

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Marko LUTAR

**PRIPRAVA VZORCEV HALOFILNIH NITASTIH
GLIV ZA VRSTIČNO ELEKTRONSKO
MIKROSKOPIJO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Marko LUTAR

**PRIPRAVA VZORCEV HALOFILNIH NITASTIH GLIV ZA
VRSTIČNO ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**SPECIMEN PREPARATION OF HALOPHILIC FILAMENTOUS
FUNGI FOR SCANNING ELECTRON MICROSCOPY**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biologijo mikroorganizmov in Katedri za fiziologijo živali Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Nino Gunde Cimerman in somentorja prof. dr. Kazimirja Drašlarja in za recenzentko prof. dr. Ano Plemenitaš.

Mentorica: prof. dr. Nina Gunde Cimerman
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Somentor: prof. dr. Kazimir Drašlar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Recenzentka: prof. dr. Ana Plemenitaš
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof.dr. Romana Marinšek Logar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Nina Gunde Cimerman
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Ana Plemenitaš
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Član: prof. dr. Kazimir Drašlar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Marko Lutar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.23 : 57.086.3 (043)=163.6
KG vrstična elektronska mikroskopija/VEM/metoda priprave vzorcev/sušenje pri kritični točki/rod *Cladosporium*
AV LUTAR, Marko
SA GUNDE CIMERMAN, Nina (mentorica)/DRAŠLAR, Kazimir (somentor)/PLEMENITAŠ, Ana (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2009
IN PRIPRAVA VZORCEV HALOFILNIH NITASTIH GLIV ZA VRSTIČNO ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 52 str., 5 pregl., 17 sl., 36 vir.
IJ sl
JI Sl/en
AI Halofilne nitaste glive so začeli proučevati šele v zadnjem desetletju. Eden od najštevilčnejših predstavnikov nitastih gliv v izjemno slani vodi solin je rod *Cladosporium*. Za identifikacijo do nivoja vrst je ključnega pomena razrast glive (razvejanje konidioforov) na površini agarnih gojišč, kot tudi struktura površine nespolnih razmnoževalnih struktur. Ustrezna metoda za pripravo vzorcev nitastih gliv, zrastlih na površini trdnih agarnih gojišč, za njihovo proučevanje pod vrstičnim elektronskim mikroskopom (VEM), doslej še ni bila uvedena na Oddelku za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Tovrstne metode so sicer poznane, vendar se razlikujejo glede na opazovan objekt. Od metod, ki smo jih uporabljali pri naših poskusih, se je za najbolj primerno izkazala metoda kemijska fiksacija s sušenjem pri kritični točki. Metodo smo prilagodili lastnostim naših vzorcev. Izdelali smo nosilce, ki so vzorce ščitili med pripravo. Vzorce smo fiksirali s fiksativi z nizko osmolarnostjo, dehidrirali in posušili pri kritični točki. Izdelali smo mikrografije, ki so v pomoč pri taksonomski analizi gliv rodu *Cladosporium*.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.23 : 57.086.3 (043)=163.6
CX scanning electron microscopy/SEM/method for sample preparation/critical point drying/genus *Cladosporium*
AU LUTAR, Marko
AA GUNDE CIMERMAN, Nina (supervisor)/DRAŠLAR, Kazimir (co-advisor)/PLEMENITAŠ, Ana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2009
TI SPECIMEN PREPARATION OF HALOPHILIC FILAMENTOUS FUNGI FOR SCANNING ELECTRON MICROSCOPY
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 52 p., 5 tab., 17 fig., 36 ref.
LA sl
AL Sl/en
AB Studies on halophilic filamentous fungi have begun in the last decade. The genus *Cladosporium* is one of the dominant representatives of halophilic filamentous fungi in hypersaline waters. For identification to the species level conidiophore morphology, branching and surface structures are crucial. An appropriate method for sample preparation of filamentous fungi grown on the surface of solid agarous media, enabling their study under the electron microscope, has not yet been introduced at the Department of Biology, Biotechnical faculty, University of Ljubljana. Such methods are known, but vary on the object observed. From all methods which we used in our experiments, the method of chemical fixation with critical point drying proved to be the most suitable. First, we made carriers. They protected samples throughout preparation. Next, we fixed samples with fixatives with low osmolarity. Then samples were dehydrated and dried using critical-point dryer. We made micrographies, which were helpful in the taxonomic analysis of the genus *Cladosporium* fungi.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 IZJEMNO SLANA OKOLJA	3
2.2 HALOFILNI ORGANIZMI	3
2.2.1 Prilagoditve organizmov na življenje v izjemno slanih okoljih.....	4
2.2.2 Biotehnološki pomen halofilnih mikroorganizmov	6
2.3 UVRSTITEV RODU <i>Cladosporium</i>	7
2.4 EKOLOGIJA RODU <i>Cladosporium</i>	7
2.5 ZGODOVINA NOMENKLATURE RODU <i>Cladosporium</i>	8
2.6 MORFOLOGIJA RODU <i>Cladosporium</i>	9
2.6.1 Makromorfološke lastnosti kultur	9
2.6.2 Mikromorfološke lastnosti kultur	9
2.7 IDENTIFIKACIJA GLIV RODU <i>Cladosporium</i>	12
2.8 PRIPRAVA BIOLOŠKEGA VZORCA	13
2.8.1 Vrstični elektronski mikroskop.....	13
2.8.2 Priprava mikrobiološkega vzorca	15
3 MATERIAL IN METODE	21
3.1 POSKUSNI OBJEKT	21
3.1.1 Glive	21
3.1.2 Gojenje gliv	22
3.2 PRIPRAVA PREPARATOV ZA VEM	24
3.2.1 Kemikalije za pripravo preparatov za VEM	24
3.2.1.1 Fiksativi	24
3.2.1.2 Pufri	24
3.2.1.3 Obdelava preparata po fiksaciji	24
3.2.1.4 Krio-VEM.....	24
3.2.2 Priprava preparatov za mikroskopiranje z VEM	25
3.2.2.1 Priprava vzorcev s kemijsko fiksacijo	26
3.2.2.2 Priprava vzorcev za krio-VEM.....	29
4 REZULTATI.....	31
4.1 OPTIMIZACIJA PRIPRAVE PREPARATOV ZA VEM.....	31
4.1.1 Kemijska fiksacija	31
4.1.2 Krio-VEM	33
4.2 MIKROGRAFIJE.....	34
4.2.1 Kemijska fiksacija in sušenje pri kritični točki	34
4.2.2 Sušenje s HMDS	40

