spojini UCA 1064-A (Chamberlin, 1974) in UCA 1064-B, ki kažeta protibakterijsko in protiglivno, spojina UCA 1064-B pa tudi protitumorsko delovanje (Takahashi, 1993).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 KEMIKALIJE, PRIBOR IN APARATURE

3.1.1 Kemikalije

V Preglednici 1 so zbrane kemikalije, ki smo jih uporabili pri raziskovalnem delu.

Preglednica 1: Kemikalije uporabljene pri raziskovalnem delu.

Kemikalija	Proizvajalec	Država
(NH ₄) ₂ SO ₄	Riedel - de Haën, Seelze, Hanover	Nemčija
10x PCR pufer brez MgCl ₂	Fermentas, Life Sciences	Litva
Agar agar	Merck, Darmstadt	Nemčija
Agaroz	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe	Nemčija
Borova kislina	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe	Nemčija
Bromtimol modro	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
Celit	Merck, Darmstadt	Nemčija
Citrat	Merck, Darmstadt	Nemčija
Citronska kislina	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe	Nemčija
CTAB (Etilendiamintetraocetna kislina)	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
D-(-)-manitol	Kemika, Zagreb	Hrvaška
D-(-)-riboza	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
D-(+)-celobioza	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
D-(+)-galaktoza	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
D-(+)-glukoza	Kemika, Zagreb	Hrvaška
D-(+)-ksiloza	Merck, Darmstadt	Nemčija
D-(+)-melibioza	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
D-(+)-rafinoza	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
D-(+)-saharoza	Acros organics, Geel	Belgija
D-(+)-trehaloza dihidrat	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
D-arabinoza	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
D-glukoronska kislina	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
D-glukozamin hidroklorid	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
dNTP	Applied Biosystems, California	ZDA
D-sorbitol	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
EDTA	Merck, Darmstadt	Nemčija
Etanol 96%	Chemo d.d., Ljubljana	Slovenija
Fruktoza	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
Galaktitol (Dulcitol)	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
Glicerol bidestilat	KEFO d.o.o., Ljubljana	Slovenija
Glicerol	Chemo d.d., Ljubljana	Slovenija
HCl	Kemika, Zagreb	Hrvaška
Hitin	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
ITS4 oligonukleotidno zaporedje	Jena Bioscience GmbH, Jena	Nemčija

Kemikalija	Proizvajalec	Država
ITS5 oligonukleotidno zaporedje	Jena Bioscience GmbH, Jena	Nemčija
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt	Nemčija
KCl	Merck, Darmstadt	Nemčija
Kloramfenikol	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
Kloroform	Kemika, Zagreb	Hrvaška
KNO ₃	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
Kvasni ekstrakt	Difco laboratories, Detroit, Michigan	ZDA
L-(+)-arabinoza	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
Laktoza	Torlak, Beograd	Srbija
100bp DNA Ladder Plus	Fermentas, Life Sciences	Litva
L-lizin	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
L-sorboza	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
Maltoza	Difco laboratories, Detroit, Michigan	ZDA
Mezo-eritrol	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	Merck, Darmstadt	Nemčija
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt	Nemčija
Mio-inozitol	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
N-Acetil-D-glukozamin	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
NaCl	Merck, Darmstadt	Nemčija
NaNO ₂	Merck, Darmstadt	Nemčija
NaOH	Merck, Darmstadt	Nemčija
Pepton	Merck, Darmstadt	Nemčija
Ribitol (Adonitol)	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
Silikagel	Merck, Darmstadt	Nemčija
Sirotko	Molkosan [®] , A. Vogel	Nemčija
Sladni ekstrakt	Biolife, Milan	Italija
Sukcinat	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
Taq polimeraza (5U/μl)	Fermentas, Life Sciences	Litva
Topni škrob, ACS reagent	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
Trikloroocetna kislina (TCA)	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
Tris baza	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
Tween 80	Biolife, Milan	Italija
YCB (Yeast Carbon Base)	Beton, Dickinson and Company, Sparks, MD	ZDA
YNB (Yeast Nitrogen Base)	Beton, Dickinson and Company, Sparks, MD	ZDA
α-(L)-ramnoza	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA
α, α trehaloza	Sigma Chemical C., St. Luis, Mo.	ZDA

3.1.2 Laboratorijski pribor

- Aluminijasta folija in PVC vrečke;
- API ZYM test (BioMerieux);
- avtomatske pipete Eppendorf;
- cepilne zanke (eze);

- filtri za injekcijske brizge (0,22 µm);
- filtrirni papir;
- injekcijske brizge;
- imerzijsko olje;
- kapalke;
- laboratorijska steklovina (erlenmajerice, čaše, menzure, epruvete, infuzijke);
- laboratorijske rokavice;
- mikrocentrifugirke (1500 µl in 2000 µl) ;
- nastavki za avtomatske pipete;
- objektna in krovna stekelca;
- odlagalniki;
- parafilm in cigaretni papir;
- pincete, skalpeli, škarje, spatule, žličke, igle, steklene palčke;
- plastične banjice;
- plastične in steklene petrijevke;
- plastične cepilne zanke za enkratno uporabo;
- plinski vžigalnik
- sistem za vakuumsko filtriranje;
- steklene in plastične Pasteurjeve pipete;
- stojala za epruvete;
- vata in vatirane palčke.

3.1.3 Aparature

V Preglednici 2 so zbrane aparature, ki smo jih uporabili pri raziskovalnem delu.

Preglednica 2: Aparature uporabljene pri raziskovalnem delu

Naprava	Proizvajalec	Država
Avtoklav A-63C	Kambič	Slovenija
Bunsenov plinski gorilnik	TLOS, Zagreb	Hrvaška
Centrifuga	Eppendorf, Hambur	Nemčija
Digestorij Variolab Molibien W90	Waldner, Wangen	Nemčija
Digitalni fotoaparatus DP12	Olympus, Tokio	Japonska
Električni transformator Consort E143	Sigma-Aldrich, St. Luis, MO	ZDA
Elektroforezna banjica E33	Hofer, San Francisco, CA	ZDA
Inkubator (25 °C)	Kambič, Semič	Slovenija
Inkubator (30 °C)	Sutjeska, Beograd	Srbija
Laminarij IBK 1V2	Iskra	Slovenija
Magnetno mešalo Rotamix 550MMH	Tehtnica, Železniki	Slovenija
Mikroskop Olympus BX51	Olympus, Tokio	Japonska
Mikrovalovna pečica	Gorenje	Slovenija
PCR sistem Eppendorf	Eppendorf, Hamburg	Nemčija
pH meter Metrom 713	Tehtnica, Železniki	Slovenija
pH meter SevenEasy	Mettler Toledo, Columbus, Ohio	ZDA

Naprava	Proizvajalec	Država
Stereomikroskop Steri SV11	Zeiss, Oberkochen	Nemčija
Stresalnik INNOVA	New Brunswick Scientific, New Jersey	ZDA
Tehtnica ET-1111	Tehtnica, Železniki	Slovenija
Transiluminator	Syngene	ZDA
Vodna kopel	Pharmacia Biotech, Uppsala	Švedska
Vrtinčasto mešalo (vortex)	Tehtnica, Železniki	Slovenija

3.2 GOJIŠČA, RAZTOPINE, ZMESI IN PUFRI

3.2.1 Gojišča

Gojišča smo pripravljali tako, da smo večina destilirane vode dali v čašo z magnetnim mešalom in nato dodajali suhe sestavine. Ko so se vse sestavine raztopile, smo raztopino prelili v merilni valj in dolili destilirano vodo do ustreznega volumna. S pomočjo pH metra ter ustreznih kislin in baz smo umerili pH, ponavadi pred dodatkom agarja. Gojišča smo avtoklavirali (15 minut pri 121 °C) v erlenmajericah, ki smo jih pokrili z aluminjasto folijo. Po končanem avtoklaviranju smo gojišča v vodni kopeli ohladili na 55 °C, po potrebi dodali antibiotik in jih aseptično nalili v plastične petrijevke. Strjena in ohlajena gojišča smo zložili v plastično vrečko in jih do uporabe hranili v hladni komori.

a) Gojišče MEA

sladni ekstrakt (»Malt Extract«)	20 g
glukoza	20 g
pepton	1 g
agar	20 g
destilirana voda	do 1000 ml
pH 7,0	

V gojišče z 10% NaCl smo dodali 100 g NaCl, v gojišče z 17% NaCl pa 170 g NaCl.

b) Gojišče MY50G

sladni ekstrakt (»Malt Extract«)	20 g
kvasni ekstrakt (»Yeast Extract«)	5 g

glukoza	500 g
agar	20 g
destilirana voda	do 1000 ml
pH 7,0	

c) Gojišče YNB (gojišče s kvasnim ekstraktom in dušikovo osnovo)

YNB («Yeast Nitrogen Base«)	6,7 g
glukoza	20,0 g
agar	20,0 g
destilirana voda	dopolnimo do 1000 ml
pH 7,0	

V gojišče z 10% NaCl smo dodali 100 g NaCl, v gojišče z 17% NaCl pa 170 g NaCl.

d) Kompleksno tekoče gojišče za API ZYM test

sirotka	10 g
kvasni ekstrakt («Yeast Extract«)	1 g
sončnično olje	5 ml
glukoza	10 g
pepton	5 g
glicerol	1 ml
topni škrob	5 g
hitin	5 g
KH_2PO_4	2 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,2 g
urea	0,3 g
CaCl_2	0,3 g
raztopina $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 ml
raztopina $\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	1 ml
raztopina $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	1 ml
raztopina $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	1 ml
destilirana voda	do 1000 ml
pH 6,5	

e) Gojišče z 0,1% konjugiranim polisaharidom

kvasni ekstrakt (»Yeast Extract«)	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
agar	15 g
konjugirani polisaharid	1 g
destilirana voda	do 1000 ml
pH 6,5	

Uporabili smo naslednje polisaharide: hidroksietil celuloza, škrob, galaktomanan in glukran z vezanim barvilom ostazin briljant rdeče ter glukoronoksilan in hidroksietil škrob z vezanim barvilom remazol briljant modro. Avtoklavorali smo 10 minut pri 121 °C.

f) Gojišče s kazeinom in 10% NaCl za ugotavljanje proteazne aktivnosti

posneto mleko v prahu	50 g
kvasni ekstrakt (»Yeast Extract«)	1 g
NaCl	100 g
agar	20 g
destilirana voda	do 1000 ml
pH 6,9	

Avtoklavorali smo 10 minut pri 121 °C.

g) Gojišče s Tween 80 in 10% NaCl za ugotavljanje esterazne aktivnosti

raztopina Tween 80 (10%)	100 ml
kvasni ekstrakt (»Yeast Extract«)	10 g
CaCl ₂ × 2H ₂ O	0,1 g
NaCl	100 g
bromkrezol	25 mg
agar	15 g
destilirana voda	do 1000 ml

Avtoklavorali smo 10 minut pri 121 °C.

3.2.2 Raztopine

Raztopine smo pripravljali tako, da smo večina destilirane vode dali v čašo z magnetnim mešalom in nato dodajali suhe sestavine. Ko so se vse sestavine raztopile, smo raztopino prelili v merilni valj in dolili destilirano vodo do ustreznega volumna. Raztopine smo avtoklavirali (15 minut pri 121 °C) v infuzijskih stekleničkah.

a) Fiziološka raztopina

NaCl	8,5 g
destilirana voda	do 1000 ml
pH 6,9	

b) 10% raztopina NaCl

NaCl	100 g
destilirana voda	do 1000 ml
pH 6,9	

c) 1 M raztopina MgCl₂

MgCl ₂ × 6 H ₂ O	20,33 g
destilirana voda	do 1000 ml
pH 6.9	

d) 1 M raztopina MgSO₄

MgSO ₄ × 7 H ₂ O	24,65 g
destilirana voda	do 1000 ml
pH 6.9	

e) Raztopina za pripravo suspenzije spor («Spore Suspension Solution«)

Tween 80	0,5 g
agar	0,5 g
destilirana voda	do 1000 ml

3.2.3 Pufri, reagenti in druge zmesi

a) TE puffer

Tris baza	12 g
Na-EDTA	4 g
ultra čista voda	do 1000 ml
pH 8,0	

b) CTAB puffer

Tris baza	24,2 g
NaCl	82 g
Na-EDTA	74 g
CTAB	20 g
destilirana voda	do 1000 ml
pH 7,5	

c) 1x TAE puffer

Tris baza	242,0 g
ocetna kislina	57,1 ml
0,5 M EDTA (pH 8)	100 ml
destilirana voda	do 1000 ml

d) Reagent ZYM A

Tris-hidroksimetil-aminometan	250 g
HCl	110 ml
SDS (natrijev dodecil sulfat)	100 g
destilirana voda	do 1000 ml

3.3 METODE DELA

3.3.1 Vzorčenje ozmotsko stresnih okolij

Pri vzorčenju smo uporabljali osnovna izolacijska gojišča (MEA, MY50G, YNB) z antibiotikom kloramfenikol (Ch), ki smo jih modificirali z dodatkom soli NaCl (MEA 10% NaCl + Ch, MEA 17% NaCl + Ch, YNB 20% NaCl + Ch, MY10 – 12 + Ch).

Na izolacijsko gojišče smo odtisnili ali nanegli del substrata (rastlinski substrati), sipke substrate (žito, pesek, pelod) smo po gojišču raztresli, medtem ko smo iz večjih substratov (stena) odvzeli bris z vatenko (vatirana palčka). Suspenzibilne substrate (pelod) smo razredčili s sterilno destilirano vodo in jih s sterilno spatulo razmazali po gojišču. Večje količine tekočih substratov (voda iz solin, sladkorna raztopina, raztopina halita) in razsipne substrate (žito, pesek), ki smo jih predhodno namočili v sterilni destilirani vodi, smo s pomočjo sesalnega filtrirnega sistema filtrirali skozi filtrirni papir s porami velikosti 0,22 µm. Filtrirni papir smo položili na gojišče. Zrak smo vzorčili tako, da smo ploščo z gojiščem odkrili in dalj časa pustili izpostavljeno zraku. V izjemno slano vodo in mulj solin smo nastavili proteinske pasti. Kose pršuta in ribjega mesa smo dali v plastenko, jo zaščitili z najlonsko nogavico in potopili oziroma zakopali v vodo oziroma mulj. Po trimesečnem izpostavljanju mikroorganizmom, smo kose pršuta in ribjega mesa nanegli na gojišča. Čokolado in druge substrate hrane smo inkubirali v tako imenovanih vlažnih komorah. Košček substrata smo inkubirali na omočenem filtrirnem papirju zaprtem v petrijevki.

3.3.2 Izolacija do čistih kultur

Iz osnovnih izolacijskih plošč smo glive ne glede na osnovno gojišče vedno izolirali na gojišče MEA 17% NaCl. Ker rod *Wallemia* spada med filamentozne in sporulirajoče glive, smo uporabili metodo prenosa spor s pomočjo agarne igle. Iz roba svežega gojišča MEA 17% NaCl smo s sterilno spatulo izrezali majhen košček agarne gojišča oziroma agarne iglo, s katero smo se nato dotaknili sporulirajoče kolonije. Agarne iglo s sporami smo črtovno nanegli na sredino MEA 17% NaCl. Plošče smo zalepili s parafilmom in jih inkubirali pri temperaturi 25 °C.

3.3.3 Molekularno-genetska karakterizacija gliv iz rodu *Wallemia*

3.3.3.1 Izolacija genomske DNA

Kulture smo iz trdega gojišča MEA 10% NaCl nacepili v 5 ml tekočega gojišča MEA 10% NaCl v epruveti. Po enotedenski inkubaciji pri sobni temperaturi smo s spatulo pod sterilnimi pogoji prenesli približno 1 cm² micelija s površine tekočega gojišča v 2 ml mikrocentrifugirko, v katero smo predhodno dodali mešanico silikagela in celita v razmerju 2:1 in 300 µl CTAB pufra. S pomočjo kovinskih kroglic in homogenizatorja (1 minuta pri frekvenci 30 tresljajev na sekundo) smo micelij strli do homogene zmesi. Po homogenizaciji smo dodali še 200 µl CTAB pufra in premešali na magnetnem mešalu. Homogeniziran micelij smo inkubirali 30 minut v vodni kopeli pri 65 °C in nato v digestoriju dodali 500 µl kloroforma. Mešanico smo premešali z vorteksom in jo centrifugirali 5 minut pri 14000 obratih na minuto. Vodno fazo v supernatantu smo odpipetirali v sterilno mikrocentrifugirko, preostanek pa zavrgli v odlagalnik. Postopek s kloroformom smo še enkrat ponovili. Po končani ekstrakciji s kloroformom, smo preostali vodni fazi dodali dvakratni volumen 96% etanola ohlajenega na -20 °C. Mešanico smo previdno ročno premešali in jo čez noč inkubirali pri -20 °C. Po inkubaciji smo mešanico centrifugirali 5 minut pri 14000 obratih na minuto in nato pazljivo odpipetirali supernatant. Preostalo usedlino v mikrocentrifugirki smo sprali s 500 µl ohlajenega 70% etanola in nato mešanico ponovno centrifugirali 5 minut pri 14000 obratih na minuto. Etanol smo pazljivo odpipetirali, usedlino z DNA pa v topli komori osušili do suhega. DNA smo nato resuspendirali v 49 µl TE pufra, mikrocentrifugirko pa nato inkubirali 5-30 minut v vodni kopeli pri 37 °C. DNA smo shranili v zamrzovalniku pri -20 °C (Gerrits van der Ende in de Hoog, 1999).

3.3.3.2 Pomnoževanje dela nukleotidnega zaporedja z verižno reakcijo s polimerazo

S pomočjo univerzalnih evkariontskih začetnih nukleotidov ITS4 in ITS5 (White, 1990) smo pomnoževali celotno zaporedje ITS1 in ITS 2, vključno s 5,8S rDNA s krajšimi odseki 18S in 28S rDNA. Nukleotidni začetnik ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATA TGC-3') nalega na konec 3' 28S rDNA, medtem ko ITS5 (5'-GGAAGTAAAAG TCGTAACAAGG-3') nalega na konec 5' 18S rDNA.

Mešanico za verižno reakcijo s polimerazo (v nadaljevanju PCR) smo pripravljali na ledu. Za 1 vzorec smo pripravili 35 μ l mešanice, ki je vsebovala 26,32 μ l bidestilirane vode, 0,5 μ l 25 mM $MgCl_2$, 3,5 μ l pufru za polimerazo, 0,7 μ l 10mM dNTP, 1,4 μ l ITS4 (10 pmol/ μ l), 1,4 μ l ITS5 (10 pmol/ μ l), 0,18 μ l Dream Taq polimeraze in 1 μ l DNA. Poleg vzorcev z DNA smo za vsako pomnoževanje pripravili tudi mešanico za negativno kontrolo, ki ni vsebovala DNA. Vzorce in negativno kontrolo smo vstavili v PCR sistem Eppendorf in nastavili program pomnoževanja (Preglednica 3).

Preglednica 3: Program za pomnoževanje dela nukleotidnega zaporedja ITS rDNA.

	Temperatura (°C)	Trajanje
1. začetna denaturacija	95	2 min
2. sledi 30 ciklov		
denaturacija	95	45 sek
vezava začetnih oligonukleotidov	54	30 sek
podaljševanje verige	72	2 min
3. končno podaljševanje verige	72	4 min

3.3.3.3 Gelska elektroforeza

Uspešnost pomnoževanja smo preverili z gelsko elektroforezo, pri kateri smo uporabili 1% agarozni gel. V 150 ml erlenmajerici smo zatehtali 0,3g agaroze in z merilnim valjem odmerili 30 ml TAE (1x) pufru. Agarozo smo raztopili v mikrovalovni pečici in na koncu dolili toliko destilirane vode, kot jo je izparelo. Ko se je raztopljen agaroz ohladila na približno 40 °C, smo dodali 3 μ l Syber green barvila, ki je bil v končnem gelu 10000x razredčen. Pazljivo smo pomešali in odlili v nosilec za strjevanje gela z glavnički. Strjen gel, iz katerega smo odstranili glavničke, smo vstavili v elektroforetsko banjico tako, da je bil popolnoma prekrit s TAE (1x) pufrom. Na lističu parafilma smo si pripravili vzorce za gelsko elektroforezo tako, da smo zmešali 1,5 μ l nanašalnega pufru in 3,5 μ l PCR pomnožka. V prvo luknjico smo s pipeto nanесли 3 μ l DNA lestvice (Fermentas), v naslednje pa po 5 μ l vzorca in negativno kontrolo. Elektroforetsko banjico smo priključili na električni napajalnik. Elektroforeza je prvih pet minut potekala pod napetostjo 80 V,

naslednjih 20 minut pa pod napetostjo 100 V. Po končani elektroforezi smo gel fotografirali v transiluminatorju s pomočjo računalniškega programa »Gene snap«.

3.3.3.4 Določanje in obdelava nukleotidnega zaporedja

Nukleotidno zaporedje PCR pomnožkov smo določili v sodelovanju s podjetjem MacroGen (Seoul, Južna Koreja). Sekveniranje je bilo izvedeno z DNA sekvenatorjem, ki temelji na Sangerjevi metodi in kapilarni elektroforezi. Nukleotidno zaporedje PCR pomnožka smo obdelali s pomočjo računalniških programov Clustal X in MEGA4. S pomočjo programa BLAST (»Basic Local Alignment Search Tool«), ki je dostopen na spletnih straneh (glej spodaj) NCBI (»National Center for Biotechnology Information«), smo poiskali podobne sekvence, na podlagi katerih smo identificirali seve.

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome

3.3.4 Fiziološka karakterizacija gliv iz rodu *Wallemia*

3.3.4.1 Rast na MEA/MEA 10% NaCl

Na trdih gojiščih MEA in MEA 10% NaCl smo preverili rast posameznih izolatov na gojišču brez in z dodanimi topljenci. *Wallemia sebi* je edina vrsta znotraj rodu, ki je sposobna rasti na gojišču MEA in na ostalih gojiščih brez dodanih topljencev, medtem ko vrsti *Wallemia muriae* in *Wallemia ichthyophaga* na gojišču MEA in na ostalih gojiščih brez dodanih topljencev ne raste (Zalar, 2005).

3.3.4.2 Encimska aktivnost gliv iz rodu *Wallemia*

Encimske teste smo izvajali na različne načine. Uporabili smo komercialni API ZYM encimski kit (Biomerieux, ZDA), presevne encimske metode po Petersonu (1995), ki smo jih modificirali z dodatkom 10% NaCl in trda gojišča s konjugiranimi polisaharidi, ki smo jih uporabili za testiranje nekaterih encimov. Proteaze smo določali tudi z uporabo komercialnega kita za določevanje proteolitične aktivnosti.

3.3.4.2.1 Komerčni encimski kit API ZYM (Biomerieux)

Test smo uporabili za detekcijo naslednjih encimov: alkalna fosfataza, esteraza C4, esteraza lipaza C8, lipaza C14, levcin aminopeptidaza, valin aminopeptidaza, cistin aminopeptidaza, tripsin, kimotripsin, kislina fosfataza, fosfoamidaza, α -galaktozidaza, β -galaktozidaza, β -glukuronidaza, α -glukozidaza, β -glukozidaza, *N*-acetil- β -glukozamidaza, β -manozidaza in α -fukozidaza. Pripravili smo različno slana (brez dodanega NaCl, 10% NaCl, 17% NaCl) kompleksna tekoča gojišča za testiranje encimske aktivnosti. Svežo kulturo na poševniku smo zalili s sterilno raztopino NaCl (*W. sebi* smo zalili s fiziološko raztopino, medtem ko smo kulturi *W. muriae* in *W. ichthyophaga* zalili z 10% raztopino NaCl) in pripravili suspenzije glivnih celic in spor. Pod sterilnimi pogoji smo odpipetirali 1 ml suspenzije kulture v 100 ml tekočega gojišča. *W. sebi* smo inokulirali v tekoče gojišče brez dodanega NaCl in v gojišče z 10% NaCl, *W. muriae* v tekoče gojišče z 10% NaCl, medtem ko smo *W. ichthyophaga* inokulirali v tekoče gojišče z 17% NaCl.

Za gojenje smo uporabili erlenmajerico z utori, ker le-ta med mešanjem bolje razpršuje gojišče in s tem omogoča boljšo preskrbo glive s kisikom. Gojišče smo stresali na stresalniku s frekvenco 150 obratov na minuto. Stresali smo 30 dni pri sobni temperaturi. Uspešnost rasti smo preverjali z ugotavljanjem prisotnosti hifnih skupkov v gojišču.

V 2 ml mikrocentrifugirko smo odpipetirali 2 ml gojišča z glivno kulturo in jo centrifugirali 1 minuto pri 14000 obratih na minuto. Po centrifugiranju so ekstracelularni encimi ostali v supernatantu, ki smo ga odpipetirali v sterilno 1,5 ml mikrocentrifugirko. Medtem smo v plastično inkubacijsko posodico nalili 5 ml destilirane vode za vzdrževanje vlage med inkubacijo. Testni set smo vstavili v inkubacijsko posodico in v vsako testno vdolbinico odpipetirali 65 μ l supernatanta. Inkubirali smo 4 ure v pri temperaturi 37 °C. Po inkubaciji smo v vsako testno vdolbinico dodali kapljico reagenta ZYM A in kapljico reagenta ZYM B ter počakali 5 minut, da so se razvile barve. Barvni učinek smo povečali tako, da smo testni set izpostavili močni svetlobi. S pomočjo barvne skale smo odčitali barvno reakcijo in ocenili količino encima.

3.3.4.2.2 Merjenje proteolitične aktivnosti s komercialnim kitom Sigma

V 2 ml mikrocentrifugirko smo odpipetirali 2 ml gojišča (uporabili smo kompleksno gojišče za API ZYM test; glej 3.3.4.2.1) z glivno kulturo in jo centrifugirali 1 minuto pri 14000 obratih na minuto. V sterilno mikrocentrifugirko smo odpipetirali 20 µl inkubacijskega pufru, 10 µl vzorca z encimi in 20 µl FITC (substrat kazein z vezanim fluorescein izotiocianatom) ter jo zavili v aluminjasto folijo in jo inkubirali 20 ur pri 37 °C. Po inkubaciji smo v mikrocentrifugirko dodali 150 µl triklotocetne kisline in inkubirali 30 minut pri 37 °C. Po inkubaciji smo vzorec centrifugirali 10 minut pri 10000 obratih na minuto. 10 µl centrifugiranega vzorca smo dodali v sveže mikrocentrifugirke, kamor smo prej odpipetirali 1ml Assay (Tris) pufru in previdno 3x ročno premešali. Na mikrotitersko ploščo smo odpipetirali po 200 µl vzorca (1 vzorec v 4 luknjice) in s pomočjo fluorimetra določili proteolitično aktivnost.

3.3.4.2.3 Presevne encimske metode po Petersonu

Pripravili smo gojišča za presevne encimske metode po Petersonu (1995), ki smo jih modificirali z dodatkom 10% NaCl. Encimi in njihovi substrati so navedeni v Preglednici 4. Kulture smo s cepilno zanko bogato nacepili po celem gojišču (*W. sebi* smo nacepili na gojišče brez dodanega NaCl in na gojišče z 10% NaCl, medtem ko smo kulturi *W. muriae* in *W. ichthyophaga* nacepili na gojišča z 10% NaCl).

Preglednica 4: Encim, substrat in oznaka; presevna encimske metode (Peterson, 1995).

Encim	Substrat	Oznaka gojišča
proteaza	kazein	Ka
esteraza	Tween 80	Es
amilaza	škrob	Š
celulaza	celuloza	C
β-glukozidaza	eskulin	Ae
ksilanaza	ksilan	Ks

3.3.4.2.4 Encimska razgradnja konjugiranih polisaharidov

Konjugirane polisaharide smo uporabili za determinacijo naslednjih encimov: endo-1-4-glukanaza in endocelulaza (substrat hidroksietil celuloza z vezanim barvilom ostazin

briljant), amilaza (substrat škrob z vezanim barvilom ostazin briljant rdeče, ter hidroksietil škrob z vezanim barvilom remazol briljant modro), endo-1-4-mananaza (substrat galaktomanan z vezanim barvilom ostazin briljant rdeče), endo-1-4-glukanaza (substrat glukan z vezanim barvilom ostazin briljant rdeče), endo-1-4-ksilanaza (substrat glukoronoksilan z barvilom remazol briljant modro). Gojišča je pripravil prof. Peter Milligan (»University of Maine at Augusta, Augusta, Maine, USA«).

Kulture smo s sterilno cepilno zanko enočrtovno nacepili na ploščo ter inkubirali 20 dni pri temperaturi 37 °C. Kulturo *W. sebi* smo nacepili na gojišča brez dodanega NaCl, medtem ko smo kulturi *W. muriae* in *W. ichthyophaga* nacepili na gojišča, ki smo jih modificirali z dodatkom 10% NaCl. Rast na substratih in razbarvanje gojišča okoli kolonij je pomenila pozitiven rezultat.

3.3.4.3 Asimilacijski profil gliv iz rodu *Wallemia*

Na sposobnost asimilacije različnih virov ogljika in dušika smo testirali vse tri vrste iz rodu *Wallemia*. Testirali smo naslednje vire ogljika (D-glukoza, D-galaktoza, L-sorboza, *N*-Acetil-glukozamin, D-riboza, D-ksiloza, D-glukozamin, L-arabinoza, D-arabinoza, L-ramnoza, D-saharoza, maltoza, D-trehaloza, fruktoza, celobioza, melibioza, laktoza, D-rafinoza, melezitosa, topni škrob, glicerol, ribitol, etanol, metanol, galaktitol, D-manitol, mio-inozitol, mezo-eritrol, citrat, urea, D-glukonat, sukcinat, inozitol, fruktoza in glukoronska kislina) in naslednje vire dušika (D-glukozamin, L-lizin, kalijev nitrat in natrijev nitrit).

Priprava gojišč:

Testiranje virov ogljika in dušika smo pri vseh treh vrstah iz rodu *Wallemia* izvedli s pomočjo osnovnega YNB in YCB gojišča z dodanim 17% NaCl, medtem ko smo za vrsto *W. sebi* uporabili tudi gojišče brez dodane soli.

1) Gojišče za testiranje vira ogljika

Pripravili smo neslano (YNB) in slano (YNB 17% NaCl) osnovno gojišče brez vira ogljika.

YNB (»Yeast Nitrogen Base«)	0,67 g
agar	2 g
destilirana voda	do 90 ml

Za slano gojišče smo dodali 17 g NaCl. Gojišče smo avtoklavirali 15 minut pri 121 °C in ga v vodni kopeli ohladili na 55 °C. Med ohlajanjem osnovnega gojišča smo pripravili vir ogljika. 1 g vira ogljika smo s pomočjo magnetnega mešala raztopili v 10 ml destilirane vode in ga nato s sterilno sringo filtrirali (0,22 µm pore) v osnovno gojišče. Gojišče z virom ogljika smo premešali z magnetnim mešalom in ga aseptično nalili v plastične petrijevke. Končna koncentracija vira ogljika v gojišču je bila 1%.

2) Gojišče za testiranje virov dušika

Pripravili smo neslano (YCB) in slano (YCB 17% NaCl) osnovno gojišče brez vira dušika.

YCB (»Yeast Carbon Base«)	0,67 g
agar	2 g
destilirana voda	do 90 ml

Za slano gojišče smo dodali 17 g NaCl. Gojišče smo avtoklavirali 15 minut pri 121 °C in ga v vodni kopeli ohladili na 55 °C. Med ohlajanjem osnovnega gojišča smo pripravili raztopino z viri dušika. V 10 ml destilirane vode (za 100 ml končnega gojišča) smo raztopili 0,078 g KNO₃, 0,026 g NaNO₂, 0,056 g L-lizina in 1 g D-glukozamina. Raztopino z virom dušika smo s sterilno sringo filtrirali (0,22 µm pore) v osnovno gojišče. Gojišče z virom dušika smo premešali z magnetnim mešalom in ga aseptično nalili v plastične petrijevke.

Priprava suspenzije spor in celic:

Svežo kulturo na poševnem gojišču MY30G smo zalili z 10% raztopino NaCl (za testiranje na gojišču brez dodane soli, smo kulturo *W. sebi* zalili s fiziološko raztopino) in

jo s cepilno zanko postrgali iz površine gojišča. Suspenzijo spor in celic smo prelili v 2 ml mikrocentrifugirko, jo premešali na magnetnem mešalu in do uporabe spravili v hladilnik.

Nacepitev in inkubacija:

Gojišče na plošči smo razdelili na devet delov in na vsak razdelek z avtomatsko pipeto nanесли 10 μ l suspenzije spor in celic. Okužbo s pršicami smo preprečili tako, da smo plošče zalepili s filmskim trakom. Gojišča smo inkubirali 25 dni pri temperaturi 25 °C.

3.3.4.4 Testiranje tolerance na $MgCl_2$ in $MgSO_4$

Priprava gojišč:

Za testiranje tolerance smo uporabili tekoče in trdo gojišče MEA, kateremu smo dodali ustrezno količino $MgCl_2 \times 6 H_2O$ in $MgSO_4 \times 7 H_2O$ (Preglednica 5 in 6). Za testiranje rasti na $MgCl_2$ smo uporabili trdo gojišče na plošči, le gojišče z ≥ 2 M $MgCl_2$ je bilo tekoče, medtem ko smo za testiranje rasti na $MgSO_3$ uporabili samo tekoče gojišče v epruveti. $MgSO_3$ in $MgCl_2 (\geq 2$ M) onemogočita strjevanje agarja, zato smo uporabili tekoče gojišče. Gojišče smo avtoklavirali 15 min pri 120°C in ga do uporabe hranili v hladni komori.

Preglednica 5: Količina $MgCl_2 \times 6 H_2O$, ki jo potrebujemo za pripravo 1000 ml (X) in 100 ml (Y) gojišča.

c $MgCl_2$ (mol/l)	% (m/V)	X (g)	Y (g)
1,0 M	9,5	203,31	20,33
1,2 M	11,4	243,97	24,40
1,3 M	12,4	264,30	26,43
1,5 M	14,3	304,97	30,50
1,7 M	16,2	345,63	34,56
1,9 M	18,1	386,30	38,63
2,0 M	19,0	406,62	40,66
2,3 M	31,9	467,36	46,74

Preglednica 6: Količina $MgSO_4 \times 7 H_2O$, ki jo potrebujemo za pripravo 1000 ml (A) in 100 ml (B) gojišča.

c $MgSO_4$ (mol/l)	% (m/V)	A (g)	B (g)
1,0 M	12,0	246,47	24,65
1,5 M	18,1	369,71	36,97
2,0 M	24,1	492,94	49,29
2,5 M	30,1	616,18	61,62
3,0 M	36,1	739,41	73,94
3,5 M	42,1	862,65	86,26
4,0 M	48,2	985,88	98,6

Priprava suspenzije spor:

Pripravili smo dobro sporulirajočo kulturo gliv iz rodu *Wallemia* na trdem poševnem gojišču MEA 10% NaCl. Za vsak sev smo pripravili dve mikrocentrifugirki, ki smo ju ustrezno označili. V prvo smo odpipetirali 1 ml 1M raztopine $MgCl_2$, v drugo pa 1 ml 1M raztopine $MgSO_4$. Pod sterilnimi pogoji smo prenesli polno cepilno zanko spor v mikrocentrifugirko z raztopino. Suspenzijo smo premešali na magnetnem mešalu in jo do uporabe spravili v hladilnik.

Nacepitev in inkubacija:

Trdo gojišče z $MgCl_2$ na plošči smo razdelili na devet delov in na vsak razdelek z avtomatsko pipeto nanesti 10 μ l suspenzije spor posameznega seva, medtem ko smo v tekoče gojišče odpipetirali 20 μ l suspenzije spor. Okužbo s pršicami smo preprečili tako, da smo ploščo zalepili s filmskim trakom, vrh epruvete pa s cigaretним papirjem. Gojišče smo inkubirali pri sobni temperaturi do pojava aktivne rasti. Testiranje rasti smo začeli na gojišču z 1M $MgCl_2$ in 1M $MgSO_3$. V primeru rasti, smo rast kulture testirali na višji koncentraciji, dokler nismo dosegli koncentracije, pri kateri glive niso več rasle.

3.3.5 Shranjevanje izoliranih gliv

Vsem sevom, ki smo jih izolirali iz ozmotsko stresnih okolij in jih pridobili iz drugih mikrobioloških zbirk, smo dodelili EXF številko. Sev smo trajno shranili v zbirko EX, ki je del Mreže infrastrukturnih centrov Univerze v Ljubljani (MRICUL) in deluje v okviru IC Mycosmo na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov (Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Ljubljana). Glive iz rodu *Wallemia* smo enako kot vse filamentozne glive shranili v tekoči dušik pri temperaturi $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za lažje sprotno rokovanje smo seve shranili tudi na poševna MEA in MY30G gojišča in jih shranili v hladilniku ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

4 REZULTATI

Raziskovalno delo je potekalo od 17. aprila 2009 do 30. septembra 2010 v laboratorijih raziskovalne skupine za biologijo mikroorganizmov Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

4.1 VZORČENJE Z NAMENOM IZOLACIJE SEVOV RODU *Wallemia*

Seve, ki smo jih vključili v raziskavo, smo pridobili iz treh virov. Približno dve tretjini smo jih tekom raziskave izolirali iz ozmotsko stresnih okolij, ostalo tretjino pa so predstavljali neidentificirani sevi iz mikrobiološke zbirke ekstremofilnih mikroorganizmov (EX) Infrastrukturnega centra Mycosmo na Biotehniški fakulteti, ter sevi identificirani kot *W. sebi*, ki smo jih naročili iz drugih mikrobioloških zbirk.

4.1.1 Vzorčenje ozmotsko stresnih okolij

Vzorčenje je potekalo od aprila 2009 do junija 2010. V tem času smo z namenom izolacije čim več sevov gliv iz rodu *Wallemia* pridobili in testirali približno 300 različnih vzorcev iz Slovenije in drugih evropskih držav (Nizozemska – NL, Hrvaška – HR, Islandija – IS, Italija – IT, Nemčija – DE, Turčija – TR), Azije (Indonezija – IN, Japonska – JP, Nepal), Afrike (Tanzanija – TA, Namibija – NA) in Amerike (Združene Države Amerike – ZDA, Argentina – AR). Vsi vzorci so navedeni v Preglednici 7. Iz približno 30% vzorcev smo izolirali seve rodu *Wallemia*; ti vzorci so označeni z * in podrobneje opisani v Preglednici 8.

4.1.1.1 Vzorci iz izjemno slanah okolij

Testirali smo sol iz solin (Sečoveljske soline, Slovenija), sol iz slanah jezer (Veliko slano jezero, Utah, ZDA), sol iz rudnikov soli (Argentina, Turčija) in druge vzorce soli iz Balijskega (Indonezija), Himalaje (Nepal). S filtriracijo in inkubacijo filtrov na slanah gojiščih smo testirali izjemno slano vodo iz solin (Sečoveljske soline, Slovenija (SI); soline Trapani, Sicilija, Italija) in vodo iz slanah jezer (»Great Salt Lake«, Utah, ZDA). Iz Sečoveljskih solin (Slovenija) smo obdelovali vzorce iz halofitskih rastlin in njihovih ostankov (različne

sočnice, kobulnice, rman, trstičje in druge trave, obmorski oman, ljuljka, osočnik, loček, nebinovka, koruzni storž), vzorce iz ostankov morskih živali (perje in kosti galeba, sipine kosti, školjke, žuželke, osje satje in voda, mulj ter blato okoli poginulega galeba) in vzorce iz mesnih vab.

4.1.1.2 Vzorci iz hrane z znižano vodno aktivnostjo

Testirali smo različno sladko hrano: čokolado (mlečna, temna, bela, slana, z lešnikovo kremo, z mentolovim polnilom) in čokoladne namaze (nutela, dukatela), torte (malinova s smetano), džeme in marmelade (slivova, marelična, mešana), suho sadje (marelice, hruške, slive, fige, murva), sveže sadeže (gnila jabolka, sveža jabolka, breskve) in sladkor. Vzorce slane hrane so predstavljali suhomesnati izdelki (prekajena šunka, pršut, bodjola, ogrska salama), zaseka in mast. Izmed suhe hrane smo testirali različna žita (zimsko pšenica, ječmen, tritikala, jara pšenica, koruza), semena (sončnična, konopljina, sezamova), začimbe (vegeta, kava, kakav, sladkor), čaje (žajbljev, šipkov) in moko.

4.1.1.3 Vzorci iz drugih okolij

Testirali smo mrtve čebele ter druge vzorce iz čebelnjaka in okolice (zrak pred panji, letvice s satjem, celice s cvetnim prahom, cvetni prah), cvetni prah različnih rastlin, kmetijsko okolje (kompost, seno, koruzno silažo), plesnive stene v stanovanjskih zgradbah, usedline okoli gejzirja (Islandija), puščavski pesek (Namibija), vzorci s površin različnih gob (hojeva polževka, smrekova kresilača, cinobrasti drobnolukničar, bukova polževka, žolti luskinar, navadna ledenka, skorjasta zamazanka, bela polževka, rdečelistka, skorjevka, bukova kresilka, maskulina, bradavec, sluzasta širokolistka, štorovka, luskinar, čedna bolgarka, vitka lesenjača, tintnica, pegasta čeladica, redpičasta čeladarica, meglenska, kučmica, bukova mlečnica, lososova sirovka, skledica, luskinarji).

Preglednica 7: Pregled vzorcev pridobljenih iz ozmotsko stresnih okolij, način izolacije ter datum vzorčenja.

No	Oznaka vzorca	Substrat	Država in kraj	Način izolacije	Gojišče	Datum vzorčenja
1	CV2_R_1	cvetni prah	SI	Raztros	C, D	17.4.2009
2	CV3_R_1	cvetni prah	NL, Amsterdam	Raztros	C, D	17.4.2009
3	CV4_R_1	cvetni prah	SI, Krško	Raztros	C, D	17.4.2009
4	CV4_B_1	cvetni prah	SI, Krško	razmaz susp.	A, D	17.4.2009
5	CV4_B_2	cvetni prah	SI, Krško	razmaz susp.	A, D	17.4.2009
6	CV4_B_3	cvetni prah	SI, Krško	razmaz susp.	A, D	17.4.2009
7	CV4_B_4	cvetni prah	SI, Krško	razmaz susp.	A, D	17.4.2009
8	CV5_B_1*	cvetni prah, obnožina čebele	SI, Krško	razmaz susp.	C, D	17.4.2009
9	CV5_B_2	cvetni prah, obnožina čebele	SI, Krško	razmaz susp.	C, D	17.4.2009
10	CV5_B_3	cvetni prah, obnožina čebele	SI, Krško	razmaz susp.	C, D	21.5.2009
11	CV5_B_4	cvetni prah, obnožina čebele	SI, Krško	razmaz susp.	C, D	21.5.2009
12	CV5_B_5	cvetni prah, obnožina čebele	SI, Krško	razmaz susp.	C, D	21.5.2009
13	CV5_B_6	cvetni prah, obnožina čebele	SI, Krško	razmaz susp.	C, D	21.5.2009
14	CV5_B_7	cvetni prah, obnožina čebele	SI, Krško	razmaz susp.	C, D	21.5.2009
15	CV5_B_8	cvetni prah, obnožina čebele	SI, Krško	razmaz susp.	C, D	21.5.2009
16	CV5_B_9	cvetni prah, obnožina čebele	SI, Krško	razmaz susp.	C, D	21.5.2009
17	CV6_I_1	cvetni prah, vzet iz satja	SI, Krško	razmaz susp.	C, D	21.5.2009
18	CV6_I_2	cvetni prah, vzet iz satja	SI, Krško	razmaz susp.	C, D	21.5.2009
19	CV6_I_3	cvetni prah, vzet iz satja	SI, Krško	razmaz susp.	C, D	21.5.2009
20	CV6_I_4	cvetni prah, vzet iz satja	SI, Krško	razmaz susp.	C, D	21.5.2009
21	CV6_I_5	cvetni prah, vzet iz satja	SI, Krško	razmaz susp.	C, D	21.5.2009
22	CV6_I_6	cvetni prah, vzet iz satja	SI, Krško	razmaz susp.	C, D	21.5.2009
23	CV6_I_7	cvetni prah, vzet iz satja	SI, Krško	razmaz susp.	C, D	21.5.2009
24	CV6_I_8	cvetni prah, vzet iz satja	SI, Krško	razmaz susp.	C, D	21.5.2009
25	CV6_I_9	cvetni prah, vzet iz satja	SI, Krško	razmaz susp.	C, D	21.5.2009
26	CV6_I_10*	cvetni prah, vzet iz satja	SI, Krško	razmaz susp.	C, D	21.5.2009
27	SOL_1 ¹	sol iz solin	SI, Sečovelje ¹	raztros	C, D, E	22.5.2009
28	SOL_2* ¹	sol iz solin	SI, Sečovelje ¹	raztros	C, D, E	22.5.2009
29	SLAD_1*	pokvarjena marmelada	SI, Trebnje	bris z vatenko	C, D, E	22.5.2009
30	ČEBEL_I_1*	zrak pred panjem	SI, Ljubljana	odkrita plošča	B	29.6.2009
31	ČEBEL_I_2	žive čebele	SI, Ljubljana	odkrita plošča	B	29.6.2009
32	ČEBEL_I_3	letvica satja, čebelnjak	SI, Ljubljana	bris z vatenko	B	29.6.2009
33	ČEBEL_I_4	letvica satja, čebelnjak	SI, Ljubljana	bris z vatenko	B	29.6.2009
34	ČEBEL_I_5	celica satja s pelodom	SI, Ljubljana	bris z vatenko	B	29.6.2009
35	ČEBEL_I_6	celica satja s pelodom	SI, Ljubljana	bris z vatenko	B	29.6.2009
36	ČEBEL_I_7	celica satja z medom	SI, Ljubljana	bris z vatenko	B	29.6.2009
37	ČEBEL_I_8	celica satja z medom	SI, Ljubljana	bris z vatenko	B	29.6.2009
38	SENO M.R.	seno, koruzna silaža	SI, Ljubljana	raztros	A,C	20.7.2009
39	DOM_1	jušna začimba (Vegeta)	SI, Jurklošter	raztros	B	22.7.2009
40	DOM_2	mleta kava (Barcafe)	SI, Jurklošter	raztros	B	22.7.2009
41	DOM_3	sezamovo seme	SI, Jurklošter	raztros	B	22.7.2009
42	DOM_4	travna semena	SI, Jurklošter	raztros	B	22.7.2009

No	Oznaka vzorca	Substrat	Država in kraj	Način izolacije	Gojišče	Datum vzorčenja
43	DOM_5	kompostna trava	SI, Jurklošter	raztros	B	22.7.2009
44	DOM_6	gnilo jabolko	SI, Jurklošter	bris z vatenko	B	22.7.2009
45	DOM_7	površina svežega jabolka	SI, Jurklošter	bris z vatenko	B	22.7.2009
46	DOM_8	površina breskve	SI, Jurklošter	bris z vatenko	B	22.7.2009
47	DOM_9	pasja dlaka	SI, Jurklošter	bris z vatenko	B	22.7.2009
48	ARCHES_1	posušena rastlina	ZDA, Utah ²	nanos delov	C	26.8.2009
49	ARCHES_2_A	suhe brinove iglice, jagode	ZDA, Utah ²	nanos delov	C	26.8.2009
50	ARCHES_2_B	suhi hrastovi list	ZDA, Utah ²	nanos delov	C	26.8.2009
51	ARCHES_2_C	suha trava	ZDA, Utah ²	nanos delov	C	26.8.2009
52	ARCHES_2_D	suhi cvetovi	ZDA, Utah ²	nanos delov	C	26.8.2009
53	ARCHES_2_E	suha olesenela vejica	ZDA, Utah ²	nanos delov	C	26.8.2009
54	ARCHES_2_F	suha vejica	ZDA, Utah ²	nanos delov	C	26.8.2009
55	ARCHES_2_G	suha stebila	ZDA, Utah ²	nanos delov	C	26.8.2009
56	ARCHES_2_H	suhe rastline	ZDA, Utah ²	nanos delov	C	26.8.2009
57	ARCHES_3	suh klas trave	ZDA, Utah ²	nanos delov	C	26.8.2009
58	ARCHES_4	pesek	ZDA, Utah ²	nanos delov	C	26.8.2009
59	ARCHES_5_A	suha rastlin	ZDA, Utah ²	nanos delov	C	26.8.2009
60	ARCHES_5_B	socvetje suhe rastline	ZDA, Utah ²	nanos delov	C	26.8.2009
61	ARCHES_5_C	storžki ciprese	ZDA, Utah ²	nanos delov	C	26.8.2009
62	MURVA_1	suhi plodovi murve	HR, Pula	nanos delov	C	26.8.2009
63	Wall H1/1*	halofit	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	26.8.2009
64	Wall H1/4*	halofit	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	26.8.2009
65	Wall H1/5_A*	halofit	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	26.8.2009
66	Wall H1/5_B*	halofit	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	26.8.2009
67	Wall H1/6*	halofit	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	26.8.2009
68	Wall H1/7*	halofit	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	26.8.2009
69	Wall H2/2*	halofit	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	26.8.2009
70	Wall A1/1_A*	halofit	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	26.8.2009
71	Wall A1/1_B*	halofit	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	26.8.2009
72	GSL_3	sol roza barve	ZDA, Utah ³	raztros	C	26.8.2009
73	GSL_5	suha sol	ZDA, Utah ³	raztros	C	26.8.2009
74	GSL_6	sol z mušicami	ZDA, Utah ³	raztros	C	26.8.2009
75	GSL_7	sol z artemijami	ZDA, Utah ³	raztros	C	26.8.2009
76	GSL_10	sol s sedimentom	ZDA, Utah ³	raztros	C	26.8.2009
77	GSL_11	okrogel pesek - ooliti	ZDA, Utah ³	raztros	C	26.8.2009
78	GSL_12	soli z žuželkami	ZDA, Utah ³	nanos delov	C	26.8.2009
79	GSL_14	sončnična semena	ZDA, Utah ³	raztros	C	26.8.2009
80	GSL_15	olesenela stebila rastline	ZDA, Utah ³	nanos delov	C	26.8.2009
81	GSL_16	suhi halofiti	ZDA, Utah ³	nanos delov	B, C	26.8.2009
82	GSL_20	sol z jajčeci artemij	ZDA, Utah ³	raztros	B, C	26.8.2009
83	GSL_21	suha trava pred jezerom	ZDA, Utah ³	nanos delov	B, C	26.8.2009
84	GSL_22	suha trava ob jezeru	ZDA, Utah ³	nanos delov	B, C	26.8.2009
85	ČEBEL_II_1	zrak pred panjem	SI, Jurklošter	odkrita plošča	C	28.8.2009
86	ČEBEL_II_2	zrak pred panjem	SI, Jurklošter	odkrita plošča	C	28.8.2009