5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	41
5.1	RAZPRAVA.....	41
5.2	SKLEPI.....	44
6	POVZETEK.....	45
7	VIRI	47

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam vrst rodu <i>Cladosporium</i> z virom in lokacijo osamitve	15
Preglednica 2: Gojišče MEA (sladni ekstrakt akgar)	16
Preglednica 3: Gojišče CYA (Czapek kvasni agar)	16
Preglednica 4: Gojišče SNA (sintetični hranilni agar)	16
Preglednica 5: Gojišče PDA (krompirjev dekstrozni agar)	16

KAZALO SLIK

Slika 1:	Akropetalno izražanje konidiogene celice rodu <i>Cladosporium</i> (Schubert in sod., 2007)	6
Slika 2:	Površina konidijev (David, 1997)	7
Slika 3:	Zgradba vrstičnega elektronskega mikroskopa (VEM)	10
Slika 4:	Koraki priprave preparatov za mikroskopiranje z VEM	18
Slika 5:	Nosilci za vzorčenje in preparacijo	19
Slika 6:	Jemanje agarnih odtisov s cevkami	19
Slika 7:	Zamrzovanje v tekočem dušiku	21
Slika 8:	Nosilci iz sintranega stekla	22
Slika 9:	Kontaminacije z nečistočami, bakterijami in glivami	24
Slika 10:	Spremenjeno naravno stanje vzorcev	25
Slika 11:	Površina kolonije po odtisu	26
Slika 12:	Ohranjene strukture zračnega micelija	26
Slika 13:	Akropetalno nastale verižice konidijev	27
Slika 14:	Ramokonidiji	28
Slika 15:	Površina konidijev	29
Slika 16:	Venčasta brazgotina značilna za rod <i>Cladosporium</i>	29
Slika 17:	Kolabirane hife in konidiji	30

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

cca	okoli
CPD	sušenje pri kritični točki (critical point drying)
“Naš”	ime prilagojenega fiksativa
sod.	sodelavci
VEM	vrstični elektronski mikroskop
ZIM	Zbirka industrijskih mikroorganizmov