No	Oznaka vzorca	Substrat	Država in kraj	Način izolacije	Gojišče	Datum vzorčenja
87	ČEBEL_II_3	celica satja z medom	SI, Jurklošter	bris z vatenko	C	28.8.2009
88	ČEBEL_II_4	celica satja z medom	SI, Jurklošter	bris z vatenko	C	28.8.2009
89	ČEBEL_II_5	celica satja s pelodom	SI, Jurklošter	bris z vatenko	C	28.8.2009
90	ČEBEL_II_6	celica satja s pelodom	SI, Jurklošter	bris z vatenko	C	28.8.2009
91	ČEBEL_II_7	propolis iz letvice satja	SI, Jurklošter	bris z vatenko	C	28.8.2009
92	ČEBEL_II_8	lesena letvica satja	SI, Jurklošter	bris z vatenko	C	28.8.2009
93	ČEBEL_II_9	mrtve čebele	SI, Jurklošter	nanos trupel	C	28.8.2009
94	ČEBEL_II_10	celica satja z medom	SI, Jurklošter	bris z vatenko	C	28.8.2009
95	SLAD_2	lešnikov namaz (Nutella)	SI, Jurklošter	bris z vatenko	C	28.8.2009
96	CV10_1	cveti prah	SI, Jurklošter	razmaz susp.	C	29.8.2009
97	SLAD_3	torta z malinami in smetano	SI, Jurklošter	bris z vatenko	C	31.8.2009
98	S. MESO_1	suho meso (bodjola)	SI, Jurklošter	nanos kosov	C	1.9.2009
99	SOL_4	himalajska sol	Nepal	raztros	B,C	9.9.2009
100	ISLANDIJA 1	blato, usedline okoli gejzirja	IS	raztros	B,C	16.9.2009
101	ISLANDIJA 2	blato, usedline okoli gejzirja	IS	raztros	B,C	16.9.2009
102	ISLANDIJA 3	blato, usedline okoli gejzirja	IS	raztros	B,C	16.9.2009
103	ISLANDIJA 4	blato, usedline okoli gejzirja	IS	raztros	B,C	16.9.2009
104	ISLANDIJA 5	blato, usedline okoli gejzirja	IS	raztros	B,C	16.9.2009
105	NAMIB	puščavski pesek, Namib	N	raztros	B,C	16.9.2009
120	FIGA_1	gnila figa	SI, Sečovlje ¹	razmaz	C	29.9.2009
121	SOLINE_1	vaba v solinah	SI, Sečovlje ¹	razmaz mesa	A, B, E	30.9.2009
122	SOLINE_2	vaba v solinah	SI, Sečovlje ¹	razmaz mesa	A, B, E	30.9.2009
123	SOLINE_3	vaba v solinah	SI, Sečovlje ¹	razmaz mesa	A, B, E	30.9.2009
124	SOLINE_4	vaba v solinah, bazen S10	SI, Sečovlje ¹	razmaz mesa	A, B, E	30.9.2009
125	SOLINE_5	vaba v solinah, bazen S10	SI, Sečovlje ¹	razmaz mesa	A, B, E	30.9.2009
126	SOLINE_6	vaba v solinah, bazen S10	SI, Sečovlje ¹	razmaz mesa	A, B, E	30.9.2009
127	SOLINE_7	perje galeb	SI, Sečovlje ¹	nanos perja	A, B, E	30.9.2009
128	SOLINE_8	kosti galeba	SI, Sečovlje ¹	nanos kosti	A, B, E	30.9.2009
129	SOLINE_9	sipina kost	SI, Sečovlje ¹	nanos skosti	A, B, E	30.9.2009
130	SOLINE_10	školjke	SI, Sečovlje ¹	nanos školjk	A, B, E	30.9.2009
131	SOLINE_11	žuželka	SI, Sečovlje ¹	nanos žuželke	B	30.9.2009
132	SOLINE_12	ostanek koruznega klasa	SI, Sečovlje ¹	nanos klasa	B	30.9.2009
133	SOLINE_13	osje satje na travi	SI, Sečovlje ¹	nanos satja	B	30.9.2009
134	SOLINE_14	poginul galeb - meso	SI, Sečovlje ¹	bris z vatenko	B	30.9.2009
135	SOLINE_15	blato ob poginulem galebu	SI, Sečovlje ¹	bris z vatenko	B	30.9.2009
136	SOLINE_16	poginul galeb - kosti	SI, Sečovlje ¹	bris z vatenko	B	30.9.2009
137	SOLINE_17*	poginul galeb - perje	SI, Sečovlje ¹	bris z vatenko	B	30.9.2009
138	SOLINE_18	rdeč biofilm na vodi	SI, Sečovlje ¹	bris z vatenko	B	30.9.2009
139	SOLINE_19	oranžen biofilm na vodi	SI, Sečovlje ¹	bris z vatenko	B	30.9.2009
140	SOLINE_20	rdeč mulj	SI, Sečovlje ¹	bris z vatenko	B	30.9.2009
141	SOLINE_21	les	SI, Sečovlje ¹	bris z vatenko	B	30.9.2009
142	SOLINE_22	voda ob poginulem galebu	SI, Sečovlje ¹	bris z vatenko	B	30.9.2009
143	SOLINE_23	solinska voda, rezervoar	SI, Sečovlje ¹	filtriranje	B	5.10.2009
144	SOLINE_24*	mulj iz solin	SI, Sečovlje ¹	filtriranje	B	5.10.2009

No	Oznaka vzorca	Substrat	Država in kraj	Način izolacije	Gojišče	Datum vzorčenja
145	S_R_1	sočnica iz solin	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	5.10.2009
146	S_R_2	kobulnica iz solin	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	5.10.2009
147	S_R_3	rman v solinah	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	5.10.2009
148	S_R_4	trstičje v solinah	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	5.10.2009
149	S_R_5	hakofit, obmorski oman	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	5.10.2009
150	S_R_6	suha trava v solinah	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	5.10.2009
151	S_R_7	neznan halofit	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	5.10.2009
152	S_R_8	suha rastlina s klasom	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	5.10.2009
153	S_R_9	suha trava v solinah	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	5.10.2009
154	S_R_10	rastlina, ljujka	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	5.10.2009
155	S_R_11	suha rastlina v solinah	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	5.10.2009
156	S_R_12	neznana rastlina v solinah	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	5.10.2009
157	S_R_13	halofit, osočnik	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	5.10.2009
158	S_R_14	halofit, loček	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	5.10.2009
159	S_R_15	rastlina, trava s klasom	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	5.10.2009
160	S_R_16	halofit, visoka nebinovka	SI, Sečovlje ¹	nanos delov	B	5.10.2009
161	ŽITO_1	zimska pšenica	SI, Jurklošter	filtrir., nanos	B, C, D	6.10.2009
162	ŽITO_2	zimska pšenica	SI, Šentjur	filtrir., nanos	B, C, D	6.10.2009
163	ŽITO_3_R*	ječmen	SI, Šentjur	filtrir., nanos	B, C, D	6.10.2009
164	ŽITO_3_B*	ječmen	SI, Šentjur	filtrir., nanos	B, C, D	6.10.2009
165	ŽITO_4	tritikala	SI, Šentjur	filtrir., nanos	B, C, D	6.10.2009
166	ŽITO_5	ječmen	SI, Kranj	filtrir., nanos	B, C, D	6.10.2009
167	ŽITO_6*	jara pšenica	SI, Kranj	filtrir., nanos	B, C, D, F	6.10.2009
168	ŽITO_7	zimska pšenica	SI, Kranj	filtrir., nanos	B, C, D	6.10.2009
169	SENO	seno - koruzna silaža	SI, Jurklošter	raztros	B	6.10.2009
170	KRISTAL	kristal halita (NaCl)	neznano	filtriranje razt.	B	6.10.2009
171	DOM_10	sončnična semena	SI, Jurklošter	raztros	C	10.10.2009
172	DOM_11	kakav (Nesquick)	SI, Jurklošter	raztros	C	10.10.2009
173	DOM_12	domač šipkov čaj	SI, Jurklošter	rsztros	C	10.10.2009
174	DOM_13	dišalo iz klinčkov	TA, Zanzibar	raztros	C	10.10.2009
175	DOM_14	pršut (Kras)	SI, Jurklošter	nanos mesa	C	10.10.2009
176	DOM_15	suho meso, bodjola	SI, Jurklošter	bris z vatenko	C	10.10.2009
177	S. MESO_2	suho meso, ogrska salama	SI, Trebnje	razmaz delov	C	21.10.2009
178	GOBA_1	goba, hojeva polževka	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
179	GOBA_2	goba, smrekova kresilača	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
180	GOBA_3	goba, drobnolukničar	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
181	GOBA_4	goba, bukova polževka	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
182	GOBA_5	goba, žolti luskinar	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
183	GOBA_6	goba, navadna ledenka	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
184	GOBA_7	goba, skorjasta zamazanka	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
185	GOBA_8	goba, bela polževka	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
186	GOBA_9	goba, rdečelistka	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
187	GOBA_10	goba, skorjevka	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
188	GOBA_11	goba, bukova kresilka	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009

No	Oznaka vzorca	Substrat	Država in kraj	Način izolacije	Gojišče	Datum vzorčenja
189	GOBA_12	goba, maskulina	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
190	GOBA_13	goba, trihodopsis	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
191	GOBA_14	goba, bradovec	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
192	GOBA_15	goba, sluzasta širokolistka	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
193	GOBA_16	goba, štorovka	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
194	GOBA_17	goba, luskinar	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
195	GOBA_18	goba, čedna bolgarka	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
196	GOBA_19	goba, vitka lesenjača	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
197	GOBA_20	goba, tintnica	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
198	GOBA_21	goba, straforija	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
199	GOBA_22	goba, pegasta čeladica	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
200	GOBA_23	goba, čeladarica	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
201	GOBA_24	goba, meglenka	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
202	GOBA_25	goba, kučmica	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
203	GOBA_26	goba, štorovka	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
204	GOBA_27	goba, bukova mlečnica	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
205	GOBA_28	goba, lososova sirovka	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
206	GOBA_29	goba, skledica	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
207	GOBA_30	goba, nečedna bolgarka	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
208	GOBA_31	goba, luskinarji	SI, Idrija	bris z vatenko	C	26.10.2009
209	SICILJA*4	voda iz solin	IT, Trapani	filtriranje	C	14.10.2009
210	SENO*	suho seno	SI, Kranj	nanos	C	14.10.2009
211	S. MESO_4	svinjska zaseka	SI, Ljutomer	bris z vatenko	C	26.10.2009
212	S. MESO_5	svinjska mast	SI, Ljutomer	nanos masti	C	26.10.2009
213	SLAD_5	nasičena raztopina sladkorja	SI, Ljubljana	razmaz	C	26.10.2009
214	KONOPLJA	konopljinna semena	SI, Ljubljana	nanos semen	C	26.10.2009
215	PELOD_1	pelod, cvetni prah	SI, Trebnje	nanos peloda	C	26.10.2009
216	RIŽ_1	bilka in klas riža	JP	nanos delov	C	26.10.2009
217	RIŽ_2	bilka in klas riža	JP	nanos delov	C	26.10.2009
218	RIŽ_3	bilka in klas riža	JP	nanos delov	C	26.10.2009
219	RIŽ_4	bilka in klas riža	JP	nanos delov	C	26.10.2009
220	ČOKO_1	mlečna čokolada (Gorenjka)	SI, Trebnje	nanos koščkov	C, F	27.10.2009
221	ČOKO_2	temna čokolada (Gorenjka)	SI, Trebnje	nanos koščkov	C, F	27.10.2009
222	ČOKO_3	bela čokolada (Milka)	SI, Trebnje	nanos koščkov	C, F	27.10.2009
223	ČOKO_4	čok. z lešnik. kremo (Milka)	SI, Trebnje	nanos koščkov	C, F	27.10.2009
224	SOL_6	sol, spominek iz Balijsa	IN, Bali	raztros	C	27.10.2009
225	SOL_7	sol iz rudnika soli	AR, meja z Bolivijo	raztros	C	27.10.2009
226	SOL_8	mleta sol iz rudnika soli	TR, meja z Armenijo	raztros	C	27.10.2009
227	SOL_9	surova sol iz rudnika soli	TR, meja z Armenijo	raztros	C	27.10.2009
228	BRŠLJAN_1	plodnica bršljanovega cveta	SI, Ljubljana	bris z vatenko	A, B, F	2.11.2009
229	BRŠLJAN_2	bršljanov plod	SI, Ljubljana	nanos plodov	A, B, F	2.11.2009
230	BRŠLJAN_3*	cvetni prah bršljana	SI, Ljubljana	odtis socvetja	A, B, F	2.11.2009
231	BRŠLJAN_4	satje z bršljanovim medom	SI, Ljubljana	bris z vatenko	A, B, F	2.11.2009

No	Oznaka vzorca	Substrat	Država in kraj	Način izolacije	Gojišče	Datum vzorčenja
232	BRŠLJAN_5	satje z bršljanovim medom	SI, Ljubljana	bris z vatenko	A, B, F	2.11.2009
233	PELOD_2	mleti cvetni prah (Medex)	SI, Ljubljana	raztros	A, B, F	4.11.2009
234	PELOD_3	pelod, cvetni prah	SI, Jurklošter	raztros	C, F	10.11.2009
235	S. MESO_6	pršut z vidno plesnijo (Kras)	SI, Jurklošter	bris z vatenko	C, F	10.11.2009
236	ŽITO_8*	koruzna semena	SI, Jurklošter	nanos semen	C, F	10.11.2009
237	MOKA_1	pšenična moka	SI, Jurklošter	raztros	C, F	10.11.2009
238	MOKA_2	stara pšenična moka	SI, Jurklošter	raztros	C, F	10.11.2009
239	VEGETA_2	začimba (Vegeta)	SI, Jurklošter	raztros	C, F	10.11.2009
240	SR_1	domač žajbljev čaj	SI, Jurklošter	nanos delov	C, F	10.11.2009
241	SLAD_6	slivova marmelada	SI, Jurklošter	bris z vatenko	C, F	10.11.2009
242	SLAD_7	mešana marmelada	SI, Jurklošter	bris z vatenko	C, F	10.11.2009
243	PH_1	čokoladni namaz	SI, Jurklošter	bris z vatenko	C, F	10.11.2009
244	ČOK_1*	mlečna čokolada Zimska pravljičica (Gorenjka)	SI, Ljubljana	vlažna komora	/	30.11.2009
245	ČOK_2*	čokoladni velikonočni zajec (Gorenjka)	SI, Ljubljana	vlažna komora	/	30.11.2009
246	ČOK_3*	bela čokolada (Milka)	SI, Ljubljana	vlažna komora	/	3.12.2009
247	ČOK_4*	mlečna čokolada (Gorenjka)	SI, Ljubljana	vlažna komora	/	3.12.2009
248	ČOK_5*	čokoladni velikonočni zajec (Gorenjka)	SI, Ljubljana	vlažna komora	/	30.11.2009
249	ČOK_6	čokoladno jajce s polnilom	SI, Ljubljana	vlažna komora	/	3.12.2009
250	ČOK_7	čokoladno jajce	SI, Ljubljana	vlažna komora	/	3.12.2009
251	ČOK_8	čokoladni božiček	SI, Ljubljana	vlažna komora	/	3.12.2009
252	ČOK_9	čokolada RITTER SPORT	SI, Ljubljana	vlažna komora	/	30.11.2009
253	ČOK_10	mlečna čokolada, na zraku	SI, Ljubljana	vlažna komora	/	30.11.2009
254	ČOK_11	čokolada s kremo, na zraku	SI, Ljubljana	vlažna komora	/	3.12.2009
255	ČOK_12	temna čokolada, na zraku	SI, Ljubljana	vlažna komora	/	3.12.2009
256	ČOK_13	mlečna čokolada z lešniki	SI, Ljubljana	vlažna komora	/	30.11.2009
257	ČOK_14	temna čokolada (Lindt)	SI, Ljubljana	vlažna komora	/	16.12.2009
258	ČOK_15	slana čokolada (Mövenpick)	SI, Ljubljana	vlažna komora	/	16.12.2009
259	ČOK_16	čokolada (КРУПИЦКОИ)	SI, Ljubljana	vlažna komora	/	16.12.2009
260	ČOK_17	s čokolado oblitni oreščki in suho sadje	SI, Dobje	vlažna komora	/	16.12.2009
261	ČOK_18	čokolada z mentopovim polnilom (Lindt)	SI, Ljubljana	vlažna komora	/	16.12.2009
262	ČOK_19	čokolada s polnilom (Lindt)	SI, Ljubljana	vlažna komora	/	6.1.2010
263	S_SADJE_1	suha marelica	SI, Dobje	nanos sadja	C, D	16.12.2009
264	S_SADJE_2	suha hruška	SI, Dobje	nanos sadja	C, D	16.12.2009
265	S_SADJE_3	suha figa	SI, Dobje	nanos sadja	C, D	16.12.2009
266	59/1*	stena v kuhinji, 60 cm od tal	SI, Ljubljana	bris z vatenko	C, D	30.10.2009
267	60/1	kopalnica, fuga med plošč.	SI, Ljubljana	bris z vatenko	C, D	30.10.2009
268	86/2*	stena v dnevni sobi	SI, Vrhnika	bris z vatenko	C, D	15.12.2009
269	88/1*	stena v kuhinji, 60 cm od tal	SI, Radomlje	bris z vatenko	C, D	16.12.2009
270	83/1*	kot pod stropom v spalnici	SI, Kamnik	bris z vatenko	C, D	9.12.2009
271	83/3_1*	strop v otroški sobi	SI, Kamnik	bris z vatenko	C, D	9.12.2009
272	83/3_2*	strop v otroški sobi	SI, Kamnik	bris z vatenko	C, D	12.3.2010

No	Oznaka vzorca	Substrat	Država in kraj	Način izolacije	Gojišče	Datum vzorčenja
273	S_M_1	suha salama	SI, Jurklošter	bris z vatenko	C, D	12.3.2010
274	S_M_2	suha salama s plesnijo	SI, Jurklošter	bris z vatenko	C	14.3.2010
275	S_M_3	suha okrogla klobasa	SI, Jurklošter	bris z vatenko	C	14.3.2010
276	S_M_4	svinjski ocvirki	SI, Jurklošter	bris z vatenko	C	14.3.2010
277	S_M_5	ocvrta svinjska koža	SI, Jurklošter	bris z vatenko	C	14.3.2010
278	S_M_6	suho meso, bodjola	SI, Jurklošter	bris z vatenko	C	14.3.2010
279	S_M_7	slanina	SI, Jurklošter	bris z vatenko	C	14.3.2010
282	G_A_1* ¹	voda v kristalizacijskih bazenih solin – grenčica	SI, Sečovlje ¹	filtriranje	C	16.3.2010
283	G_B_1* ¹	voda v kristalizacijskih bazenih solin – grenčica	SI, Sečovlje ¹	filtriranje	C	16.3.2010
284	R_B_3* ¹	voda v kristalizacijskih bazenih solin – rezervoar	SI, Sečovlje ¹	filtriranje	C	16.3.2010
285	R_B_1* ¹	voda v kristalizacijskih bazenih solin – rezervoar	SI, Sečovlje ¹	filtriranje	C	16.3.2010
297	SOL_11	sol, grobi, rjavi kristali		raztros	C	1.6.2010
298	SOL_12	sol, grobi, belomodri kristali		raztros	C	1.6.2010
299	SOL_13	sol, drobni, opečnati kristali		raztros	C	1.6.2010
300	SOL_14	sol, grobi, beli kristali		raztros	C	1.6.2010
301	SOL_15	sol, oranžno-beli kristal		raztros	C	1.6.2010
302	SOL_16	sol, drobni, beli kristali		raztros	C	1.6.2010

* vzorci, iz katerih smo izolirali glive iz rodu *Wallemia* so podrobneje opisani v preglednici 8; ¹ vzorci iz Sečovljskih solin (Slovenija); ² vzorci iz Nacionalnega parka Arches (Utah, ZDA); ³ vzorci iz Velikega slanega jezera (Utah, ZDA); ⁴ vzorci iz solin Trapani (Sicilija, Italija); A (MEA + Ch); B (MEA 10% NaCl + Ch); C (MEA 17% NaCl + Ch); D (MY50G + Ch); E (MY10 – 12 + Ch); F (YNB 20% NaCl + Ch).

Iz ozmotsko stresnih okolij smo izolirali 38 sevov gliv iz rodu *Wallemia* (Preglednica 8). Na novo pridobljene seve smo izolirali do čistih kultur, jim dodelili EXF oznako in jih trajno shranili v mikrobiološki zbirki EX (Infrastrukturni center Mycosmo, Biotehniška fakulteta).

4.1.2 Pridobitev sevov iz različnih mikrobioloških zbirk

Iz mikrobiološke zbirke EX smo pridobili 15 neidentificiranih sevov gliv iz rodu *Wallemia*, medtem ko smo iz belgijske mikrobiološke zbirke BCCM/MUCL («Belgian Coordinated Collections of Microorganismes») pridobili osem sevov, tri seve pa iz kanadske mikrobiološke zbirke UAMH («Microfungus collection and Herbarium, University of Alberta»).

4.2 IDENTIFIKACIJA IN TAKSONOMSKA ANALIZA

Izolate smo na podlagi značilnih majhnih prašnatih kolonij cimetove barve določili kot predstavnika rodu *Wallemia*. Identifikacija do posameznih vrst pa je potekala na osnovi rasti na gojišču MEA oziroma MEA 10% NaCl (Preglednica 8) in na podlagi molekularno-genetskih lastnosti ITS rDNA nukleotidnih zaporedij, pridobljenih z verižno reakcijo s polimerazo.

Na osnovi poravnanih nukleotidnih ITS rDNA zaporedij smo izrisali filogenetsko drevo (Slika 2) in identificirali tri znane vrste: *W. sebi* (12 izolatov), *W. muriae* (26 izolatov) in *W. ichthyophaga* (6 izolatov). Dvajset sevov nismo mogli uvrstiti med opisane vrste, zato smo jih poimenovali *Wallemia* sp. (2 izolata), *Wallemia* aff. *sebi* (aff. = »affinity« - sorodnost) (10 izolatov) in *Wallemia* aff. *muriae* (8 izolatov). Z *Wallemia* sp. smo poimenovali dva seva (EXF-5748 in EXF-5753), ki pripadata potencialno novi vrsti, z *Wallemia* aff. *sebi* in *Wallemia* aff. *muriae* pa kompleks vrst, ki se po molekularno-genetskih značilnostih ITS rDNA zaporedja malo razlikujejo od vrst *W. sebi* in *W. muriae*. S pomočjo spletnega programa BLAST smo določili odstotek (%) ujemanja nukleotidnega zaporedja s tipskimi sevi *W. ichthyophaga* EXF-994 (=CBS 113033), *W. sebi* EXF-958 (=CBS 818.96) in *W. muriae* EXF-951 (=CBS 116622, =MZKI B-952) (Preglednica 8).

Dvanajst izolatov, ki so rastle tako na gojišču MEA brez dodatka soli kot tudi na gojišču MEA z dodatkom soli, smo identificirali do vrste *W. sebi*. Nukleotidno zaporedje desetih izolatov se v 98-99% ujema z zaporedjem tipskega seva; pri sevih z oznakama EXF-992 in EXF-1278 je bila kvaliteta nukleotidnega zaporedja slabša (ujemanje le 96% oziroma 88%), vendar zadovoljiva za identifikacijo na ključnih predelih ITS regije. Sekvenca izolata EXF-1278 je zadostovala za identifikacijo, ne pa za nadaljno taksonomsko analizo.

Deset izolatov, ki so prav tako rastle na gojišču MEA brez dodatka soli in katerih nukleotidno zaporedje se v 91-96% ujema s tipskim sevom *W. sebi*, smo identificirali kot *Wallemia* aff. *sebi*. Ločena filogenetska pozicija skupine *Wallemia* aff. *sebi*. od vrste *W. sebi* je razvidna tudi iz filogenetskega drevesa (Slika 2).

Šestindvajset izolatov, ki so rastle samo na gojišču MEA z dodatkom soli, smo identificirali do vrste *W. muriae*. Pri treh izolatih se nukleotidno zaporedje popolnoma (100%) ujema z zaporedjem tipskega seva, pri osemnajstih v 99%, pri dveh v 98%, pri prav tako dveh v 96% in pri enem izolatu (EXF-1271) v 88%. Nizek odstotek ujemanja slednjega izolata je posledica slabe sekvence in ne sorodstvene oddaljenosti. Iz filogenetskega drevesa (Slika 2) je razvidno, da znotraj vrste *W. muriae* obstajata dve skupini, med katerima so minimalne molekularno-genetske razlike.

Osem izolatov smo kljub temu, da so rastle tako na gojišču MEA brez dodatka soli kot tudi na gojišču MEA z dodatkom soli, poimenovali *Wallemia* aff. *muriae*. Pri petih izolatih se nukleotidno zaporedje ITS rDNA enako (95-96%) ujema z zaporedjem tipskega seva vrst *W. muriae* in *W. sebi*, medtem ko je pri dveh izolatih (EXF-6149 in EXF-6151) odstotek ujemanja nukleotidnega zaporedja večji z zaporedjem tipskega seva vrste *W. muriae* (97%, 96%) kot z zaporedjem tipskega seva vrste *W. sebi* (95%, 95%). Na podlagi filogenetske analize smo ugotovili, da je skupina bolj sorodna vrsti *W. muriae*, predvsem izolata EXF-6149 in EXF-6151 (Slika 2).

Na podlagi edinstvene morfologije smo šest izolatov, ki so rastle samo na gojišču MEA z dodatkom soli in katerih nukleotidno zaporedje se v 97-98% ujema z zaporedjem tipskega seva *W. ichthyophaga*, identificirali kot *W. ichthyophaga*. Iz filogenetskega drevesa (Slika 2) je razvidno, da je vrsta enotna in sorodstveno oddaljena od ostalih vrst iz rodu *Wallemia*.

Dodatno novo vrsto predstavljata izolata EXF-5748 in EXF-753, poimenovana kot *Wallemia* sp., ki se na osnovi ITS rDNA zaporedij zelo razlikujeta od znanih vrst znotraj rodu in tudi med seboj. Sev EXF-5748 kaže 88% podobnost s tipskim sevom *W. ichthyophaga*, 83% podobnost s tipskim sevom *W. sebi* in 82% podobnost s tipskim sevom *W. muriae* medtem ko sev EXF-5753 kaže 87% podobnost s tipskim sevom *W. ichthyophaga* 83% podobnost s tipskim sevom *W. sebi* in 86% podobnost s tipskim sevom *W. muriae*. Iz filogenetskega drevesa (Slika 2) je razvidno, da se omenjena dva seva zelo razlikujeta od ostalih vrst rodu *Wallemia*.

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je bila pri izolatu EXF-5749 večkrat (3x) neuspešna, zato identifikacija na podlagi molekularno-genetskih lastnosti ni bila možna. Izolat verjetno pripada isti vrsti kot EXF-5748, saj smo seva ločili med seboj iz iste čiste kulture, kjer so bile kolonije različno obarvane: kolonije EXF-5748 rjavo, kolonije EXF-5749 pa belo. Isti fenomen smo opazili tudi pri drugih kulturah.

Preglednica 8: Izolati gliv iz rodu *Wallemia* in njihove oznake, substrat, država izvora ter sposobnost rasti na gojišču MEA / MEA 10% NaCl.

Oznaka vzorca oz. seva shranjenega v drugi zbirki	EXF oznaka	Substrat	Lokacija (Država, kraj)	Rast na MEA	Rast na MEA 10 % NaCl	Končna identifikacija (odstotek ujemanja nukleotidnega zaporedja s tipskim sevom)
MV3	EXF-1278*	skedenj za seno	GB	+	+	<i>W. sebi</i> (86%) ¹
CBS 202.33	EXF-992*	morska sol	neznano	+	+	<i>W. sebi</i> (96%) ¹
S1	EXF-1441*	čokolada	Slovenija	+	+	<i>W. sebi</i> (98%) ¹
IBT 20875	EXF-1442*	čokolada	Slovenija	+	+	<i>W. sebi</i> (98%) ¹
SICILIJA	EXF-5746	voda iz solin Trapani	IT, Sicilija	+	+	<i>W. sebi</i> (98%) ¹
SENO	EXF-5747	suho seno	SI, Kranj	+	+	<i>W. sebi</i> (98%) ¹
ŽITO_8	EXF-5920	koruzna semena	SI, Jurklošter	+	+	<i>W. sebi</i> (98%) ¹
MUCL 8703	EXF-6148 ^o	hrastov list	BE, Egenhoven	+	+	<i>W. sebi</i> (98%) ¹
SOLINE_17	EXF-5752	perje poginulega galeba	SI, Sečovelje	+	+	<i>W. sebi</i> (99%) ¹
GS-1d	EXF-1913*	izjemno slana voda iz Velikega slanega jezera	ZDA, Utah	+	+	<i>W. sebi</i> (99%) ¹
S10_109_1_AE	EXF-5860	izjemno slana voda iz Sečoveljskih solin	SI, Sečovelje	+	+	<i>W. sebi</i> (99%) ¹
MUCL 46253	EXF-6155 ^o	mineralna voda	FR	+	+	<i>W. sebi</i> (99%) ¹
UAMH 2651	EXF-6156 ^o	plesniv bel kruh	GB, Oellette	+	+	<i>W. aff. sebi</i> (91%) ¹
ČOK_4	EXF-5829	mlečna čokolada (Gorenjka)	SI, Ljubljana	+	+	<i>W. aff. sebi</i> (93%) ¹
MUCL 40632	EXF-6150 ^o	posušena kokosova pulpa	BR, Belem	+	+	<i>W. aff. sebi</i> (93%) ¹
ČEBELNJAK_I_1	EXF-5677	zrak pred panjem, čebelnjak za NIB	SI, Ljubljana	+	+	<i>W. aff. sebi</i> (95%) ¹
M_Z_1	EXF-277*	izjemno slana voda solin	ES	+	+	<i>W. aff. sebi</i> (96%) ¹
ČOK_2	EXF-5922	čokoladni velikonočni zajec (Gorenjka)	SI, Ljubljana	+	+	<i>W. aff. sebi</i> (96%) ¹
ČOK_3	EXF-5828	bela čokolada (Milka)	SI, Ljubljana	+	+	<i>W. aff. sebi</i> (96%) ¹
83/3_1	EXF-5918	strop v otroški sobi	SI, Kamnik	+	+	<i>W. aff. sebi</i> (96%) ¹
MUCL 45614	EXF-6154 ^o	gozdna kritosemenka	CU, Pinar del Rio	+	+	<i>W. aff. sebi</i> (96%) ¹
UAMH 6689	EXF-6158 ^o	javorjev sirup	CA, Fanny Bay	+	+	<i>W. aff. sebi</i> (96%) ¹
CV5_B_1	EXF-5673	cvetni prah, obnožina	SI, Krško	+	+	<i>W. muriae</i> (100%) ²

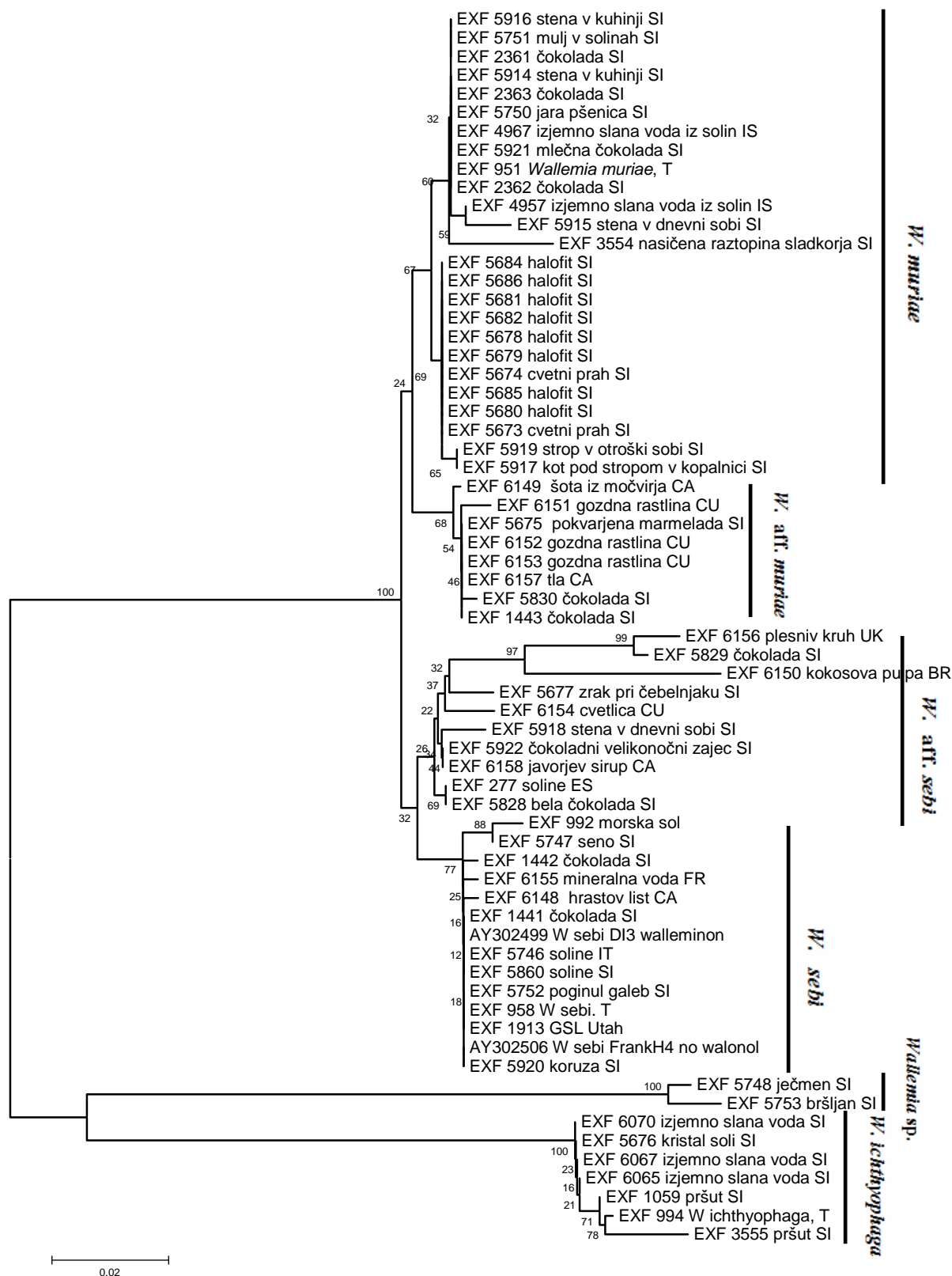
Oznaka vzorca oz. seva shranjenega v drugi zbirki	EXF oznaka	Substrat	Lokacija (Država, kraj)	Rast na MEA	Rast na MEA 10 % NaCl	Končna identifikacija (odstotek ujemanja nukleotidnega zaporedja s tipskim sevom)
M_Z_10	EXF-2363*	čokolada	SI	-	+	<i>W. muriae</i> (100%) ²
59/1	EXF-5916	stena v kuhinji, 60 cm od tal	SI, Ljubljana	-	+	<i>W. muriae</i> (100%) ²
DI6	EXF-1271*	notranjost nenaseljene hiše	GB	-	+	<i>W. muriae</i> (88%) ²
83/1	EXF-5917	kot pod stropom v spalnici	SI, Kamnik	-	+	<i>W. muriae</i> (96%) ²
83/3_2	EXF-5919	strop v otroški sobi	SI, Kamnik	-	+	<i>W. muriae</i> (96%) ²
CV6_I_10	EXF-5674	cvetni prah, obnožina	SI, Krško	+	+	<i>W. muriae</i> (98%) ²
NRS	EXF-3554*	nasičena raztopina sladkorja	SI, Ljubljana	-	+	<i>W. muriae</i> (98%) ²
Wall H1/1	EXF-5678	halofit	SI, Sečovelje	-	+	<i>W. muriae</i> (99%) ²
Wall H1/4	EXF-5679	halofit	SI, Sečovelje	-	+	<i>W. muriae</i> (99%) ²
Wall H1/5_A	EXF-5680	halofit	SI, Sečovelje	-	+	<i>W. muriae</i> (99%) ²
Wall H1/5_B	EXF-5681	halofit	SI, Sečovelje	-	+	<i>W. muriae</i> (99%) ²
Wall H1/6	EXF-5682	halofit	SI, Sečovelje	-	+	<i>W. muriae</i> (99%) ²
Wall H1/7	EXF-5683	halofit	SI, Sečovelje	-	+	<i>W. muriae</i> (99%) ²
Wall H2/2	EXF-5684	halofit	SI, Sečovelje	-	+	<i>W. muriae</i> (99%) ²
Wall A1/1_A	EXF-5685	halofit	SI, Sečovelje	-	+	<i>W. muriae</i> (99%) ²
Wall A1/1_B	EXF-5686	halofit	SI, Sečovelje	-	+	<i>W. muriae</i> (99%) ²
M_Z_8	EXF-2361*	čokolada	SI	-	+	<i>W. muriae</i> (99%) ²
M_Z_9	EXF-2362*	čokolada	SI	-	+	<i>W. muriae</i> (99%) ²
200AN1	EXF-4957*	izjemno slana voda solin ob Mrtvem morju	Izrael	-	+	<i>W. muriae</i> (99%) ²
AE2-3	EXF-4967*	izjemno slana voda solin ob Mrtvem morju	Izrael	-	+	<i>W. muriae</i> (99%) ²
SOLINE_24	EXF-5751	mulj iz Sečoveljskih solin	SI, Sečovelje	-	+	<i>W. muriae</i> (99%) ²
ŽITO_6	EXF-5750	jara pšenica	SI, Kranj	-	+	<i>W. muriae</i> (99%) ²
ČOK_1	EXF-5921	mlečna čokolada, Zimska pravljica (Gorenjka)	SI	-	+	<i>W. muriae</i> (99%) ²
86/2	EXF-5915	stena v dnevni sobi	SI, Vrhnika	-	+	<i>W. muriae</i> (99%) ²
88/1	EXF-5914	stena v kuhinji, 60 cm od tal	SI, Radomlje	-	+	<i>W. muriae</i> (99%) ²

Oznaka vzorca oz. seva shranjenega v drugi zbirki	EXF oznaka	Substrat	Lokacija (Država, kraj)	Rast na MEA	Rast na MEA 10 % NaCl	Končna identifikacija (odstotek ujemanja s nukleotidnega zaporedja s tipskim sevom)
ČOK_5	EXF-5830	čokoladni velikonočni zajec (Gorenjka)	SI, Ljubljana	+	+	<i>W. aff. muriae</i> (95%) ² (95%) ¹
MUCL 15061	EXF-6149 ^o	šota iz močvirja	CA, Ontario	+	+	<i>W. aff. muriae</i> (97%) ² (95%) ¹
MUCL 45613	EXF-6152 ^o	gozdna rastlina <i>Clusia rosea</i>	CU, Pinar del Rio	+	+	<i>W. aff. muriae</i> (95%) ² (95%) ¹
MUCL 45611	EXF-6153 ^o	gozdna rastlina <i>Clusia relumbifolia</i>	CU, Sancti Spiritus	+	+	<i>W. aff. muriae</i> (96%) ² (96%) ¹
SLAD_1	EXF-5675	pokvarjena marmelada	SI, Trebnje	+	+	<i>W. aff. muriae</i> (96%) ² (96%) ¹
IBT 19078	EXF-1443*	čokolada	SI	+	+	<i>W. aff. muriae</i> (96%) ² (96%) ¹
MUCL 45615	EXF-6151 ^o	gozdna rastlina <i>Verbena officinalis</i>	CU, Guantanoamo	+	+	<i>W. aff. muriae</i> (96%) ² (95%) ¹
UAMH 2757	EXF-6157 ^o	tla	CA, Edmonton	+	+	<i>W. aff. muriae</i> (96%) ² (96%) ¹
G A_1	EXF-6068	izjemno slanavoda v kristal. bazenih – grenčica	SI, Sečovelje	–	+	<i>W. ichthyophaga</i> (97%) ³
G B_1	EXF-6070	izjemno slanavoda v kristal. bazenih – grenčica	SI, Sečovelje	–	+	<i>W. ichthyophaga</i> (97%) ³
R B_3	EXF-6067	izjemno slanavoda v kristal. bazenih – rezervoar	SI, Sečovelje	–	+	<i>W. ichthyophaga</i> (97%) ³
SOL_2	EXF-5676	kristal soli	SI, Sečovelje	–	+	<i>W. ichthyophaga</i> (98%) ³
PSŠ	EXF-3555*	prekajena suha šunka	SI, Ljubljana	–	+	<i>W. ichthyophaga</i> (98%) ³
R B_1	EXF-6065	izjemno slanavoda v kristal. bazenih – rezervoar	SI, Sečovelje	–	+	<i>W. ichthyophaga</i> (98%) ³
ŽITO_3_R	EXF-5748	ječmen	SI, Šentjur	+	+	<i>Wallemia</i> sp. (88%) ³ (83%) ¹
BRŠLJAN_3	EKF-5753	cvetni prah bršljana direktno iz cvetov	SI, Ljubljana	+	+	<i>Wallemia</i> sp. (87%) ³ (86%) ²
ŽITO_3_B	EXF-5749	ječmen	SI, Šentjur	+	+	/

* Izolati, ki smo jih pridobili iz mikrobiološke zbirke EX (Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani).

^o Izolati, ki smo jih pridobili iz drugih mikrobioloških zbirk (BCCM/MUCL, UAMH).

¹ Tipski sev *W. sebi* EXF-958 (CBS 818.96); ² tipski sev *W. muriae* EXF-951 (CBS 116622, MZKI B-952); ³ tipski sev *W. ichthyophaga* EXF-994 (CBS 113033).



Slika 2: Filogenetsko drevo na osnovi nukleotidnih zaporedij ITS rDNA na novo pridobljenih in referenčnih tipskih sevov gliv iz rodu *Wallemia*.

Encima alkalna in kislja fosfataza sta bila izražena pri vseh treh vrstah v gojišču z 10 % NaCl, pri vrsti *W. sebi* tudi v gojišču brez soli. Količina alkalne in kisle fosfataze je bila pri *W. sebi* približno 8x večja na slanem gojišču kot na gojišču brez soli. Fosfoamidazo smo zaznali pri *W. muriae* in *W. sebi* v slanem gojišču ter pri *W. sebi* v gojišču brez soli, kjer je bila količina največja. Encime za razgradnjo sladkorjev smo zaznali pri *W. muriae* in *W. ichthyophaga* na slanih gojiščih (α -galaktozidaza, β -galaktozidaza in α -glukozidaza), pri *W. ichthyophaga* pa smo zaznali še encima β -glukozidaza in *N*-acetil- β -glukozamidaza. Od esteraz in lipaz smo zaznali šibko aktivnost le pri *W. sebi* v gojišču brez soli, pa tudi pri *W. ichthyophaga* na gojišču s soljo. Proteaze (levcin aminopeptidaza, cistin aminopeptidaza in valin aminopeptidaza) smo v majhnih količinah zaznali le pri vrsti *W. muriae*, medtem ko drugih proteaz (tripsin, kimotripsin) nismo zaznali.

4.3.1.2 Proteolitična aktivnost ocenjena z encimskim kitom Sigma

Testirali smo seva EXF-958 in EXF-5746 vrste *W. sebi*, seva EXF-3554 in EXF-951 vrste *W. muriae* ter seve EXF-3555, EXF-5676 in EXF-994 vrste *W. ichthyophaga*. S kitom za detekcijo proteaz (Sigma) nismo zaznali nobene aktivnosti.

4.3.1.3 Presevni encimski testi na agarnih gojiščih

Pri sevu EXF-958 (*W. sebi*) smo tako na gojišču brez kot tudi na gojišču z 10% NaCl zaznali esterazno in β -glukozidazno aktivnost. Šibko ksilanazno aktivnost smo zaznali samo na gojišču z dodanim 10% NaCl. Sev celuloze in škroba ne razgrajuje. Tako pri sevu EXF-951 (*W. muriae*) kot tudi pri sevu EXF-994 (*W. ichthyophaga*) smo na gojišču z 10% NaCl prav tako zaznali esterazno, β -glukozidazno in šibko ksilanazno aktivnost. Seva celuloze in škroba ne razgrajujeta. Prisotnost proteaz za razgradnjo kazeina (gojišče z 10% NaCl) smo testirali pri sevih EXF-958, EXF-5677, EXF-5752, EXF-992, EXF-1442, EXF-5675, EXF-5918, EXF-951, EXF-5674, EXF-5751, EXF-5915, EXF-5680, EXF-5914, EXF-5686, EXF-994, EXF-3555 in EXF-5676. Šibko proteolitično aktivnost smo po 28 dneh zaznali le pri enem testiranem sevu (EXF-951), ki pripada vrsti *W. muriae*.

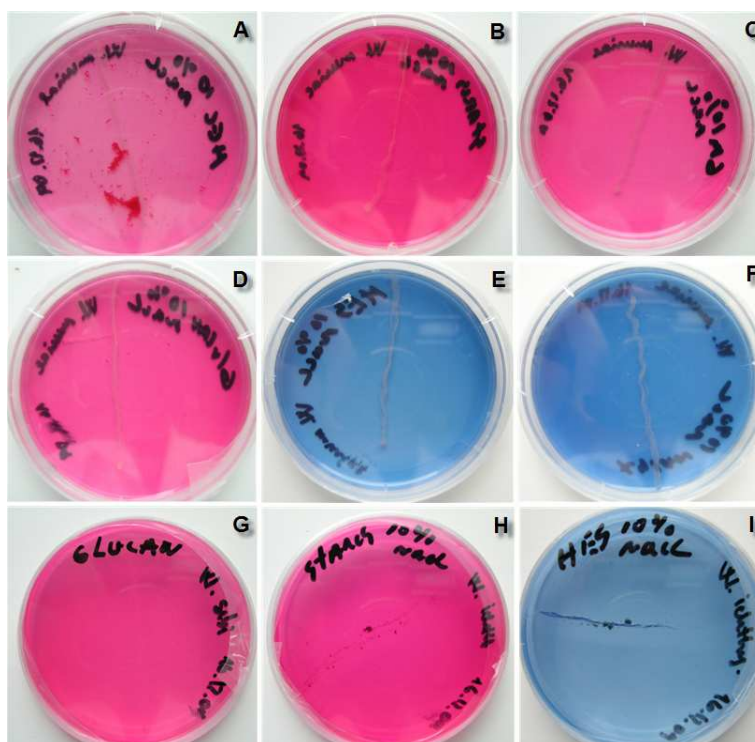
4.3.1.4 Encimska razgradnja konjugiranih polisaharidov

Testirali smo sev EXF-958 vrste *W. sebi*, sev EXF-951 vrste *W. muriae* ter sev EXF-994 vrste *W. ichthyophaga*. Preglednica 10 prikazuje rast vrst rodu *Wallemia* na gojiščih s konjugiranimi polisaharidi. Kljub temu, da smo na nekaterih gojiščih zaznali rast, nikjer ni prišlo do zbitritve obarvanega gojišča okoli kolonij, ki pomeni prisotnost ekstracelularnih encimov.

Preglednica 10: Encimska razgradnja konjugiranih polisaharidov vrst iz rodu *Wallemia*.

Konjugiran polisaharid	Encim	EXF-958	EXF-951	EXF-994
hidroksietil celuloza z OBR	endo-1-4-glukanaza	-	+ 0	-
škrob z OBR	amilaza	-	+ 0	-
galaktomanan z OBR	endo-1-4-mananaza	-	+ 0	-
glukan z OBR	endo-1-4-glukanaza	-	+ 0	-
hidroksietil škrob z RBM	amilaza	+ 0	+ 0	+ 0
glukoronoksilan z RBM	endo-1-4-ksilanaza	+ 1	+ 1	+ 1

+ pomeni rast, 1 pomeni zbitritev, 0 pomeni, da ni zbitritve, - pomeni, da ni rasti.



Slika 3: Encimska razgradnja konjugiranih polisaharidov vrst iz rodu *Wallemia*. Rast seva EXF-951 na gojišču s substratom A: hidroksietil celuloza z vezanim barvilom ostazin briljant rdeče (OBR); B: škrob z OBR; C: galaktomanan z OBR; D: glukan z OBR; E: hidroksietil škrob z vezanim barvilom remazol briljant modro (RBM); F: glukoronoksilan z RBM. Rast seva EXF-958 na gojišču s substratom G: glukan z OBR. Rast seva EXF-994 na gojišču s substratom H: škrob z OBR; I: hidroksietil škrob z RBM.

4.3.1.5 Primerjava encimske aktivnosti med vrstami rodu *Wallemia*

Posplošeni rezultati encimskih testov treh znanih vrst rodu *Wallemia* so navedeni v Preglednici 11. Vrsta *W. muriae* je encimsko najbolj aktivna vrsta rodu. Encimi, ki smo jih zaznali le pri omenjeni vrsti, so esteraza, valin in cistein aminopeptidaza, β -galaktozidaza, endo-1-4-glukanaza, endocelulaza, endo-1-4-mananaza. Pri ostalih dveh vrstah nismo zaznali nobene encimske aktivnosti, ki se ne bi pojavila tudi pri kateri drugi vrsti rodu *Wallemia*.

Preglednica 11: Encimska aktivnost gliv iz rodu *Wallemia* na gojiščih z dodatkom soli.

Encim	<i>W. sebi</i> 10% NaCl	<i>W. muriae</i> 10% NaCl	<i>W. ichthyophaga</i> 17% NaCl
alkalna fosfataza ^(A)	+	+	+
esteraza C4 ^(A)	-	+	-
esteraza lipaza C8 ^(A)	-	-	-
lipaza C14 ^(A)	-	-	-
levcin aminopeptidaza ^(A)	-	-	-
valin aminopeptidaza ^(A)	-	+	-
cistin aminopeptidaza ^(A)	-	+	-
tripsin ^(A)	-	-	-
kimotripsin ^(A)	-	-	-
kisla fosfataza ^(A)	+	+	+
fosfoamidaza ^(A)	+	+	-
α -galaktozidaza ^(A)	-	+	+
β -galaktozidaza ^(A)	-	+	-
β -glukuronidaza ^(A)	-	-	-
α -glukozidaza ^(A)	-	+	+
β -glukozidaza ^(A)	-	-	+
N-acetil- β -glukozamidaza ^(A)	-	-	+
β -manozidaza ^(A)	-	-	-
α -fukozidaza ^(A)	-	-	-
endo-1-4-glukanaza, endocelulaza ^(B)	-	-	-
amilaza (škrob) ^(B)	-	-	-
endo-1-4-mananaza ^(B)	-	-	-
endo-1-4-glukanaza ^(B)	-	-	-
amilaza (hidroksietil škrob) ^(B)	-	-	-
endo-1-4-ksilanaza ^(B)	+	+	+
proteaza ^(C)	-	-	-
esteraza ^(C)	+	+	+
amilaza ^(C)	-	-	-
celulaza ^(C)	-	-	-
β -glukozidaza ^(C)	+	+	+
ksilanaza ^(C)	+	+	+

^(A) API ZYM test; ^(B) presevni testi s konjugiranimi polisaharidi; ^(C) Presevni testi po Petersonu s sod. (1995); + pomeni encimska aktivnost, - pomeni ni encimske aktivnosti.

4.3.2 Asimilacijski profil gliv iz rodu *Wallemia*

Testirali smo seve vrste *W. sebi* (EXF-992, EXF-1913, EXF-1441, EXF-1442, EXF-5746, EXF-5747, EXF-5752, EXF-585, EXF-1263, EXF-1261, EXF-1264, EXF-1266, EXF-1268, EXF-958), seve skupine *Wallemia aff. sebi* (EXF-277), seve skupine *Wallemia aff. muriae* (EXF-1443, EXF-5675, EXF-1265, EXF-1274), seve vrste *W. muriae* (EXF-5674, EXF-951, EXF-1054, EXF-1269, EXF-1272, EXF-1285, EXF-4957, EXF-4967, EXF-5673) in seve vrste *W. ichthyophaga* (EXF-994, EXF-1059, EXF-5676, EXF-759, EXF-3555, EXF-6065, EXF-6067, EXF-6068, EXF-6070).

Vse tri vrste gliv iz rodu *Wallemia* asimilirajo D-glukozo, D-galaktozo, L-sorbozo, N-Acetil-glukozamin, D-ksilozo, L-arabinozo, D-saharozo, maltozo, D-trehalozo, fruktozo, celobiozo, melibiozo, D-rafinozo, melezitozo, D-ribozo, ribitol, glicerol, mezo-eritrol, galaktitol, D-manitol, mio-inozitol, D-sorbitol, sukcinat in D-glukonat kot vir ogljika ter D-glukozamin, L-lizin in nitrat (KNO_3) kot vir dušika. Ne asimilirajo pa D-arabinoze, L-ramnoze, laktoze, topnega škroba, etanola, metanola, citrata, D-glukozamina, uree, in glukoronske kisline kot vira ogljika ter natrijevega nitrita kot vira dušika (Preglednica 12).

4.3.2.1 Asimilacijski profil vrste *W. sebi*

Večina testiranih sevov vrste *W. sebi* asimilira zgoraj naštete vire C in N na gojišču z dodatkom 17% NaCl (PRILOGA A1), vendar se pojavljajo nekatera odstopanja. Sev EXF-958 ne asimilira L-sorboze, sev EXF-1274 ne celobioze, medtem ko seva EXF-1274 in EXF-1266 ne asimilirata D-ksiloze. Ribozo šibko asimilira pet, D-glukonat pa šest izmed devetih testiranih sevov. Sev EXF-585 edini izmed testiranih sevov asimilira sukcinat. V primerjavi z gojiščem, ki smo mu dodali 17% NaCl, je bila rast na gojišču brez dodane soli šibkejša (PRILOGA A2). Sukcinat je na gojišču brez dodane soli asimilirala večina testiranih sevov, medtem ko ga je na gojišču z dodano soljo asimiliral le eden sev. D-ksiloz je edini vir ogljika, ki ga na gojišču brez soli ni asimiliral noben sev, na gojišču s soljo pa jo je asimilirala večina testiranih sevov.

Preglednica 12: Primerjava posplošenih asimilacij ogljika in dušika.

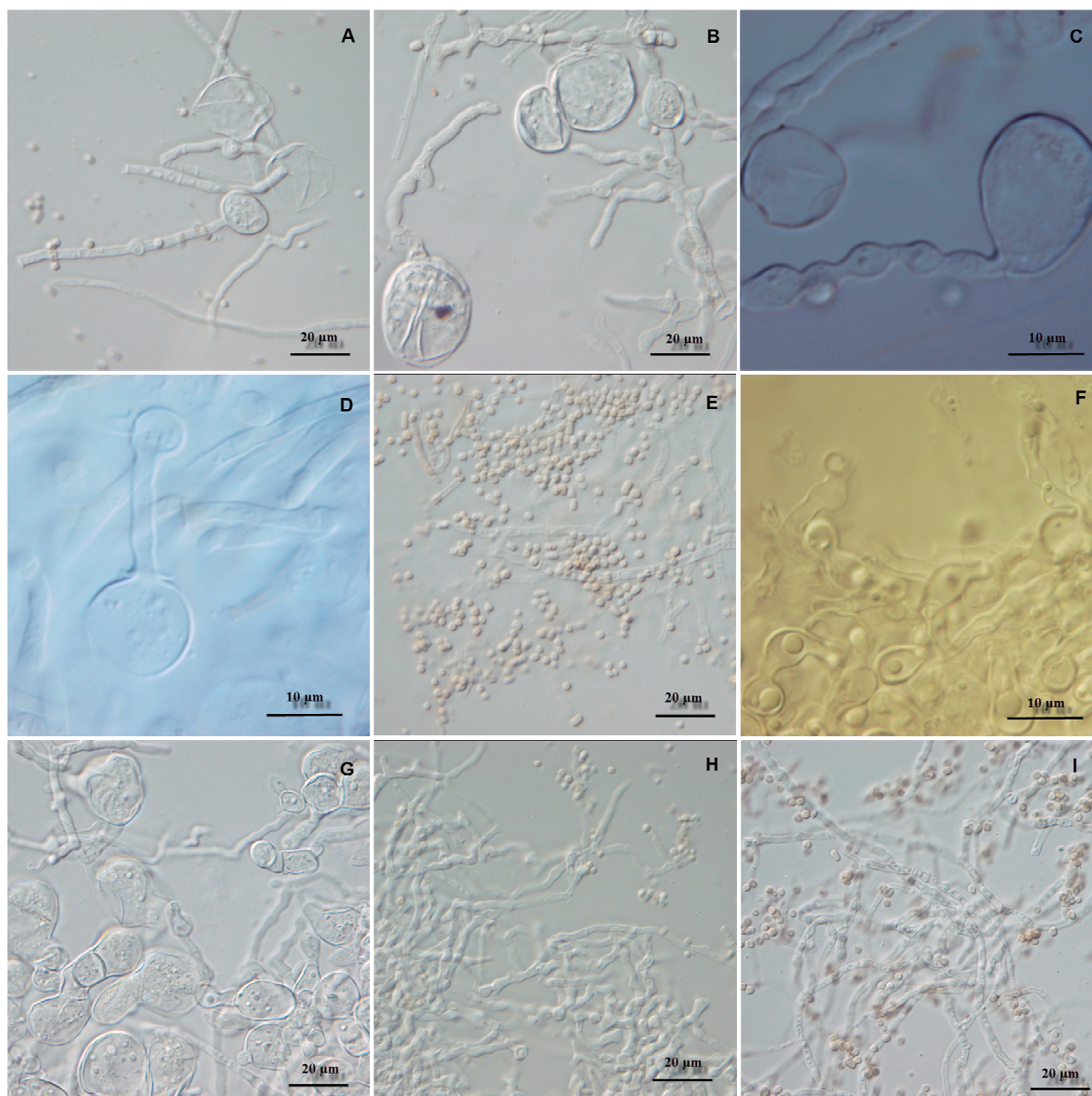
	<i>W. sebi</i>		<i>W. muriae</i>	<i>W. ichthyophaga</i>
	brez dodatka soli	17% NaCl	17% NaCl	17% NaCl
Viri ogljika (C)				
D-glukoza	+	+	+	+
D-galaktoza	w	+	+	+
L-sorboza	+	+	+	+
N-Acetil-glukozamin	w	+	+	+
D-riboza	w	w	w	w
D-ksiloza	w	+	+	+
L-arabinoza	+	+	+	+
D-arabinoza	-	-	-	-
L-ramnoza	w	-	-	-
D-saharoza	w	+	+	+
maltoza	w	+	+	+
D-trehaloza	+	+	+	+
fruktoza	+	+	+	+
celobioza	w	+	+	+
melibioza	-	+	+	+
laktoza	-	-	-	-
D-rafinoza	w	+	+	+
melezitoza	+	+	+	+
topni škrob	-	-	-	-
glicerol	+	+	+	+
mezo-eritrol	+	+	+	+
ribitol	-	w	w	w
D-manitol	+	+	+	+
galaktitol	w	+	+	+
mio-inozitol	w	+	+	+
urea	-	-	-	-
D-glukonat	-	+	+	+
D-glukozamin	-	-	-	-
sukcinat	+	+	+	+
citrat	-	-	-	-
metanol	-	-	-	-
etanol	-	-	-	-
D-sorbitol	+	+	+	+
glukoronska kislina	-	-	-	-
Viri dušika (N)				
nitrat (KNO ₃)	w	w	w	w
nitrit (NaNO ₂)	-	-	-	-
D-glukozamin	+	+	+	+
L-lizin	+	+	+	+

+ dobra rast, w šibka rast, - ni rasti

4.3.2.2 Asimilacijski profil vrste *W. muriae*

Vsi testirani sevi vrste *W. muriae* asimilirajo zgoraj naštetih vire C (PRILOGA A3), le eden (EXF-5673) izmed devetih testiranih sevov ne asimilirata D-glukonata in dva (EXF-5673, EXF-4967) izmed devetih testiranih sevov ne asimilirata sukcinata. Asimilacija D-riboze in ribitola je pri vseh sevih šibka. Slika 4 prikazuje nekatere mikromorfološke posebnosti

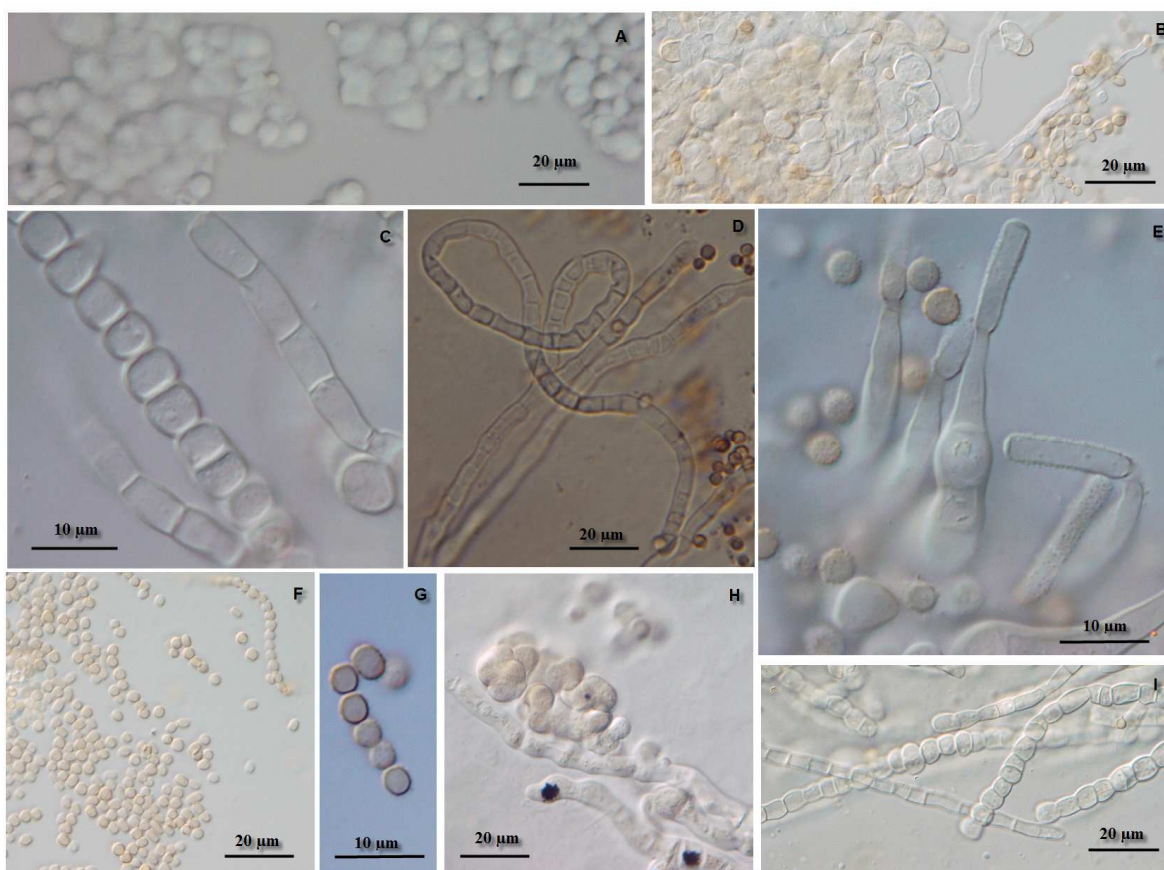
vrst *W. sebi* in *W. muriae* na gojiščih z različnimi viri ogljika in dušika. Zanimive so predvsem akumulacijske vakuole na koncih hif, ki se pojavljajo pri vrstah *W. sebi* in *W. muriae* na vseh gojiščih z različnimi viri ogljika (Slika 4-A, 4-B, 4-C, 4-D).



Slika 4: Mikromorfološki opis vrst *W.sebi* (EXF-958) in *W. muriae* (EXF-951) na gojiščih YNB in YCB s 17% NaCl in z nekaterimi viri ogljika in dušika. A: YNB + L-arabinoza (EXF-958); B: YNB + trehaloza (EXF-958); C: YNB + glicerol (EXF-958); D: YNB + mezo-eritrol (EXF-958); E: YCB + L-lizin (EXF-958); F: YCB + NaNO₂ (EXF-958); G: YNB + D-glukoza (EXF-951); H: YNB + celobioza (EXF-951); I: YCB + KNO₃ (EXF-951).

4.3.2.3 Asimilacijski profil vrste *W. ichthyophaga*

Šest izmed devetih testiranih sevov asimilira zgoraj našteje vire C in N (PRILOGA A4). Trije sevi (EXF-6065, EXF-6068, EXF-6070) izolirani iz grenčice in rezervoarja solin (Slovenija) se močno razlikujejo od ostalih, saj asimilirajo le nekatere vire C. Sev EXF-6065 asimilira L-arabinozo, D-glukonat in šibko ribitol, sev EXF-6068 D-glukozo, D-galaktozo, L-arabinozo, celobiozo, glicerol, D-manitol, galaktitol in šibko ribitol, medtem ko sev EXF-6070 asimilira le šibko L-sorbozo in ribitol kot vir C ter D-glukozamin kot vir N. Sev EXF-1059 edini asimilira D-glukozamin kot vir C, medtem ko smo asimilacijo sukcinata zaznali le pri štirih testiranih sevih. Asimilacije nitrata (KNO_3) in nitrita (NaNO_2) kot vira dušika pri vrsti *W. ichthyophaga* nismo zaznali. Slika 5 prikazuje mikromorfološke značilnosti vrste *W. ichthyophaga* na gojiščih z različnimi viri ogljika in dušika.



Slika 5: Mikromorfološki opis vrste *W. ichthyophaga* (EXF-994) na gojiščih YNB in YCB s 17% NaCl in z nekaterimi viri ogljika in dušika. A: YCB + urea; B, F: YNB + D-riboza; C, I: YNB + L-sorboza; D: YNB + galaktitol; E: YNB + D-saharoza; G: YNB + D-rafinoza; H: YNB + melibioza.

4.3.3 Testiranje tolerance gliv iz rodu *Wallemia* na $MgCl_2$ in $MgSO_4$

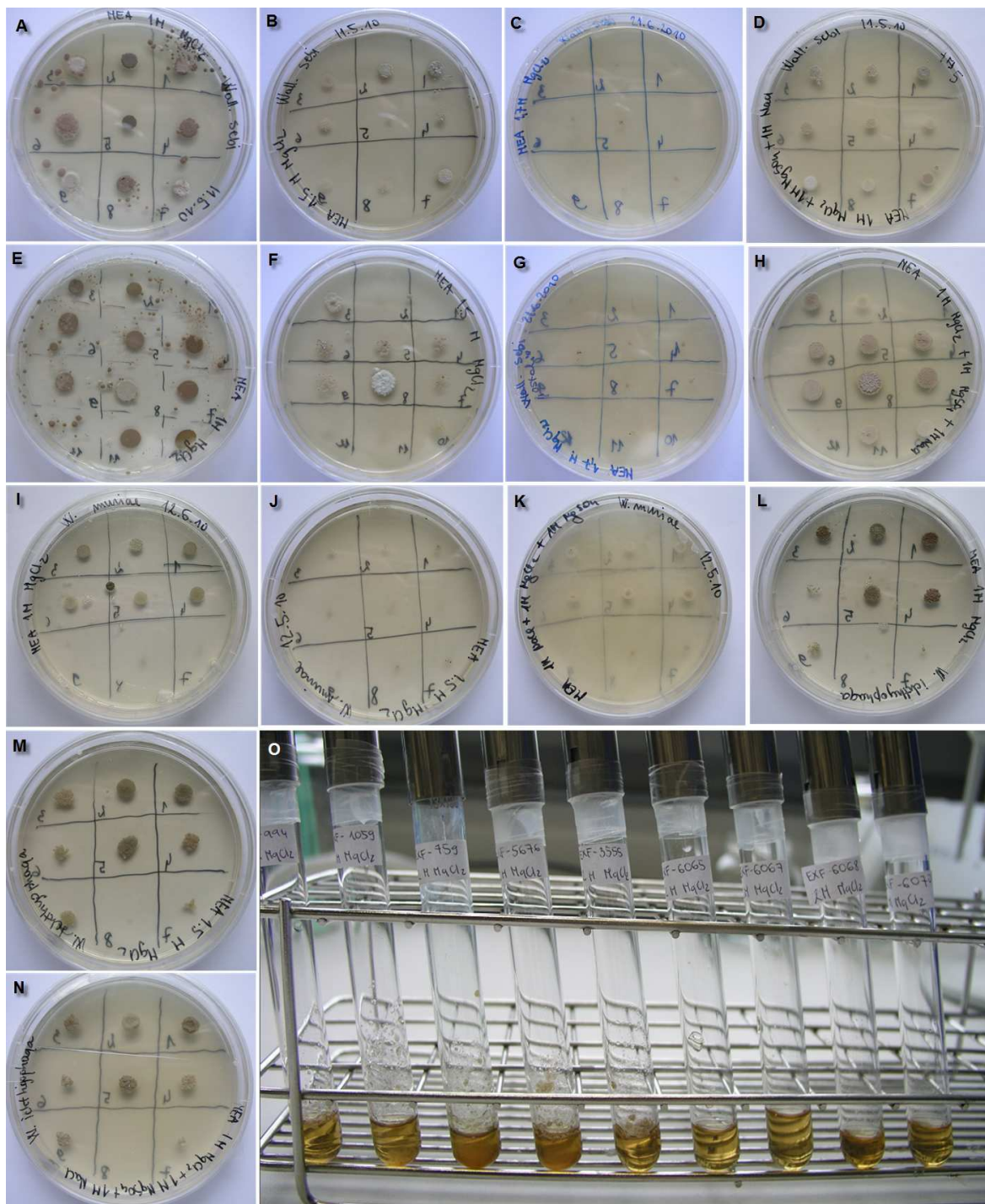
4.3.3.1 Toleranca na $MgCl_2$

Najvišja koncentracija $MgCl_2$, pri kateri sevi še aktivno rastejo, je 1,7 M za vrsto *W. sebi*, 1,5 M za vrsto *W. muriae* ter 2,0 M za vrsto *W. ichthyophaga* (Slika 6, Preglednica 13).

Preglednica 13: Rast gliv iz rodu *Wallemia* na gojišču MEA z dodanimi različnimi koncentracijami $MgCl_2$.

		1 M	1,2 M	1,3 M	1,5 M	1,7 M	1,9 M	2 M*	2,3 M*
<i>W. sebi</i>	EXF-6148	+	-	-	-	-	-	-	-
	EXF-6155	+++	+++	++	++	+	-	+	-
	EXF-585	++++	+++	+++	++	+	-	+	-
	EXF-1263	++++	+++	+++	++	+	-	+	-
	EXF-1261	++++	+++	++	++	+	-	-	-
	EXF-1264	++++	++	++	+	-	-	-	-
	EXF-1266	+++	++	++	+	-	-	-	-
	EXF-1268	++++	++	++	+	-	-	-	-
	EXF-958	++++	++	++	+	-	-	-	-
<i>W. aff. sebi</i>	EXF-6150	+++	++	+	+	-	-	-	-
	EXF-6154	++++	+++	++	+	-	-	-	-
	EXF-6156	+++	+++	+	-	-	-	-	-
	EXF-6158	+++	++	-	-	-	-	-	-
<i>W. aff. muriae</i>	EXF-1274	++++	++	++	+	-	-	-	-
	EXF-6151	++++	+++	++	+	-	-	-	-
	EXF-6152	++++	+++	++	+	-	-	-	-
	EXF-6153	+++	+++	++	+	-	-	-	-
	EXF-6157	+++	+++	+	-	-	-	-	-
	EXF-1265	+++	+	+	-	-	-	-	-
	EXF-6149	++	-	-	-	-	-	-	-
<i>W. muriae</i>	EXF-1269	+++	++	+	-	-	-	-	-
	EXF-951	+++	++	+	-	-	-	-	-
	EXF-1054	++++	++	+	+	-	-	-	-
	EXF-1272	++++	++	+	+	-	-	-	-
	EXF-1285	++++	++	+	-	-	-	-	-
	EXF-1275	+++	++	+	-	-	-	-	-
<i>W. ichthyophaga</i>	EXF-994	++++	++++	++++	++++	+++	++	-	-
	EXF-1059	+++	++++	++++	++++	+++	++	+	-
	EXF-759	+++	++++	++++	++++	+++	++	+	-
	EXF-3555	+++	++++	++++	++++	+++	++	+	-
	EXF-5676	+++	++++	++++	++++	+++	++	+	-
	EXF-6065	++	++++	++++	++++	+++	++	+	-
	EXF-6067	++	+++	++++	++++	+++	++	-	-
	EXF-6068	-	-	++++	++++	+++	++	-	-
	EXF-6070	++	++++	++++	++++	+++	++	-	-

++++ pomeni zelo dobra rast v obliki kompaktnega in nad gojišče dvignjenega micelija, +++ pomeni dobra rast v obliki manj kompaktnega micelija, ++ pomeni šibka rast v obliki rahlega in rahlo nad gojišče dvignjenega micelija, + pomeni zelo šibka rast v obliki svetlega in prosojnega micelija; ni kompaktnega micelija, le posamezni skupki; - pomeni, da aktivne rasti ni. * Za testiranje rasti na 2 M in 2,3 M $MgCl_2$ smo uporabili tekoče gojišče s sladnim ekstraktom.



Slika 6: Rast vrste *W. sebi* na gojišču MEA z dodatkom MgCl₂: A, E: 1M MgCl₂; B, F: 1,5 M MgCl₂; C, G, 1,7 M MgCl₂; D, H: 1 M NaCl, 1 M MgCl₂ in 1 M MgSO₄. Rast vrste *W. muriae* na gojišču MEA z dodatkom: I: 1M MgCl₂; J: 1,5 M MgCl₂; K: 1 M NaCl, 1 M MgCl₂ in 1 M MgSO₄. Rast vrste *W. ichthyophaga* na gojišču MEA z dodatkom: L: 1M MgCl₂; M: 1,5 M MgCl₂; N: 1 M NaCl, 1 M MgCl₂ in 1 M MgSO₄; O: 2,0 M MgCl₂.

4.3.3.2 Toleranca na MgSO₄

Najvišja koncentracija MgSO₄, pri kateri sevi še aktivno rastejo, je 2,5 M za vrsto *W. ichthyophaga* ter 3,5 M za vrsti *W. muriae* ter in *W. sebi* (Preglednica 14).

Preglednica 14: Rast gliv iz rodu *Wallemia* na tekočem gojišču MEA z dodanimi različnimi koncentracijami MgSO₄.

		1 M	1,5 M	2 M	2,5 M	3 M	3,5 M	4 M
<i>W. sebi</i>	EXF-6148	+	++	+	+	+	-	-
	EXF-6155	+++	+++	+++	++	++	+	-
	EXF-585	+++	++++	+++	++	++	+	-
	EXF-1263	+++	++++	++	++	+	+	-
	EXF-1261	+++	++++	+++	++	++	+	+
	EXF-1264	+++	++++	+++	++	++	+	-
	EXF-1266	+++	++++	+++	++	++	+	-
	EXF-1268	+++	++++	+++	++	++	+	-
	EXF-958	+++	++++	+++	++	++	+	-
<i>W. aff. sebi</i>	EXF-6150	+++	++++	+++	++	++	+	-
	EXF-6154	+++	++++	++	++	++	++	-
	EXF-6156	+++	++++	+++	++	++	+	-
	EXF-6158	+++	++++	+++	+++	++	-	-
<i>W. aff. muriae</i>	EXF-1274	+++	++++	+++	++	++	+	-
	EXF-6151	+++	++++	+++	+++	++	++	-
	EXF-6152	++++	++++	+++	++	++	+	-
	EXF-6153	+++	++++	+++	+++	++	++	-
	EXF-6157	+++	+++	++	++	++	+	-
	EXF-1265	++	+++	+++	++	++	+	-
	EXF-6149	+	+++	++	+	+	+	-
<i>W. muriae</i>	EXF-1269	++	++	++++	+++	++	+	-
	EXF-951	+++	+++	++++	+++	++	++	-
	EXF-1054	+++	+++	++++	+++	++	++	+
	EXF-1272	++	++	++++	+++	++	+	-
	EXF-1285	++	++	++++	+++	+	+	-
	EXF-1275	++	++	++++	+++	+	+	-
<i>W. ichthyophaga</i>	EXF-994	-	+	++	+	-	-	-
	EXF-1059	-	+	++	+	-	-	-
	EXF-759	-	-	++	+	-	-	-
	EXF-3555	-	-	+	+	-	-	-
	EXF-5676	-	-	++	+	-	-	-
	EXF-6065	-	-	++	-	-	-	-
	EXF-6067	-	-	+	-	-	-	-
	EXF-6068	-	-	+	-	-	-	-
	EXF-6070	-	-	-	-	-	-	-

++++ pomeni zelo dobra rast v obliki kompaktnega micelija, ki v celoti prikriva gladino gojišča, +++ pomeni dobra rast v obliki manj kompaktnega micelija, ki v celoti prikriva gladino gojišča ++ pomeni šibka rast v obliki rahlega micelija, + pomeni zelo šibka rast v obliki svetlih in prosojnih kolonij, ni kompaktnega micelija, le posamezni skupki; - pomeni, da aktivne rasti ni.

4.3.3.3 Toleranca na mešanico soli NaCl, MgCl₂ in MgSO₄

Na gojišču MEA z dodatkom 1 M NaCl, 1 M MgCl₂ in 1 M MgSO₄ rastejo vse vrste rodu *Wallemia* (Preglednica 15). Najboljšo rast smo zaznali pri vrsti *W. ichthyophaga* (Slika 6-N), dobro raste tudi vrsta *W. sebi* (Slika 6-D, 6-H) medtem ko vrsta *W. muriae* raste zelo slabo (Slika 6-K). Skupini *W. aff. muriae* in *W. aff. sebi* izkazujeta podobno rast kot vrsta *W. sebi*.

Preglednica 15: Rast gliv iz rodu *Wallemia* na gojišču MEA z 1 M NaCl, 1 M MgCl₂ in 1 M MgSO₄.

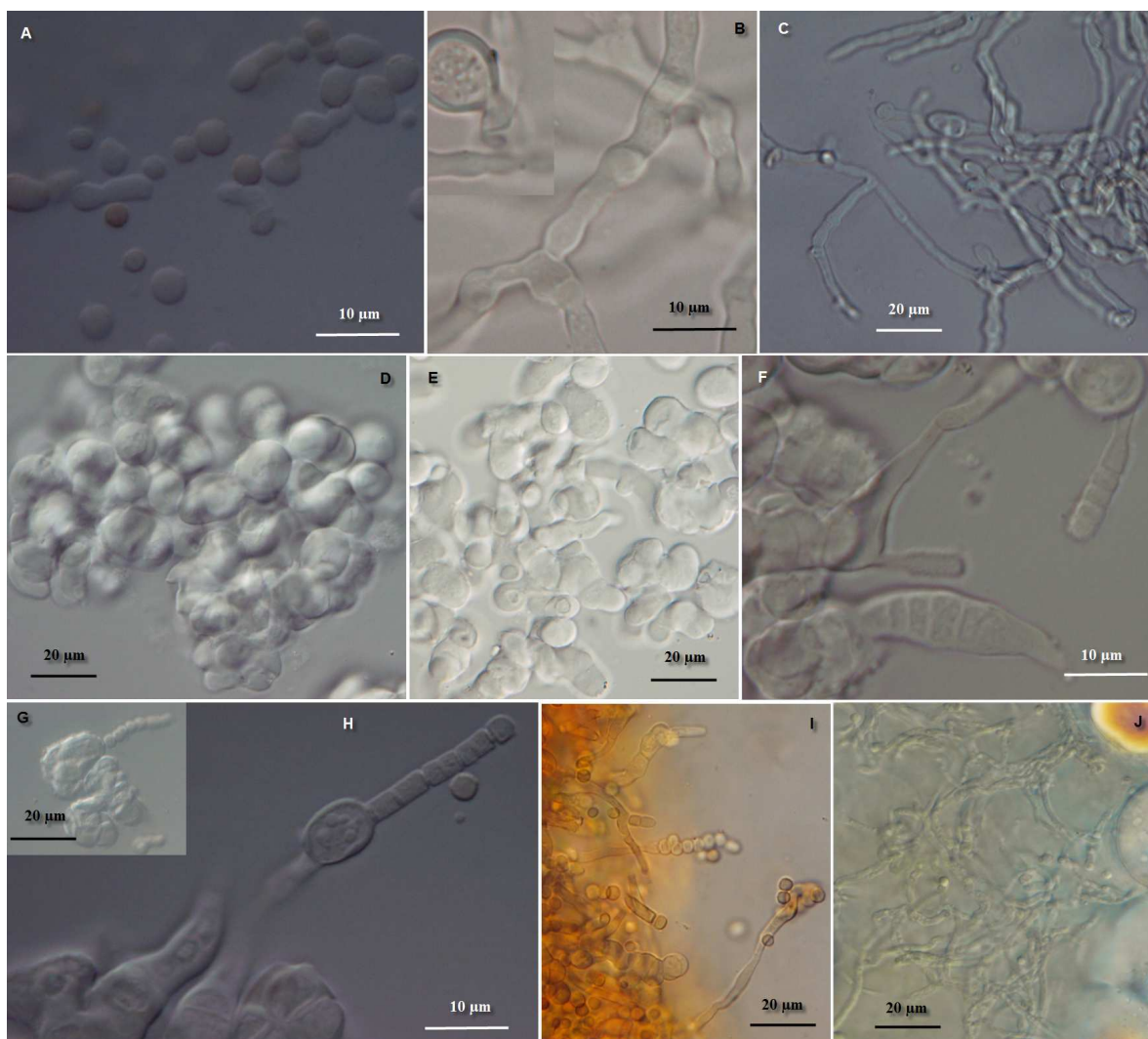
<i>W. sebi</i>		<i>W. aff. sebi</i>		<i>W. aff. muriae</i>		<i>W. muriae</i>		<i>W. ichthyophaga</i>	
EXF-6148	+++	EXF-6150	+++	EXF-1274	+++	EXF-1269	+	EXF-994	++++
EXF-6155	+++	EXF-6154	+++	EXF-6149	+++	EXF-951	+	EXF-1059	++++
EXF-585	+++	EXF-6156	+++	EXF-6151	+++	EXF-1054	+	EXF-759	++++
EXF-1263	+++	EXF-6158	+++	EXF-6152	+++	EXF-1272	+	EXF-3555	++++
EXF-1261	+++			EXF-6153	+++	EXF-1285	+	EXF-5676	++++
EXF-1264	++			EXF-6157	+++	EXF-1275	+	EXF-6065	++++
EXF-1266	+++			EXF-1265	+++			EXF-6067	++++
EXF-1268	+++							EXF-6068	++++
EXF-958	+++							EXF-6070	++++

++++ pomeni zelo dobra rast v obliki kompaktnega in nad gojišče dvignjenega micelija, +++ pomeni dobra rast v obliki manj kompaktnega micelija, ++ pomeni šibka rast v obliki rahlega in rahlo nad gojišče dvignjenega micelija, + pomeni zelo šibka rast v obliki svetlega in prosojnega micelija; ni kompaktnega micelija, le posamezni skupki; - pomeni, da aktivne rasti ni.

4.3.3.4 Mikromorfologija gliv rodu *Wallemia* na gojišču z dodatkom soli

Vrsta *W. sebi* raste na gojišču z dodatkom 1 M MgCl₂ v obliki pravih hif, pri 1,5 M so hife nepravilnih oblik in debelejše (Slika 7-B, 7-C), medtem ko na gojišču z dodatkom 1,7 M MgCl₂ raste v obliki kvasovkam podobnih celic (Slika 7-A). Z višanjem koncentracije MgSO₄ v gojišču postajajo hife debelejše in bolj nepravilnih oblik. Vrsta *W. sebi* na gojiščih z dodatkom MgCl₂ in MgSO₄ ne tvori spor. Vrsta *W. muriae* prav tako kot vrsta *W. sebi* na gojišču z dodatkom 1 M MgCl₂ raste v obliki pravih hif, ki z višanjem koncentracije postajajo nepravilnih oblik. Pri vrsti *W. muriae* nismo zaznali rasti v obliki kvasovkam podobnih celic. Na gojiščih z dodatkom MgSO₄ tvori tanke hife pravih oblik in sporulira (Slika 7-J). Vrsta *W. ichthyophaga* raste na gojišču z dodatkom 1 M MgCl₂ v obliki rahlih celičnih skupkov, ki z višanjem koncentracije postajajo bolj kompaktni (Slika 7-D), celice pa bolj rigidne, saj se jim odebeli celična stena (Slika 7-E). Na gojiščih z MgCl₂ nismo opazili sporulacije. Vrsta *W. ichthyophaga* najbolj aktivno raste na gojišču z dodatkom mešanice soli. Raste v obliki celičnih skupkov (meristematska rast), ponekod

celični skupki brstijo v nepravne hife. Na gojišču z dodatkom mešanice soli oblikuje jasne konidiofore, na katerih se razvijajo značilne tetrade spor (Slika 7-F, 7-G, 7-H). Vrsta *W. ichthyophaga* aktivno raste tudi na gojišču z dodatkom 2 M $MgSO_4$, saj poleg celičnih skupkov razvije tudi nepravne hife, konidiofore in spore (Slika 7-I).

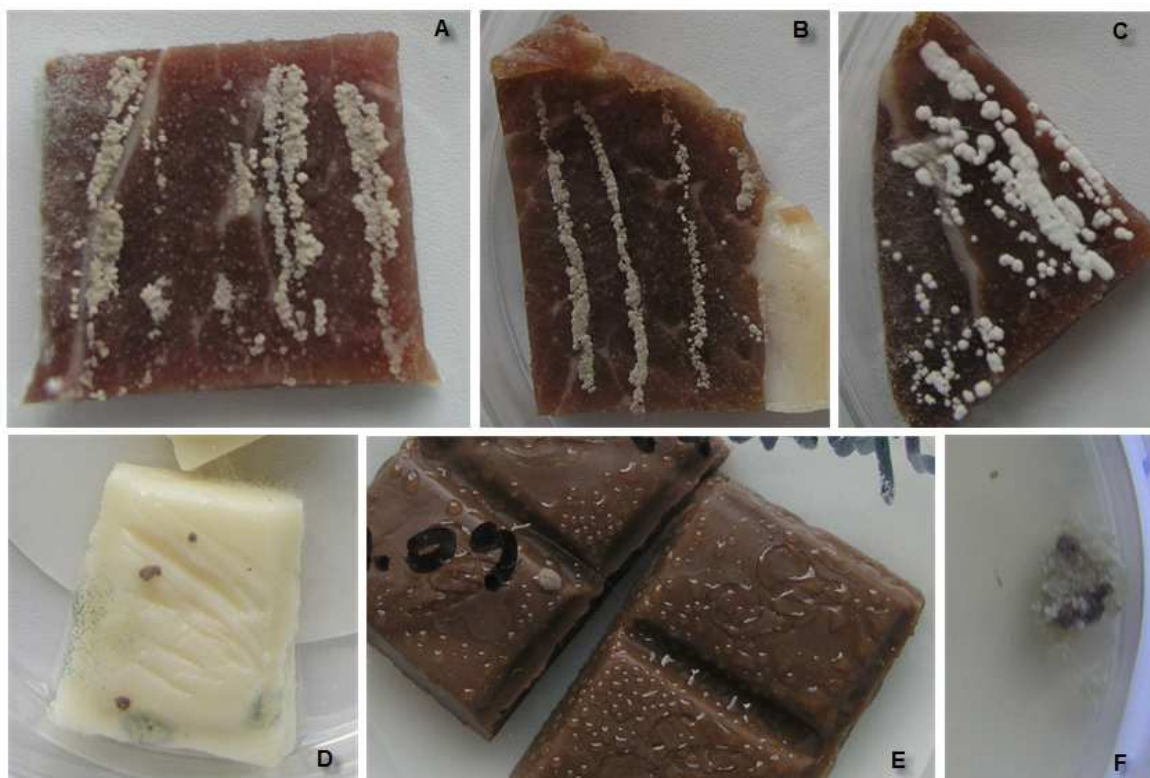


Slika 7: Mikromorfologija rodu *Wallemia* na gojiščih MEA z dodatkom soli $NaCl$, $MgCl_2$ in $MgSO_4$.

Vrsta *W. sebi* (EXF-958) na gojišču MEA z dodatkom: A: 1,7 M $MgCl_2$; B, C: 1,5 M $MgCl_2$. Vrsta *W. ichthyophaga* na gojišču MEA z dodatkom: D: 2 M $MgCl_2$ (EXF-3555); E: 2 M $MgCl_2$ (EXF-759); F, G, H: 1 M $NaCl$, 1 M $MgCl_2$ in 1 M $MgSO_4$ (EXF-994); I: 2 M $MgSO_4$ (EXF-994). Vrsta *W. muriae* na gojišču MEA z dodatkom: J: 2 M $MgSO_4$ (EXF-994).

4.4 EKOLOGIJA GLIV IZ RODU *Wallemia*

Glede na izolacije iz ozmotsko stresnih okolij smo pridobili nova spoznanja o ekologiji znotraj rodu *Wallemia*. Predstavnike vseh treh znanih vrst smo kljub različni stopnji halotolerance in kserotolerance izolirali iz izjemno slanega okolja solin in iz sladke, suhe in slane hrane (Preglednica 11, Slika 8).



Slika 8: Rast gliv iz rodu *Wallemia* na različnih substratih.

Rast (A) *W. ichthyophaga* EXF-994 (=CBS 113033), (B) *W. muriae* EXF-951 (=CBS 116628) in (C) *W. sebi* EXF-958 (=CBS 818.96) na pršutu; rast in izolacija (D) *W. sebi* (EXF-5828) iz bele čokolade, (E) *W. muriae* EXF-5921 iz mlečne čokolade in (F) *W. ichthyophaga* EXF-5676 iz kristala soli.

Vrsta *W. sebi* poseljuje različna bolj ali manj ozmotsko stresna okolja. Izolate smo pridobili iz izjemno slane vode solin in slanih jezer, iz soli in iz ostalih substratov iz solin kot tudi iz sladke (čokolada, marmelada,) in suhe (koruza, suha kokosova pulpa, bel kruh) hrane. Posamezne izolate smo pridobili iz okolja, ki je tako ali drugače povezano s čebelami (cvetni prah, zrak pred čebelnjakom in cvetlice), iz kmečkega okolja (seno, skedenj za seno, koroza), iz zraka bivalnih prostorov.

Skupina, ki smo jih poimenovali *Wallemia* aff. *sebi*, naseljuje soline, sladko (javorjev sirup, čokolada) kot tudi suho hrano (kruh, posušena kokosova pulpa), in rastline. Posamezne seve smo izolirali tudi iz zraka okoli čebelnjaka in iz stene bivalnih prostorov (otroška soba).

Skupina, ki smo jih poimenovali *Wallemia* aff. *muriae* naseljuje sladko hrano (pokvarjena marmelada, čokolada), tla (običajna, šota) in rastline.

Vrsta *W. muriae* naseljuje slana okolja, ki so bolj ali manj povezana s solinami, saj smo seve izolirali tako iz solinske vode kot tudi iz mulja in površine halofitov. Naseljuje tudi sladko hrano (čokolada, sladkorna raztopina), žita in cvetni prah ter notranjost bivalnih prostorov (kuhinja, otroška soba, dnevna soba, spalnica).

Vrsta *W. ichthyophaga* poseljuje le izjemno slana okolja, saj smo izolate pridobili iz hiperslane vode solin (grenčica, rezervoar), kristalov soli in slane hrane (slani suhomesnati izdelki). Vse izolate smo pridobili iz Slovenije (do sedaj opisan le en izolat iz Afrike).

Dva izolata nove vrste, ki smo jo poimenovali *Wallemia* sp. smo izolirali iz ječmena in cvetnega prahu bršljana v Sloveniji. Izolata sta halotolerantna, saj rasteta tako na gojišču MEA brez dodanega NaCl kot tudi na gojišču MEA z 10% NaCl.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Rod *Wallemia* je bil opisan leta 1867 na podlagi vrste *W. ichthyophaga* (Johan-Olsen, 1887). Ta vrsta je bila kasneje opisana kot sinonim vrste *W. sebi*, ki je bila do leta 2005 edina priznana vrsta rodu *Wallemia*. Zalar in sodelavci so leta 2005 izvedli obsežno taksonomsko raziskavo, ko so na podlagi ekofizioloških, morfoloških in molekularno-genetskih razlik med izolati opisali tri vrste (*W. sebi*, *W. muriae* in *W. ichthyophaga*), od katerih sta slednji dve ponovno priznani vrsti, sicer opisani že 1867 in 1887. Rod je za znanost zanimiv iz več pogledov. Vse vrste rodu *Wallemia* so kserofilne, medtem ko vrsta *W. ichthyophaga* velja tudi za najbolj halofilen evkariontski organizem opisan doslej in je zato dober modelni organizem za študije adaptacij na slana okolja. Ker so dandanes kmetijska zemljišča vedno bolj zasoljena (suše, intenzivno kmetijstvo, soljenje cest), bi lahko tovrstne adaptacijske mehanizme gliv z genskim inženiringom aplicirali v kulturne rastline in jim s tem omogočili rast na zasoljenih tleh. Vrste iz rodu *Wallemia* so pomembni kontaminanti suhe ter s sladkorjem in s soljo (NaCl) konzervirane hrane (Pitt in Hocking, 1999), hkrati pa tudi patogene (Guarro in sod., 2008), zato je poznavanje fiziologije in ekologije za človeka tako pomembno. Iz filogenetskega stališča pa je rod zanimiv zaradi starodavnosti ter odmaknjenosti od drugih vrst znotraj debla Basidiomycota znotraj kraljestva gliv in zaradi sorodstvene oddaljenosti med opisanimi vrstami.

5.1.1 Vzorčenje z namenom izolacije sevov rodu *Wallemia*

Da bi pridobili čim bolj popoln pregled nad geografsko razširjenostjo posameznih vrst rodu *Wallemia*, smo testirali različno ozmotsko stresne substrate iz Slovenije in drugih evropskih držav (Nizozemska, Hrvaška, Islandija, Italija, Nemčija, Turčija), Azije (Indonezija, Japonska, Nepal), Afrike (Tanzanija, Namibija) in Amerike (ZDA, Argentina). Na podlagi dosedanjih objav o halofilni in halotolerantni naravi vrst rodu *Wallemia* (Zalar in sod., 2005) smo testirali različna umetna izjemno slana okolja, kamor sodijo solarne soline in s soljo konzervirana hrana (prekajena šunka, pršut, bodjola, ogrska salama), medtem ko smo od naravnih izjemno slanah okolij testirali le Veliko Slano Jezero

(ZDA). Oren (2002) med naravna izjemno slana okolja prišteva tudi hiperslana tla, slana močvirja, globokomorske izjemno slane bazene, slana področja naftnih polj in starodavne depozite soli, ki pa jih zaradi geografske oddaljenosti in nedostopnosti nismo testirali. Testirali smo sladkor ter sladkorne raztopine in različno hrano, ki ji je sladkor dodan. Od take hrane smo testirali čokolado (mlečna, temna, bela, slana, z lešnikovo kremo, z mentolovim polnilom), čokoladne namaze, torte (malinova s smetano), džeme in marmelade (slivova, marelična, mešana), suho sadje (marelice, hruške, slive, fige, murva), ki po navajanju Pitt in Hocking (2010) sodi med s sladkorji koncentrirana živila. Od takih živil nismo testirali sirupov, medu, bombonov in marcipana. Kontaminiranost medu z glivami rodu *Wallemia* so testirali na Kmetijskem inštitutu (Slovenija), vendar iz 76 različnih vzorcev medu niso izolirali niti enega seva omenjenega rodu. (H.-J. Schroers, neobjavljeni podatki), čeprav so Kunčič Kralj in sodelavci (2010) dokazali, da vrste lahko rastejo celo do 90% medu. Testirali smo tudi različna žita (zimska pšenica, ječmen, tritikala, jara pšenica, koruza), semena (sončnična, konopljina, sezamova), začimbe (vegeta, kava, kakav, sladkor), čaje (žajbljev, šipkov) in moko. Pitt in Hocking (2010) slednje uvrščata med suho hrano, od katere bi lahko testirali še pekovske izdelke, stročnice, orehe, oreščke, arašide, lešnike, mandlje, pistacije, kokosovo moko, kavna zrna in mleko v prahu.

Iz ozmotsko stresnih okolij smo osamili 38 sevov gliv iz rodu *Wallemia*. Dvanajst sevov smo naročili iz različnih mikrobioloških zbirk po svetu, ki so bili izolirani iz za nas geografsko bodisi nedosegljivih območij bodisi iz zanimivih substratov. Z njihovo identifikacijo smo pridobili bolj popoln pregled nad geografsko razširjenostjo posameznih vrst rodu *Wallemia*.

5.1.2 Molekularno-genetska in fiziološka karakterizacija

Rod *Wallemia* so Zalar in sodelavci (2005) na podlagi filogenetske analize nukleotidnega zaporedja ITS rDNA uvrstili med bazidiomicetne glive. Bližnje sorodstvo z bazidiomicetnimi glivami je podprto tudi z nekaterimi morfološkimi značilnostmi (bazoavksalni tip konidiogeneze, dolipore, artrosporam podobni konidiji). Rod zaenkrat vključuje tri opisane vrste, vendar smo tekom raziskave identificirali dodatno novo vrsto.

Vrsti *W. sebi* in *W. muriae* sta si molekularno, morfološko in fiziološko podobni, medtem ko se vrsta *W. ichthyophaga* na vseh nivojih od njiju razlikuje.

Zalar in sodelavci (2005) so uvedli razlikovanje med vrstami rodu *Wallemia* na podlagi molekularnih (ITS rDNA nukleotidno zaporedje), morfoloških (velikost konidijev) in fizioloških (kserotoleranca) lastnosti. Vrsta *W. sebi* je iz fiziološkega stališča kserotolerantna, zato edina raste na gojišču brez dodanih topljencev, medtem ko sta ostali dve vrsti kserofilni in rasteta samo na gojišču z dodanim topljencem, *W. muriae* najbolj pri vodni aktivnosti okoli 0,985, *W. ichthyophaga* pa pri vodni aktivnosti okoli 0,90. Morfološko se vrste ločijo predvsem v velikosti konidijev. Premer konidijev vrste *W. sebi* je 1,5-2,5 μm , vrste *W. muriae* 2,5-3,0 μm , medtem ko so konidiji vrste *W. ichthyophaga* največji in v premeru merijo 3,5-5,0 μm (Slika 5-E, 5-F, 5-G). Vrsta *W. ichthyophaga* ima edina sarcinam podobne strukture (Slika 5-A), od ostalih pa se loči tudi na podlagi oblike kolonij, ki imajo možganom podobno površino.

Zalar in sodelavci (2005) navajajo, da je glavna skupna morfološka značilnost gliv iz rodu *Wallemia* poseben tip konidiogeneze, ki se izraža v nespolnih konidijih v četvorkah, ki apikalno razpadejo na posamezne enote (Slika 5-F, 5-H). Tudi po drugih morfoloških značilnostih so si vrste med seboj izjemno podobne, zato smo iskali dodatne fenotipske lastnosti, na podlagi katerih bi jih ločevali. Izvedli smo encimske teste, asimilacijske teste ter testirali toleranco na različne soli (NaCl, MgCl₂ in MgSO₄).

Za razliko od rodu *Aspergillus*, ki je encimsko zelo aktiven rod, smo pri vrstah rodu *Wallemia* detektirali le malo ekstracelularnih encimov. Na podlagi posplošenih rezultatov encimskih testov (Preglednica 11) smo ugotovili, da je encimska aktivnost med opisanimi vrstami zelo podobna, vendar obstajajo nekatere razlike, na podlagi katerih lahko ločimo med njimi. Test API ZYM (Biomerieux) je semikvantitativna metoda, ki temelji na detekciji hidrolitičnih encimov in se med drugim uporablja tudi za identifikacijo nesporulirajočih gliv. Łukaszuk in sodelavci (2005) so test uporabili za ločevanje med biotipi rodu *Candida*, ki so jih izolirali iz pacientov z rakom. Pri vseh so zaznali visoke koncentracije levcin in cistein aminopeptidaz ter esteraz. Tekom raziskave smo z omenjenim testom pri vseh treh vrstah zaznali visoke koncentracije encimov alkalna in

kisla fosfataza, ki jih uvrščamo v skupino fosfataz. Fosfataze hidrolizirajo estre in anhidride fosforne kisline. Vključene so v vse biološko pomembne procese (celični cikel, diferenciacija in drugi), kjer zagotavljajo fosfor. Med kisle fosfataze uvrščamo tudi fitaze, ki hidrolizirajo fitično kislino. Fitična kislina je fosforiliran ogljikov hidrat in glavni vir fosforja v mnogih rastlinskih tkivih, predvsem v žitih (Wyckoff, 1987). Fosfoamidazo, ki hidrolizira spojine s fosfoamidno vezjo (fosfokreatin), smo v visokih koncentracijah zaznali pri vrstah *W. sebi* v gojišču brez in z dodatkom 10% NaCl in *W. muriae* v gojišču z dodatkom 10% NaCl, medtem ko omenjenega encima pri vrsti *W. ichthyophaga* v gojišču z dodatkom 17% NaCl nismo zaznali.

Encime za razgradnjo sladkorjev smo v večjih koncentracijah zaznali le pri vrstah *W. muriae* in *W. ichthyophaga* v gojiščih z dodatkom soli. Pri obeh vrstah smo zaznali encime α - in β -galaktozidaza ter α -glukozidaza, pri vrsti *W. ichthyophaga* pa tudi encim β -glukozidaza in *N*-Acetil- β -glukozamidaza, ki je ključen encim za razgradnjo hitina. Encim β -glukozidaza smo s presevnimi encimskimi metodami (Peterson in sod., 1995) v nasprotju z API ZYM testi zaznali pri vseh vrstah rodu *Wallemia*. S presevnimi encimskimi metodami in na gojiščih z konjugiranimi polisaharidi smo zaznali šibko ksilanazno aktivnost. Raspor in sodelavci (1996) v virih navajajo, da je ksilan glavna hemicelulozna komponenta rastlinskih celičnih sten. Glivni encimi, ki ga razgrajujejo so poleg ksilanaze še endoksilanaze, ksilozidaze, glukoronizidaze, arabinofuranozidaze in acetil esteraze. Encimov za razgradnjo celuloze in škroba pri vrstah rodu *Wallemia* nismo zaznali, čeprav se različne celulaze pri glivah pogoste. Najbolj temeljite encimske in genetske študije so bile narejene z glivami rodu *Trichoderma* in z glivo *Phanerochaete chrysosporium* (Raspor in sodelavci, 1996). Glive proizvajajo pri rasti na celulozi vsaj tri različne vrste ekstracelularne aktivnosti: endo in ekso β -1-4-glukanaze, ki jih pri glivah iz rodu *Wallemia* nismo zaznali, ter β -1-4-glukozidazo, ki smo jo zaznali pri vseh vrstah rodu *Wallemia*.

Vse tri vrste dobro rastejo na pršutu (Slika 8-A, 8-B, 8-C), zato smo pričakovali lipolitično in proteolitično aktivnost. Vendar smo od esteraz in lipaz zaznali šibko aktivnost le pri vrsti *W. sebi* v gojišču brez dodatka soli, pa tudi pri vrsti *W. ichthyophaga* na gojišču z dodatkom soli. Esterazno aktivnost smo pri vseh opisanih vrstah rodu *Wallemia* zaznali tudi s presevnimi encimskimi metodami. Proteaze levcin aminopeptidaza, cistin

aminopeptidaza in valin aminopeptidaza) smo v majhnih količinah zaznali le pri vrsti *W. muriae*, medtem ko drugih proteaz (tripsin, kimotripsin) nismo zaznali. Proteolitična aktivnost na kazein je bila pozitivna le pri enem od sedemnajstih testiranih sevov, ki pripada vrsti *W. muriae*, in sicer po dolgotrajno inkubaciji. Proteaz z uporabo komercialnega kita za določevanje proteolitične aktivnosti, ki temelji na razpadu kazeina z vezanim FITC (fluorescin izotiocianat) (Twining, 1984) nismo zaznali.

Ogljikovi hidrati zasedajo centralno pozicijo v metabolizmu gliv. Razni monosaharidi, oligosaharidi in polisaharidi, zlasti pa glukoza, so za večino gliv dober vir ogljika. Poleg tega tvorijo glavne komponente celične stene in se pri določenih pogojih akumulirajo kot rezervne snovi v celici (Raspor in sodelavci, 1996). Izdelali smo asimilacijski profil rodu *Wallemia*, ki pa se med vrstami bistveno ne razlikuje. Vse tri opisane vrste so kot vir ogljika na gojišču z dodatkom 17% NaCl asimilirale nekatere enostavne sladkorje ali monosaharide (D-glukoza, D-galaktoza, D-ksiloza, fruktoza, L-sorboza, L-arabinoza, D-riboza) in njihove derivate (*N*-Acetil-glukozamin), disaharide (D-saharoza, maltoza, D-trehaloza, celobioza in melibioza) ter D-rafinozo in melezitozo, ki sta po kemijski zgradbi trisaharida. Nekateri sladkorji, predvsem trehaloza, so pomembna zaščitna snov proti vročini, dehidraciji in še drugim stresom (Raspor, 1996). Galinski in Trüper (1994) navajata, da so pri glivah sladkorni alkoholi in poliolli najbolj razširjeni kompatibilni topljenci, med katerimi so najpogostejši glicerol, eritritol, ribitol, arabitol, ksilitol, sorbitol, manitol in galaktitol. Tekom raziskave smo to tudi potrdili, saj smo zaznali dobro asimilacijo D-manitola, mio-inozitola, D-sorbitola, ribitola, mezo-eritrola, galaktitola in predvsem glicerola in manitola. Slednja dva sta poleg arabitola količinsko najbolj zastopana kompatibilna topljenca pri glivah iz rodu *Wallemia* (Zajc, 2009). Glive rodu *Wallemia* ne asimilirajo D-arabinoze, L-ramnoze, laktoze, topnega škroba, etanola, metanola, citrata, D-glukozamina, uree, in glukoronske kisline kot vira C. Pri vrsti *W. sebi* se asimilacija virov ogljika in dušika malo razlikuje glede na prisotnost soli. Na gojiščih brez dodatka soli smo zaznali šibkejšo in počasnejšo rast, hkrati pa smo na gojiščih brez dodatka soli zaznali šibko asimilacijo nekaterih virov ogljika (L-ramnoza), ki je na gojišču z dodatkom soli nismo.

Raspor in sodelavci (1996) v virih navajajo, da lahko mnoge glive asimilirajo anorganski dušik (nitrat ali amonij) ali pa kot vir dušika uporabljajo različne organske spojine. Medtem ko smo pri vseh vrstah zaznali dobro asimilacijo organskega vira dušika (D-glukozamin in L-lizin), je bila asimilacija anorganskega vira dušika (nitrat (KNO₃)) pri vseh vrstah šibka. Asimilacije nitrita (NaNO₂) kot anorganskega vira dušika pri glivah rodu *Wallemia* makroskopsko nismo zaznali, smo pa z mikroskopijo zaznali šibko rast. Vrsta *W. sebi* raste na gojišču z nitritom v obliki odebeljenih hif (Slika 4-F).

Toleranca na različne soli, predvsem MgCl₂ in MgSO₄, je fenotipska lastnost, s katero lahko ločimo med posameznimi vrstami rodu *Wallemia*. Vrst *W. sebi* in *W. muriae* na ta način ne moremo ločiti, lahko pa omenjeni vrsti ločimo od vrste *W. ichthyophaga*. Vrsta *W. ichthyophaga* namreč tolerira najvišje koncentracije MgCl₂ v gojišču (1,9-2,0 M), vrsta *W. muriae* najnižje (1,3-1,5 M), medtem ko vrsta *W. sebi* in predstavniki skupin *Wallemia* aff. *sebi* ter *Wallemia* aff. *muriae* tolerirajo od 1,5 M do 1,7 M MgCl₂ v gojišču. Z uporabo izolacijskih gojišč z dodatkom 1,7 M MgCl₂ bi lahko selektivno izolirali vrsto *W. ichthyophaga*, ki je najbolj spregledana vrsta rodu *Wallemia*, saj je do danes znanih le šest izolatov (Zalar in sodelavci, 2005). Za razliko od MgCl₂, vrsta *W. ichthyophaga* tolerira najnižje koncentracije MgSO₄ v gojišču (2-2,5 M), vrsta *W. muriae* pa najvišje (3,5-4,0 M). Podobno koncentracijo MgSO₄ v gojišču kot vrsta *W. muriae*, tolerira tudi vrsta *W. sebi* in predstavniki skupin *Wallemia* aff. *sebi* ter *Wallemia* aff. *muriae*. Na gojišču z dodatkom 1 M NaCl, 1 M MgCl₂ in 1 M MgSO₄ smo najboljšo rast zaznali, prav tako kot na gojiščih z MgCl₂, pri vrsti *W. ichthyophaga*, kar pomeni, da ima MgCl₂ največji vpliv na rast organizmov na omenjenem gojišču.

5.1.3 Taksonomija in ekofiziologija gliv iz rodu *Wallemia*

Na podlagi nukleotidnega zaporedja ITS rDNA smo predstavnike, ki smo jih tekom raziskave izolirali iz ozmotsko stresnih okolij, uvrstili v tri že opisane vrste (*W. sebi*, *W. muriae* in *W. ichthyophaga*), v vrsti *W. sebi* sorodno skupino *Wallemia* aff. *sebi*, v vrsti *W. muriae* sorodno skupino *Wallemia* aff. *muriae*, ter v dodatno novo vrsto *Wallemia* sp. (Slika 2).

Zalar in sodelavci (2005) v virih navajajo, da se znotraj vrste *W. sebi* pojavljata dve različni monofiletski, vendar fenotipsko identični skupini, kar smo tekom raziskave tudi potrdili. Skupino, v katero na podlagi nukleotidnega zaporedja ITS rDNA uvrščamo tudi tipski sev vrste *W. sebi* EXF-958 (=CBS 818.96), smo poimenovali *W. sebi*, medtem ko smo drugo, vrsti *W. sebi* sorodno skupino, poimenovali *Wallemia* aff. *sebi*. Vrsta *W. sebi* in skupina *Wallemia* aff. *sebi* sta si ekološko in fiziološko zelo podobni. Kljub temu da predstavniki obeh naseljujejo podobne substrate, bomo skupini obravnavali ločeno.

Največ podatkov o ekologiji rodu se nanaša na vrsto *W. sebi*, saj se zaradi kserotolerantne narave pojavlja v vseh okoljih, tudi takšnih brez znižane vodne aktivnosti, hkrati pa jo je mogoče evidentirati z gojišči brez dodanih topljencev (a_w 0,99). Optimalno raste pri vodni aktivnosti od 0,976 do 0,957, maksimalna vodna aktivnost, pri kateri vrsta še raste je 0,83 (Zalar in sodelavci, 2005). Proti pričakovanju smo iz ozmotsko stresnih okolij osamili malo sevov vrste *W. sebi* (EXF-5920, EXF-1913, EXF-5752, EXF-5860, EXF-5746, EXF-1441, EXF-6148, EXF-6155, EXF-1442, EXF-5747, EXF-992). Potrdili smo, da naseljuje izjemno slana okolja, kot je izjemno slana voda solin v Sloveniji in Italiji ter izjemno slano vodo Velikega slanega jezera (ZDA). Izolati iz izjemno slane vode so znani tudi iz Namibije, Izraela in Španije (Zalar in sodelavci, 2005). Po en sev vrste *W. sebi* smo izolirali iz soli ter iz trupla poginulega in v izjemno slani vodi ležečega galeba v Sloveniji. Proti pričakovanju smo samo po en sev izolirali iz sladke (čokolada) in suhe hrane (koruza), saj Zalar in sodelavci (2005) navajajo, da naseljuje sončnična semena, ječmen, rž in pšenico v Veliki Britaniji in na Švedskem. Vrsta *W. sebi* naseljuje suho seno, ki se uporablja za krmo živine v Veliki Britaniji (Zalar in sodelavci, 2005), kar smo tekom raziskave tudi potrdili, saj smo en sev izolirali iz sena v Sloveniji. Zanimivo je, da nobenega seva omenjene vrste nismo izolirali iz notranjosti bivalnih prostorih, saj se po navajanju Zalar in sodelavcev (2005) tam pojavlja zelo pogosto (znani so štiri izolati iz Velike Britanije), se pa pojavlja v zraku, saj so en sev izolirali iz zraka v ladijskem zabojniku za transport banan. Vrsta naseljuje tudi nekatere zanimive substrate kot so površine rastlinskih organov (hrastov list iz Belgije), mineralno vodo iz Francije in kožne lezije pri človeku na Nizozemskem. Vrsta je ubikvitarna, saj so izolati znani iz Evrope, Azije, Afrike in Amerike. Naravno ekološko nišo vrste *W. sebi* je zaradi raznolikih substratov, iz katerih smo jo izolirali, težko določiti. V nasprotju z znanim dejstvom, vrsta

ne naseljuje hrane, zato sklepamo, da se tam, podobno kot na drugih substratih, pojavlja sekundarno. Primarno ekološko nišo verjetno predstavljajo soline in druga izjemno slana okolja, kljub temu da vrsta ni halofilna (Zalar in sodelavci, 2005). Vrsta *W. sebi* se pogosto pojavlja v izjemno slani vodi solin, kjer se v večjih koncentracijah pojavlja tudi $MgCl_2$. Ugotovili smo, da vrsta tolerira razmeroma visoke koncentracije $MgCl_2$. Vsi testirani sevi so dobro rasli na gojišču z dodatkom 1,5 M $MgCl_2$, na gojišču z 1,7 M $MgCl_2$ so rasli štirje izmed devetih testiranih sevov, medtem ko smo rast treh, v obliki posameznih kolonij, zaznali tudi v tekočem gojišču z dodatkom 2 M $MgCl_2$. Predvidevamo, da so se posamezni kloni tekom inkubacije prilagodili na povišane koncentracije $MgCl_2$ v gojišču.

V skupino *Wallemia* aff. *sebi* smo uvrstili seve EXF-5677, EXF-6154, EXF-5918, EXF-5922, EXF-6158, EXF-277, EXF-5828 ter seve EXF-6156, EXF-5829 in EXF-6150, ki so znotraj skupine združeni v filogenetsko ločeno podskupino. V to skupino uvrščamo tudi seve EXF-622, EXF-757, EXF-1281, EXF-1277, EXF-1279, MZKI B-384, MZKI B-451, CBS 213.34 in CBS 633.66, ki so jih Zalar in sodelavci (2005) identificirali kot vrsto *W. sebi*. Predstavniki skupine *Wallemia* aff. *sebi* so genotipsko in fenotipsko sorodni vrsti *W. sebi*, kar se odraža tudi v fiziologiji in ekologiji, saj rastejo na gojišču brez dodanih topljencev, hkrati pa tolerirajo podobne koncentracije $MgCl_2$ in $MgSO_4$ v gojišču. Tako kot vrsta *W. sebi*, tudi predstavniki skupine *Wallemia* aff. *sebi* naseljujejo izjemno slano vodo solin v Španiji in Dominikanski republiki. Naseljujejo sladko hrano, predvsem čokolado v Sloveniji, javorjev sirup v Kanadi ter po navajanju Zalar in sodelavcev (2005) tudi torte in med. Naseljujejo tudi slano (sušene in soljene ribe v Indoneziji) in suho hrano (bel kruh iz Velike Britanije in suha kokosova pulpa iz Braziliije). Izmed drugih suhih substratov predstavniki skupine *Wallemia* aff. *sebi* naseljujejo neznano seme iz Madžarske in slamnat klobuk iz Filipinov. Naseljujejo tudi zrak okoli čebelnjaka in notranjost bivalnih prostorov in mrtvo kobilico v Sloveniji ter površino neznane rastline na Kubi. Zaradi raznolike geografske razširjenosti je tako kot vrsta *W. sebi* tudi skupina *Wallemia* aff. *sebi* ubikvitarna.

V skupino *Wallemia* aff. *muriae* smo uvrstili 8 sevov (EXF-6149, EXF-6151, EXF-3675, EXF-6152, EXF-6153, EXF-6157, EXF-5830, EXF-1443), ki so na podlagi nukleotidnega zaporedja ITS rDNA bolj podobni vrsti *W. muriae*, na podlagi fenotipskih lastnosti pa vrsti

W. sebi. V to skupino uvrščamo tudi seve EXF-1265, EXF-1274, EXF-483, ki so jih Zalar in sodelavci (2005) identificirali kot vrsto *W. sebi*. Predstavniki skupine, enako kot vrsta *W. sebi*, rastejo na gojišču brez dodanih topljencev, hkrati pa tolerirajo podobne koncentracije $MgCl_2$ in $MgSO_4$ v gojišču. Se pa sorodnost skupine *Wallemia* aff. *muriae* z vrsto *W. muriae* izraža v ekologiji, saj predstavniki, tako kot vrsta *W. muriae*, naseljujejo sladko hrano (čokolada, pokvarjena marmelada) in površine rastlin (*Clusia rosea*, *Clusia relumbifolia*, *Verbena officinalis*), poleg tega pa še tla v (šota, prst). V to skupino sodijo tudi izolati iz izjemno slane vode solin (Španija), silaže (Velika Britanija), arašidov (Indonezija) (Zalar, 2005) ter nekultivirana kloni iz vode Južnokitajskega morja (Li, 2010) in korenine riža (Yuan, 2010) iz Kitajske. Skupina *Wallemia* aff. *muriae* je ubikvitarna, saj so izolati znani iz Evrope, Amerike in Azije.

Znotraj vrste *W. muriae* se pojavljata dve monofiletski skupini. V prvo smo uvrstili seve EXF-5678, EXF-5679, EXF-5680, EXF-5681, EXF-5682, EXF-5684, EXF-5685, EXF-5686, EXF-5673, EXF-5919 in EXF-5917, v drugo skupino, kamor uvrščamo tudi tipski sev vrste *W. muriae* EXF-951 (=CBS 116622, =MZKI B-952), pa EXF-5916, EXF-5751, EXF-3261, EXF-5914, EXF-2363, EXF-5750, EXF-4967, EXF-5921, EXF-2362, EXF-4957, EXF-5915 in EXF-3554. *W. muriae* se pogosto pojavlja v ozmotsko stresnih okoljih, saj smo z izolacijami pridobili 18 sevov, kar pomeni, da je glede na našo raziskavo najpogostejša vrsta rodu *Wallemia*. Optimalno raste v okolju z vodno aktivnostjo od 0.96 do 0.83 (Zalar in sod., 2005), kar pomeni da je iz fiziološkega stališča tipičen kserofil, zato smo jo izolirali iz različnih substratov z znižano vodno aktivnostjo. Vrsta *W. muriae* naseljuje izjemno slana okolja, saj smo jo tekom raziskave izolirali iz izjemno slane vode (Izrael) in mulja v solinah ter iz površine halofitov pridobljenih iz solin v Sloveniji, medtem ko Zalar in sod. (2005) navajajo, da naseljuje tudi slano hrano (arašidi, slano maslo). Naseljuje tudi sladko hrano, največkrat čokolado in nasičeno sladkorno raztopino v Sloveniji. Zalar in sodelavci (2005) navajajo, da se pojavlja tudi na razpadajoči datljih v Tuniziji ter na tortah, medu in sladkornih palmah, ampak iz tovrstnih substratov vrste *W. muriae* tekom raziskave nismo izolirali. Naseljuje suhe substrate, kot so slama, semena in žita (Zalar in sod., 2005), notranjost bivalnih prostorov (kuhinja, otroška soba, dnevna soba, spalnica) ter cvetni prah, ki do te raziskave še ni bil opisan kot substrat za katero koli izmed vrst rodu *Wallemia*.

Kot smo ugotovili pri taksonomski analizi, se izolati vrste *W. muriae* glede na molekularno-genetske lastnosti ITS rDNA nukleotidnega zaporedja (Slika 3) ločijo v dve skupini, ki se deloma izražata tudi v ekologiji. V prvo skupino sodijo sevi izolirani iz površine halofitov, cvetnega prahu in notranjosti bivalnih prostorov. Sklepamo, da je skupna točka cvetni prah, ki ga veter in žuželke, na katerih se vrsta *W. muriae* tudi pojavlja (Zalar in sod., 2005), prenašajo od rastlin do bivalnih prostorov. V drugo skupino sodijo sevi izolirani iz solin, sladke in suhe hrane ter notranjosti bivalnih prostorov.

Kljub pestremu izboru opisanih substratov, ki jih vrsta *W. muriae* naseljuje, sklepamo, da so naravna ekološka niša omenjene vrste soline. Tekom raziskave smo iz solin (Slovenija) izolirali devet sevov, od tega enega iz mulja, ostalih osem pa iz halofitov, ki rastejo na bregu kristalizacijskih bazenov. Sevi omenjene vrste so bili izolirani tudi iz solin v drugih državah (Izrael, Dominikanska republika). Poleg omenjenih, Zalar in sodelavci (2005) v viru obravnavajo tudi izolate iz Francije, Danske, Tunizije in Dominikanske Republike, zato sklepamo, da je vrsta *W. muriae* ubikvitarna.

Ugotovili smo, da vrsta *W. muriae*, kljub številnim izolatom pridobljenih iz solin, ne tolerira visokih koncentracij $MgCl_2$ v gojišču. Medtem ko je na gojišču z 1 M $MgCl_2$ rasla dobro v obliki kompaktnega micelija, smo na gojišču z 1,2 M in 1,3 M $MgCl_2$ zaznali inhibicijo rasti vseh testiranih sevov, kar sovпада z navajanjem Hallsworth (2007), da 1,26 M $MgCl_2$ v gojišču popolnoma inhibira rast mikroorganizmov. Na gojišču z 1,5 M $MgCl_2$ smo zaznali šibko rast le še pri dveh od šestih testiranih sevov. Vrsta *W. muriae* pa na drugi strani tolerira izjemno visoke koncentracije $MgSO_4$ v gojišču, saj smo optimalno rast zaznali na gojišču z 2 M $MgSO_4$, dobro je rasla tudi še na gojišču z 3,5 M $MgSO_4$, medtem ko smo na gojišču z 4 M $MgSO_4$ zaznali šibko rast le enega testiranega seva. $MgSO_4$ je tako kot NaCl in saharoza topljenec s kozmotrofnim učinkom (Hamaguchi, 1962), zato sklepamo, da je vrsta *W. muriae* kozmofilna vrsta.

Tekom raziskave smo ugotovili, da vrsta *W. muriae* naseljuje samo sladko hrano, čeprav smo na podlagi dosedanjih izolatov sklepali, da naseljuje tudi slano in suho hrano (Zalar in sod. 2005). Štiri seve smo izolirali iz čokolade (EXF-2361, EXF-2362, EXF-2363, EXF-

5921 (Slika 8-D, 8-E)), enega pa iz nasičene raztopine sladkorja (EXF-3554). Zalar in sodelavci (2005) so opisali tudi sev CBS 184.28 izoliran iz sladkorja pridobljenega iz sladkorne palme, zato sklepamo da je s sladkanjem možna kontaminacija hrane.

Wallemia ichthyophaga je najredkejša vrsta rodu *Wallemia*, saj smo pridobili le 6 novih izolatov iz izjemno slane vode solin (EXF-6065, EXF-6067, EXF-6068, EXF-6070), kristalov soli (EXF-5676) in slanah suhomesnih izdelkov (EXF-3555). Tudi Zalar in sod. (2005), ki so prvi opisali vrsto, so v raziskavo vključili le 3 seve, ki so bili prav tako izolirani iz hiperslane vode solin (EXF-994 (=CBS 113033), EXF-759 (=CBS 116630)) in slanah suhomesnatih izdelkov – pršuta (EXF-1059 (=CBS 116629)). Glede na njeno ekstremno halofilno naravo, izolacije in dosedanje objave sklepamo, da so primarna ekološka niša vrste *W. ichthyophaga* soline. Kljub temu, da so soline umetno ustvarjeno okolje, so izpostavljene okoljskim dejavnikom, zato lahko predstavljajo habitat različnim vrstam.

Vrsta je verjetno ubikvitarna, kljub temu da smo vse izolate, ki so vključeni v raziskavo, pridobili iz Slovenije. Zalar in sodelavci (2005) navajajo, da je le en od do sedaj opisanih izolatov iz Afrike (Namibija), vsi ostali so iz Slovenije. Majhna količina izolatov iz različnih delov sveta je verjetno posledica halofilne narave vrste, zato se le-ta redkeje pojavlja, hkrati pa so za izolacijo potrebna slana gojišča (10% NaCl v gojišču).

Izolati, ki smo jih pridobili iz slanah suhomesnatih izdelkov, so verjetno tja prišli posredno preko kristalov soli, na katerih smo potrdili rast (Slika 8-F), kar potrjuje hipotezo o možni kontaminaciji hrane s soljenjem. Slani suhomesnati izdelki so ugoden habitat za rast tovrstnih gliv, saj sol zniža vodno aktivnost, meso pa zagotavlja hranila za rast. To smo tekom raziskave tudi potrdili, saj smo vrsto *W. ichthyophaga* inokulirali na kose pršuta, kjer je zelo dobro rasla (Slika A), hkrati pa tudi Frank in Hess (1941) navajata, da so glive iz rodu *Wallemia* glavni povzročitelj kvarjenja soljenih rib. Iz proteinskih pasti (pršut, ribe), ki smo jih nastavili v hiperslano vodo Sečoveljskih solin, nismo izolirali gliv iz rodu *Wallemia*.

Seve EXF-6065, EXF-6067, EXF-6068 in EXF-6070 smo izolirali iz vode, ki ostane v kristalizacijskih bazenih po kristalizaciji NaCl. Ta voda (grenčica, slanica) je bogata z nutrienti in predstavlja posebno ekološko nišo znotraj solin, kjer rastejo le organizmi, ki tolerirajo ekstremno visoke koncentracije Mg^{2+} (Grant, 2004). Tekom raziskave smo ugotovili, da je najvišja koncentracija $MgCl_2$ v gojišču, na katerem posamezni sevi vrste *W. ichthyophaga* še rastejo, 2 M. Vrsta torej tolerira izjemno visoke koncentracije $MgCl_2$ v gojišču, saj je zgornja koncentracija $MgCl_2$, ki še omogoča življenje, 2,3 M (Hallsworth, 2007). Zanimivo je, da je na gojišču z 2 M $MgCl_2$ raslo pet od devetih testiranih sevov, vendar je bil samo eden izmed teh (EXF-6065) izoliran iz grenčice. Najvišja koncentracija $MgCl_2$ v gojišču ostalih štirih testiranih sevov je bila 1,9 M. Sklepamo, da je *W. ichthyophaga*, tako kot nekateri sevi glive *Xeromyces bisporus* (Williams in Hallsworth, 2009) kaofilna vrsta, saj boljše raste pri višjih koncentracijah $MgCl_2$ v gojišču, hkrati pa zelo slabo raste pod kozmotropnimi pogoji ($MgSO_4$). Vsi sevi vrste *W. ichthyophaga*, za razliko od ostalih dveh vrst znotraj rodu, tolerirajo nižjo koncentracijo $MgSO_4$ v gojišču, saj smo šibko rast zaznali na gojiščih z 2 in 2,5 M $MgSO_4$.

Dodatno novo vrsto predstavljata halotolerantna izolata EXF-5748 in EXF-5753, poimenovana kot *Wallemia* sp., ki se na osnovi molekularno-genetskih lastnosti zelo razlikujeta od znanih vrst znotraj rodu *Wallemia*. Nukleotidno zaporedje ITS rDNA obeh je najbolj podobno zaporedju tipskega seva vrste *W. ichthyophaga*. Nukleotidno zaporedje seva EXF-5748 (izoliran iz ječmena, Slovenija) je bolj podobno zaporedju tipskega seva vrste *W. sebi*, zato verjetno omenjeni sev predstavlja vezni člen med vrstama *W. sebi* in *W. ichthyophaga*. Nukleotidno zaporedje se najbolj ujema z zaporedji nekultiviranih klonov izoliranih iz morskih sedimentov Indijskega oceana (Singh in sod., 2011). Nukleotidno zaporedje seva EXF-5753 (izoliran iz cvetnega prahu bršljanovih cvetov, Slovenija) je bolj podobno zaporedju tipskega seva vrste *W. muriae*, zato verjetno omenjeni sev predstavlja vezni člen med vrstama *W. muriae* in *W. ichthyophaga*. Zanimivo je, da oba seva, kljub temu da sta bolj sorodna vrsti *W. ichthyophaga*, ki za rast potrebuje znižano vodno aktivnost v gojišču (Zalar in sod., 2005), rasteta enako kot vrsta *W. sebi*, tako na gojišču MEA brez kot tudi na gojišču MEA z dodatkom NaCl.

5.2 SKLEPI

Z izolacijami iz ozmotsko stresnih okolij smo potrdili, da so glive rodu *Wallemia* iz ekofiziološkega stališča tipični kserofili, saj smo predstavnike izolirali tako iz izjemno slanega okolja solin, iz sladke, suhe in slane hrane ter iz drugih suhih okolij.

Wallemia je ubikvitaren rod, saj se predstavniki pojavljajo na različnih geografskih območjih (Evropa, Azija, Afrika ter Južna, Srednja in Severna Amerika).

Na podlagi nukleotidnega zaporedja ITS rDNA smo izolate identificirali do treh že opisanih vrst: *W. sebi*, *W. muriae* in *W. ichthyophaga*. 20 sevov nismo mogli uvrstiti med opisane vrste, zato smo jih poimenovali *Wallemia* aff. *sebi*, *Wallemia* aff. *muriae* in *Wallemia* sp.

Predstavniki skupine *Wallemia* aff. *sebi* so genotipsko in fenotipsko podobni vrsti *W. sebi*, medtem ko so predstavniki skupine *Wallemia* aff. *muriae* genotipsko bolj podobni vrsti *W. muriae*, fenotipsko pa vrsti *W. sebi*.

Predstavnika nove vrste, poimeovane z *Wallemia* sp., se na podlagi nukleotidnega zaporedja ITS rDNA močno razlikujeta od znanih vrst in predstavljata vezni člen med vrstama *W. sebi* in *W. muriae* na eni in vrsto *W. ichthyophaga* na drugi strani.

Encimski in asimilacijski profili se med vrstami bistveno na razlikuje. Vrsti *W. sebi* in *W. muriae* lahko od vrste *W. ichthyophaga* ločimo na podlagi prisotnosti nekaterih encimov (fosfoamidaza, α - in β -galaktozidaza, α - in β -glukozidaza ter *N*-Acetil- β -glukozamidaza).

Na podlagi tolerance na $MgCl_2$ in $MgSO_4$ lahko ločimo vrsti *W. sebi* in *W. muriae* od vrste *W. ichthyophaga*. Slednja, za razliko od ostalih, tolerira visoke koncentracije $MgCl_2$ in nizke $MgSO_4$ v gojišču.

Z uporabo izolacijskih gojišč z dodatkom 1,7 M $MgCl_2$ ali 1 M NaCl, 1 M $MgCl_2$ in 1 M $MgSO_4$ bi lahko selektivno izolirali vrsto *W. ichthyophaga*.

Ekološko se le vrsta *W. ichthyophaga* razlikuje od ostalih, saj zaradi halofilne narave naseljuje izključno izjemno slana okolja, hkrati pa tolerira visoke koncentracije $MgCl_2$, zato sklepamo, da je kaofilna.

Vrsti *W. sebi*, *W. muriae* in predstavniki skupin *Wallemia* aff. *sebi* in *Wallemia* aff. *muriae* so si ekološko podobni, saj naseljujejo izjemno slana okolja, slano, sladko in suho hrano, tla, zrak, površine rastlin ter druge suhe substrate.

Soline so kot umetno ustvarjeno in okoljskim faktorjem izpostavljeno okolje, najbolj verjeten habitat za vse vrste rodu *Wallemia*.

Predstavniki rodu *Wallemia* redko poseljujejo hrano, kjer se lahko pojavljajo zaradi kontaminacije s soljenjem in sladkanjem.

6 POVZETEK

Wallemia je kozmopolitski rod kserofilnih gliv, ki naseljuje ozmotsko stresna okolja. Vrste iz rodu so pomembni kontaminanti suhe ter s sladkorjem in s soljo konzervirane hrane, hkrati pa tudi patogene, zato je poznavanje fiziologije in ekologije za človeka tako pomembno. Na podlagi fizioloških, morfoloških in molekularno-genetskih lastnosti rod zaenkrat vključuje tri vrste: *W. sebi*, *W. muriae* in *W. ichthyophaga*. Slednja velja za najbolj halofilni evkariontski organizem opisan doslej in je zato dober model za študije adaptacij na izjemno slana okolja.

V diplomskem delu smo testirali ozmotsko stresna okolja z namenom izolacije gliv rodu *Wallemia*. Testirali smo tako izjemno slana okolja (soline, slana jezera, slana hrana) kot tudi sladko, slano in suho hrane ter druge suhe substrate (zrak, površina rastlin, cvetni prah, puščavski pesek, seno). Pridobili smo 65 novih izolatov, ki smo jih na podlagi molekularno-genetskih lastnosti ITS rDNA regije in rasti na MEA oziroma MEA z dodatkom 10 % NaCl identificirali do treh že opisanih vrst: *W. sebi*, *W. muriae* in *W. ichthyophaga*. Nekaterih izolatov nismo mogli uvrstiti med opisane taksone, zato smo jih poimenovali *Wallemia* aff. *sebi*, *Wallemia* aff. *muriae* in *Wallemia* sp. Predstavniki skupine *Wallemia* aff. *sebi* so na podlagi molekularno-genetskih lastnosti ITS rDNA regije sorodni vrsti *W. sebi*, medtem ko so predstavniki skupine *Wallemia* aff. *muriae* sorodni vrsti *W. muriae*. Kljub molekularno-genetskim razlikam so predstavniki obeh skupin bolj podobni vrsti *W. sebi*. Predstavnik *Wallemia* sp., ki smo ju izolirali iz ječmena in bršljana v Sloveniji, se na podlagi molekularno-genetskih lastnosti zelo razlikujeta od znanih vrst rodu *Wallemia*, zato predstavljata novo vrsto in vezni člen med vrstama *W. sebi* in *W. muriae* na eni in vrsto *W. ichthyophaga* na drugi strani.

Fiziološko in morfološko so si vrste rodu *Wallemia* med seboj izjemno podobne, zato smo iskali dodatne fenotipske lastnosti, na podlagi katerih bi jih ločevali. Izvedli smo encimske in asimilacijske teste ter testirali toleranco na različne soli. Encimski in asimilacijski profili se med vrstami bistveno razlikujejo. Vrste lahko ločimo na podlagi prisotnosti nekaterih encimov (fosfoamidaza, α - in β -galaktozidaza, α - in β -glukozidaza ter *N*-Acetil- β -

glukozamidaza). Toleranca na različne soli, predvsem $MgCl_2$ in $MgSO_4$, je fenotipska lastnost, s katero lahko ločimo med posameznimi vrstami rodu *Wallemia*. Najvišja koncentracija $MgCl_2$, pri kateri sevi še aktivno rastejo, je 1,7 M za vrsto *W. sebi*, 1,5 M za vrsto *W. muriae* ter 2,0 M za vrsto *W. ichthyophaga*, medtem ko je najvišja koncentracija $MgSO_4$, pri kateri sevi še aktivno rastejo, 2,5 M za vrsto *W. ichthyophaga* ter 3,5 M za vrsti *W. muriae* in *W. sebi*. Na gojišču z dodatkom 1 M NaCl, 1 M $MgCl_2$ in 1 M $MgSO_4$ najboljše raste vrsta *W. ichthyophaga*, dobro raste tudi vrsta *W. sebi*, medtem ko vrsta *W. muriae* raste zelo slabo.

Vrsta *W. sebi* in predstavniki skupin *Wallemia* aff. *sebi* in *Wallemia* aff. *muriae* zaradi kserotolerantne narave poseljujejo vsa okolja z bolj ali manj znižano vodno aktivnostjo. Naseljujejo tako izjemno slana okolja kot tudi sladko, slano in suho hrano ter vse druge suhe substrate (zrak, tla, površine rastlin, seno). *W. muriae* je glede na našo raziskavo najpogostejša vrsta rodu *Wallemia*, naseljuje pa tako izjemno slana okolja kot tudi sladko hrano, največkrat čokolado. Naseljuje suhe substrate, kot so slama, semena in žita, notranjost bivalnih prostorov ter cvetni prah, ki do te raziskave še ni bil opisan kot substrat za katero koli izmed vrst rodu *Wallemia*. *W. ichthyophaga* je najredkejša vrsta rodu *Wallemia*, naseljuje pa samo izjemno slane habitate, kot je na primer izjemno slana voda iz solin, kristale soli in slane suhomesne izdelke. Ugotovili smo, da vrsta tolerira izjemno visoke koncentracije kaotropnega topljenca $MgCl_2$ v gojišču, hkrati pa zelo nizke koncentracije kozmotropnega topljenca $MgSO_4$, zato sklepamo da je vrsta kaofilna. Za razliko od vrste *W. ichthyophaga* je vrsta *W. muriae* kozmofilna vrsta, saj tolerira izjemno visoke koncentracije kozmofilnih topljencev v gojišču, medtem ko že nizke koncentracije kozmofilnih topljencev inhibirajo rast.

Wallemia je kozmopolitski oziroma ubikvitaren rod, najverjetnejši habitat vseh predstavnikov pa so verjetno soline. Pojavljanje na drugih substratih je sekundarno, predvsem pri hrani smo potrdili možnost kontaminacije s soljenjem in sladkanjem. Proti pričakovanju je pojavljanje gliv rodu *Wallemia* na hrani zelo redko. Ugotovili smo, da se predstavniki rodu *Wallemia* pojavljajo tudi na cvetnem prahu, ki se z vetrom in s čebelami širi na različne substrate. Cvetni prah je vektor oziroma prenašalec spor gliv rodu *Wallemia*.

7 VIRI

- Archer, S. D., Widdicombe, C. E., Tarran, G. A., Rees, A. P., Buskhill, P. H. 2001. Production and turnover of particulate dimethylsulphoniopropionate during a coccolithophore bloom in the Northern North Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 24, 225–241.
- Beuchat, L. R., Pitt, J. I. 2001. Detection and enumeration of heat resistant molds. In *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, eds F. P. Downes and K. Ito. 217-222.
- Blomberg, A., Adler, L. 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. *Advances in Microbial Physiology* 33, 145-212.
- Brewer, M. S. 1999. Traditional preservatives-sodium chloride. In *Encyclopaedia of food microbiology* 3,1723–1728.
- Brown, A. D. 1990. *Microbial water stress physiology*. Wiley, Chicester, New York.
- Chamberlin, J. W., Chaney, M. O., Chen, S., Demarco, P. V., Jones, N. D., Occolowitz, J. L. 1974. Structure of antibiotic A 25822 B, a novel nitrogen-containing C28-sterol with antifungal properties. *The Journal of Antibiotics* 27, 992-993.
- Eriksen, J. P. & McKenna, D. N. 1999 *Zygosaccharomyces*. In *Encyclopaedia of food microbiology* 3:2359–2365.
- Frank, M., Hess, E. 1941. Studies on salt fish. V. Studies on *Sporendonema epizoum* from »dun« salt fisk. *J. Fish. Res. Board Can.* 5: 276-286.

- Frank, M., Kingston, E., Jeffery, J. C., Moss, M.O., Murray, M., Simpson, T. J., Sutherland, A. 1999. Walleminol and walleminone, novel caryophyllenes from the toxigenic fungus *Wallemia sebi*. *Tetrahedron Letters* 40, 133-136.
- Galinski, E. A. 1995. Osmoadaptation in bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 37, 272-328.
- Galinski, E. A., Trüper, H. G. 1994. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 15, 95-108.
- Grant, W. D. 2004. Life at low water activity. *Philosophical Transactions of Royal Society B* 359, 1249-1267.
- Guarro, J., Gugnani, H.C., Sood, N., Batra, R., Mayayo, E., Gene, J., Kakkar, S. 2008. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Wallemia sebi* in an immunocompetent host. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 1129-1131.
- Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A. 2006. Ecology and molecular adaptations of the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Reviews in environmental science and biotechnology* 5, 323-331.
- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., de Hoog, S., Plemenitaš, A. 2000. Hypersaline waters in salterns - natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology* 32, 235-240.
- Hallsworth, J. E., Yakimov, M. M., Golyshin, P. N., Gillion, J. L. M., D'Auria, G., De Lima Alves F., La Cono, V., Genovese, M., McKew, B. A., Hayes, S. L., Harris, G., Giuliano, L., Timmis, K. N., McGenity T. J. 2007. Limits of life in MgCl₂-containing environments: chaotropicity defines the window. *Environmental Microbiology* 9 (3), 801-813.

- Hohmann, S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 300-372.
- Horowitz, N. H. 1978. Biological water requirements. V: *Strategies of microbial life in extreme environments: report of the Dahlem workshop on strategy of life in extreme environments*. Ur.: Shilo, M. Verlag Chemie, Berlin, str. 15-27.
- Houtsma, P. C., DeWit, J. C., Rombouts, F. M. 1996. Minimum inhibitory concentration of sodium lactate and sodium chloride for spoilage organisms at different pH values and temperatures. *J. Food Protect.* 59, 1300–1304.
- Hutchinson, G. E. 1959. Homage to Santa Rosalia, or why are there so many kinds of animals? *Am. Naturalist* 93, 245-249.
- Kapteyn, J. C., Van den Ende, H., Klis, F. M. 1999. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochimica et Biophysica Acta* 1426, 373-383.
- Kogej, T., Stein, M., Volkmann, M., Gorbushina, A.A., Galinski, E.A., Gunde-Cimerman, N. 2007. Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization. *Microbiology* 153, 4261-4273.
- Kralj Kunčič, M., Kogej, T., Drobne, D., Gunde-Cimerman, N. 2010. Morphological response of the halophilic fungal genus *Wallemia* to high salinity. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (1), 329-337.
- Lappalainen S., Pasanen A. L., Reiman M., Kalliokoski P. 1998. Serum IgG antibodies against *Wallemia sebi* and *Fusarium* species in Finnish farmers. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 81. 6: 589-582

- Larsson, C., Morales, C., Gustafsson, L., Adler, L. 1990. Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. *Journal of Bacteriology* 172, 1769-1774.
- Li, N. 2010. Molecular diversity study on South China Sea cruise samples revealed the hidden species distribution based on the universal primers methods. Neobjavljeno.
- Lukaszuk C., Krajewska-Kułak E., Niczyporuk W., Theodosopoulou E., Hatzopulu a., Krawczuk-Rybak M., Wojtukiewicz M. 2005. Variations of enzymatic activity and biotypes of the yeast like fungi strains isolated from cancer patients. *Annales Academiae Medicae Bialostocensis*. 50, 16-19.
- Mager, W. H., Siderius, M. 2002. Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Research* 2, 251-257.
- Matheny, P. B., Gossmann, J. A., Zalar, P., Kumar, T. K. A., Hibbett, D. S. 2006. Resolving the phylogenetic position of the *Wallemiomycetes*: an enigmatic major lineage of Basidiomycota. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 84, 1794-1805.
- Mevarech, M., Frolov, F., Gross, I. M. 2000. Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Biophys. Chem.* 86, 155–164.
- McMeekin, T. A., Hill, C., Wagner, M., Dahl, A., Ross, T. 2010 Ecophysiology of food-borne pathogens: Essential knowledge to improve food safety. *International journal of food microbiology* 139, 64-78.
- Moore, R. T. 1986. A note on *Wallemia sebi*. *Antonie van Leeuwenhoek* 52, 183-187.
- Oren, A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 334-348.

- Oren, A. 2002. Halophilic microorganisms and their environments. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Patriarca, A., Vaamonde, G., Fernandez Pinto, V., Comerio, R. 2001. Influence of water activity and temperature on the growth of *Wallemia sebi*: application of a predictive model. *International Journal of Food Microbiology* 68, 61-67.
- Petrovič, U., Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A. 1999. Salt stress affects sterol biosynthesis in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *FEMS Microbiology Letters* 180, 325-330.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. 1977. Influence of solute and hydrogen-ion concentration on water relations of some xerophilic fungi. *Journal of General Microbiology* 101, 35-40.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. 1999. *Fungi and fungi spoilage*, 2nd ed. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. 2009. *Fungi and food spoilage*. London, Blackie Academic & Professional.
- Raspor, P. 1996. *Biotehnologija, Osnovna znanja*. BIA d.o.o., Ljubljana.
- Reboux G., Piarroux R., Mauny F., Madroszyk A., Millon L., Bardonnnet K. and Dalphin J. C. 2001. Role of Molds in Farmer's Lung Disease in Eastern France. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 163, 1534-1539.
- Russell, N. J. 1989. Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 21, 93-113.

- Saito, M., Ohtsubo, K., Umeda, M., Enomoto, M., Kurata, H., Udagawa, S., Sakabe, F., Ichinoe, M. 1971. Screening tests using HeLa cells and mice for detection of mycotoxin-producing fungi isolated from foodstuffs. *Japanese Journal of Experimental Medicine* 41, 1-20.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C., Filtenborg, O. 2002. Introduction to food- and airborne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Nizozemska.
- Siegel, B. Z., McMurty, G., Siegel, S. M., Chen, J., Larock, P. 1979. Life in the calcium chloride environment of Don Juan Pond, Antarctica. *Nature* 280, 828-829.
- Singh P., Raghukumar C., Verma P. and Shouche Y., 2011. Fungal community analysis in the deep-sea sediments of the central Indian basin by culture-independent approach. *Microb. Ecol.* 61 (3), 507-517
- Slaninova, I., Šestak, S., Svoboda, A., Farkaš, V. 2000. Cell wall and cytoskeleton reorganization as the response to hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives in Microbiology* 173, 245-252.
- Snowdon, J. A., Cliver, D. O. 1996. Microorganisms in honey. *Int. J. Food Microbiology* 31, 1-26.
- Blomberg, A., Adler, L. 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. *Advances in Microbial Physiology* 33, 145-212.
- Takahashi, T. 1997. Airborne fungal colony-forming units in outdoor and indoor environments in Yokohama, Japan. *Mycopathologia* 139, 23-33.
- Thomas, T. and Cavicchioli, R. 2000. Effect of temperature on the stability and activity of the elongation factor 2 proteins from low-temperature adapted and thermophilic methanogens. *J. Bacteriol.* 182, 1328-1332.

- Tokuoka, K. 1993. A review: sugar and salt-tolerant yeasts. *J. Appl. Microbiology* 74, 101–110.
- Turk, M., Mejanelle, L., Šentjurs, M., Grimalt, J. O., Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A. 2004. Salt-induced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeast-like melanized fungi. *Extremophiles* 8, 53-61.
- Twining, S. S. 1984. Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. *Analytical Biochemistry* 143 (1), 30-34.
- Vaupotič, T., Plemenitaš, A. 2007. Differential gene expression and Hog1 interaction with osmoresponsive genes in the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. *BMC Genomics* 8, 280.
- Vreeland, R. H., Rosenweig, W. D., Powers, D. W. 2000 Isolation of a 250 million year old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature* 407, 897–899.
- Wang, Z., Zheng, L., Hauser, M., Becker, J. M., Szaniszlo, P. J. 1999. WdChs4p, a homolog of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*, alone cannot support growth of *Wangiella* (*Exophiala*) *dermatitidis* at the temperature of infection. *Infection and Immunity* 67, 6619-6630.
- Wiggins, P. M. 1990. Role of water in some biological processes. *Microbiol. Rev.* 54, 432–449.
- Williams J. P., Hallsworth J. E. 2009. Limits of life in hostile environments: No limits to biosphere function? *Environmental Microbiology* 11, 3292–3308
- Wood, G. M., Mann, P. J., Lewis, D. F., Reid, W. J., Moss, M. O. 1990. Studies on a toxic metabolite from the mold *Wallemia*. *Food Additives and Contaminants* 7, 69-77.

- Wyckoff, H. W. 1987. Structure of *Escherichia coli* alkaline phosphatase determined by X-ray diffraction. In: Torriani-Gorini, Rothman, Silver, Wright and Yagil, Phosphatase metabolism and Cellular Regulation in Microorganisms. America Society for Microbiology, Washington, DC.
- Yuan, Z. L., Zhang, C. L., Lin, F. C., Kubicek, C. P. 2010. Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (*Oryza granulata*) from a nature reserve in Yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (5), 1642-1652.
- Zajc, J. 2009. Fiziološke prilagoditve kserofilnih gliv iz rodu *Wallemia* na rast pri slanih pogojih. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.
- Zajc, J., Zalar, P., Sepčič, K., Gunde-imerman, N. 2011. Xerophilic fungal genus *Wallemia* – bioactive inhabitants of marine solar salterns and salty food. *Proc. Nat. Sci, Matica srpska* 120, 7-18.
- Zalar, P., Sybren de Hoog, G., Schroers, H. J., Frank, J. M., Gunde-Cimerman, N. 2005. Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (*Wallemiomycetes* and *Wallemiales*, cl. et ord. nov.). *Antonie Van Leeuwenhoek* 87, 311-328.

ZAHVALA

Hvala mentorici prof. dr. Nini Gunde-Cimerman in somentorici doc. dr. Poloni Zalar za potrpežljivo usmerjanje skozi raziskovalno delo in za vse ponujene priložnosti. Hvala recenzentki prof. dr. Ani Plemenitaš za hiter pregled diplomske naloge. Hvala vsem ostalim sodelavcem iz Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov za pomoč in nasvete. Najlepša hvala domačim za vso podporo in za vse lepe trenutke doma, kamor se tako rad vračam. Hvala prijateljem in sošolcem za mnoge nepozabne trenutke. Hvala moji Tadeji za potrpežljivost med izdelavo diplomske naloge.

PRILOGA A1: ASIMILACIJA VIROV C in N SEVOV VRSTE *W. sebi* NA GOJIŠČU Z DODATKOM 17% NaCl.

	EXF- 585	EXF- 1263	EXF- 1261	EXF- 1264	EXF- 1265	EXF- 1266	EXF- 1268	EXF- 1274	EXF- 958
<i>Viri ogljika (C)</i>									
D-glukoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-galaktoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorboza	+	+	+	+	w	+	+	+	-
<i>N</i> -Acetil-glukozamin	+	+	+	+	+	+	w	+	w
D-riboza	w	w	w	w	w	-	-	-	-
D-ksiloza	+	+	+	+	+	-	+	-	+
L-arabinoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-ramnoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-saharaza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
maltoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-trehaloza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
fruktoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
celobioza	+	+	+	+	+	+	+	-	+
melibioza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
laktoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-rafinoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
melezitoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
topni škrob	-	-	-	-	-	-	-	-	-
glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mezo-eritrol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ribitol	w	w	w	w	w	w	w	w	w
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
galaktitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mio-inozitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glukonat	+	+	+	+	+	-	-	-	+
D-glukozamin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sukcinat	+	-	-	-	-	-	-	-	-
citrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-
metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
etanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
glukoronska kislina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Viri dušika (N)</i>									
nitrat (KNO ₃)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
nitrit (NaNO ₂)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glukozamin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-lizin	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ pomeni asimilacijo vira C in N; dobra rast v obliki kompaktnega micelija, kolonije so velike in dvignjene nad gojišče; w pomeni šibko asimilacijo vira C in N; šibka rast v obliki v obliki rahlega micelija, kolonije so majhne in svetle; - pomeni, da asimilacije in aktivne rasti ni.

PRILOGA A2: ASIMILACIJA VIROV C in N SEVOV VRSTE *W. sebi* NA GOJIŠČU BREZ DODATKA NaCl.

	EXF- 958	EXF- 992	EXF- 1442	EXF- 1441	EXF- 5675	EXF- 1443	EXF- 5746	EXF- 5747	EXF- 5752	EXF- 277
<i>Viri ogljika (C)</i>										
D-glukoza	+	+	+	-	+	+	-	+	w	+
D-galaktoza	w	-	w	-	w	w	-	w	-	w
L-sorboza	+	w	+	w	+	+	w	+	+	+
<i>N</i> -Acetil-glukozamin	+	w	w	w	w	+	-	+	w	w
D-riboza	w	w	w	w	w	+	-	+	+	w
D-ksiloza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinoza	+	+	+	-	w	w	-	+	w	w
D-arabinoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-ramnoza	w	w	w	-	w	w	-	w	-	w
D-saharoza	w	-	w	-	w	w	-	w	-	w
maltoza	w	-	w	-	w	w	-	w	-	w
D-trehaloza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
fruktoza	+	+	+	+	+	+	-	w	w	+
celobioza	w	w	w	-	w	w	-	w	-	w
melibioza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
laktoza	w	-	w	-	w	w	-	+	+	w
D-rafinoza	w	-	w	-	w	w	-	w	-	w
melezitoza	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
topni škrob	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
glicerol	+	-	+	w	+	+	-	+	-	+
mezo-eritrol	+	w	+	+	+	w	-	w	w	+
ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-manitol	w	+	w	-	+	+	-	w	-	w
galaktitol	w	-	w	-	w	w	-	w	-	w
mio-inozitol	w	w	w	w	w	w	-	w	-	+
inozitol	+	-	-	w	w	w	w	+	+	+
urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glukozamin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sukcinat	+	+	+	w	+	+	-	+	-	+
citrat	w	w	w	-	w	w	-	w	-	w
metanol	w	w	w	w	w	w	-	w	-	w
etanol	w	w	w	-	w	w	-	w	w	w
D-sorbitol	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Viri dušika (N)</i>										
nitrat (KNO ₃)	+	+	w	+	+	+	-	+	+	w
nitrit (NaNO ₂)	w	w	w	w	w	w	-	+	w	w
D-glukozamin	w	w	w	+	w	w	-	+	w	+
L-lizin	+	+	w	w	+	+	-	+	-	+

+ pomeni asimilacijo vira C in N; dobra rast v obliki kompaktnega micelija, kolonije so velike in dvignjene nad gojišče; w pomeni šibko asimilacijo vira C in N; šibka rast v obliki v obliki rahlega micelija, kolonije so majhne in svetle; - pomeni, da asimilacije in aktivne rasti ni; / pomeni, da rezultat manjka.

PRILOGA A3: ASIMILACIJA VIROV C in N SEVOV VRSTE *W. muriae* NA GOJIŠČU Z DODATKOM 17% NaCl.

	EXF- 951	EXF- 1054	EXF- 1269	EXF- 1272	EXF- 1275	EXF- 1285	EXF- 4957	EXF- 4967	EXF- 5673
<i>Viri ogljika (C)</i>									
D-glukoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-galaktoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorboza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>N</i> -Acetil-glukozamin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-riboza	w	w	w	w	w	w	w	w	w
D-ksiloza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-ramnoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-saharoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
maltoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-trehaloza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
fruktoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
celobioza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
melibioza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
laktoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-rafinoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
melezitoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
topni škrob	-	-	-	-	-	-	-	-	-
glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mezo-eritrol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ribitol	w	w	w	w	w	w	w	w	w
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
galaktitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mio-inozitol	+	+	+	+	+	+	+	+	-
urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glukonat	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-glukozamin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sukcinat	+	+	+	+	+	+	+	-	-
citrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-
metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
etanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
glukoronska kislina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Viri dušika (N)</i>									
nitrat (KNO ₃)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
nitrit (NaNO ₂)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glukozamin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-lizin	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ pomeni asimilacijo vira C in N; dobra rast v obliki kompaktnega micelija, kolonije so velike in dvignjene nad gojišče; w pomeni šibko asimilacijo vira C in N; šibka rast v obliki v obliki rahlega micelija, kolonije so majhne in svetle; - pomeni, da asimilacije in aktivne rasti ni.

PRILOGA A4: ASIMILACIJA VIROV C in N SEVOV VRSTE *W. ichthyophaga* NA GOJIŠČU Z DODATKOM 17% NaCl.

	EXF- 994	EXF- 1059	EXF- 5676	EXF- 759	EXF- 3555	EXF- 6065	EXF- 6067	EXF- 6068	EXF- 6070
<i>Viri ogljika (C)</i>									
D-glukoza	+	+	+	+	+	-	+	+	-
D-galaktoza	+	+	+	+	+	-	+	+	-
L-sorboza	+	+	+	+	+	-	+	-	w
<i>N</i> -Acetil-glukozamin	+	+	+	+	+	-	w	-	-
D-riboza	w	w	w	w	w	-	-	-	-
D-ksiloza	+	+	+	+	+	-	+	-	-
L-arabinoza	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-arabinoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-ramnoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-saharaza	+	+	+	+	+	-	+	-	-
maltoza	+	+	+	+	+	-	+	-	-
D-trehaloza	+	+	+	+	+	-	+	-	-
fruktoza	+	+	+	+	+	-	+	-	-
celobioza	+	+	+	+	+	-	+	+	-
melibioza	+	+	+	+	+	-	+	-	-
laktoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-rafinoza	+	+	+	+	+	-	+	-	-
melezitoza	+	+	+	+	+	-	+	-	-
topni škrob	-	-	-	-	-	-	-	-	-
glicerol	+	+	+	+	+	-	+	+	-
mezo-eritrol	+	+	+	+	+	-	+	-	-
ribitol	w	w	+	w	w	w	w	w	w
D-manitol	+	+	+	+	+	-	+	+	-
galaktitol	+	+	+	+	+	-	+	+	-
mio-inozitol	+	+	+	+	+	-	+	-	-
urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glukonat	+	+	+	+	+	+	-	-	-
D-glukozamin	-	+	-	-	-	-	-	-	-
sukcinat	+	+	+	-	+	-	-	-	-
citrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-
metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
etanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-sorbitol	+	+	+	+	+	-	+	-	-
glukoronska kislina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Viri dušika (N)</i>									
nitrat (KNO ₃)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
nitrit (NaNO ₂)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glukozamin	+	+	+	+	+	-	+	-	+
L-lizin	+	+	+	+	+	-	+	-	-

+ pomeni asimilacijo vira C in N; dobra rast v obliki rahlih skupkov, kolonije so velike in dvignjene nad gojišče; w pomeni šibko asimilacijo vira C in N; šibka rast v obliki v obliki rahlih skupkov, kolonije so majhne in svetle; - pomeni, da asimilacije in aktivne rasti ni.