1 UVOD

Življenje na Zemlji je raznoliko in prilagodljivo. Ko danes raziskujemo raznovrstna ekstremna okolja, je velika verjetnost, da bomo v njih našli vsaj mikrobe. Nekatera okolja na Zemlji so za življenje tako neprijazna, da je dolgo veljalo prepričanje, da so nenaseljena. V zadnjem času je z razvojem novih tehnik odkrivanja živih organizmov postalo jasno, da življenje najdemo skoraj povsod. V okoljih, kjer vladajo skrajnostni pogoji, večina poznanih organizmov ne preživi. Organizme, ki tam živijo in se razmnožujejo, imenujemo ekstremofili.

Raziskave ekstremofilnih mikroorganizmov so v zadnjem desetletju doživele razcvet. Rezultati raziskav so uporabni na številnih področjih. Pomagajo nam razumeti, kakšno je bilo življenje na začetku, saj imajo številna skrajnostna okolja podobne pogoje, kot so vladali na Zemlji ob pojavu prvih oblik življenja. Z raziskovanjem vesolja je vse bolj jasno, da v njem obstajajo okolja, v katerih so pogoji podobni ali enaki kot v skrajnostnih okoljih na Zemlji. Biološke sledi pionirjev življenja na Zemlji in ekstremofilnih mikroorganizmov se iščejo v zunajzemeljskih okoljih, kjer bi življenje kot ga poznamo lahko obstajalo (Javaux, 2006).

Veliko raziskav se ukvarja s prilagoditvijo in odzivanjem organizmov na okoljske strese. Prilagoditve, ki so jih razvili ekstremofilni mikroorganizmi uporablja biotehnologija na številnih področjih (Oren, 2002).

Eno od skrajnostnih okolij na Zemlji so izjemno slana okolja. To so okolja, kjer je koncentracija topljencev višja od morske vode. Organizmi, ki tovrstna okolja naseljujejo, se imenujejo halofilni mikroorganizmi. Prihajajo iz vseh treh domen življenja (Bacteria, Archaea, Eukarya). Halofilne glive so odkrili šele v prejšnjem desetletju. Deležne so številnih raziskav: od sestave združb posameznih habitatov, do mehanizmov odzivanja na osmotske strese, ki so značilni za ta okolja.

1.1 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA

Pri diplomskem delu smo gojili in mikroskopirali halofilne nitaste glive. Kot modelne organizme smo si izbrali različne vrste rodu *Cladosporium*. Namen dela je bil izbrati in prilagoditi najustrežnejši način priprave vzorcev halofilnih nitastih gliv za vrstično elektronsko mikroskopijo (VEM). VEM se uporablja za opazovanje tridimenzionalne slike površine vzorcev različnih oblik, velikosti in debeline. VEM se uporablja pri znanstvenoraziskovalnem delu kot tudi pri rutinskih področjih od metalurgije, fizike, biologije in medicine (Goodhew in Humpreys, 1988).

Za pregled bioloških vzorcev z vrstičnim elektronskim mikroskopom (VEM) je potrebno uporabiti specifične metode priprave. Različne metode priprave bioloških vzorcev za pregled z VEM so dobro znane, a se protokoli razlikujejo glede na opazovan objekt. Glede na dosedanje izkušnje smo se osredotočili na optimizacijo postopka, po katerem s kemijsko fiksacijo in sušenjem vzorca pri kritični temperaturi, vzorec pripravimo za ogled z VEM. Naš cilj je bil dobiti sliko, ki bo najbolje odražala naravno stanje izbranih gliv.

2 PREGLED OBJAV

2.1 IZJEMNO SLANA OKOLJA

Izjemno slana okolja so habitat številnim organizmom. Večina teh okolij je nastala z izhlapevanjem morske vode. Taka okolja se imenujejo talasohalina. Njihova ionska sestava je podobna morski vodi. To so številna obalna območja, kjer se morje zateka v celino in tam izhlapeva. Sem spadajo tudi soline, umetno nastala okolja, ki jih je človek postavil za pridobivanje soli.

Drug primer so atalasohalina okolja. Njihova ionska sestava ni enaka sestavi oceanov. Sem spadajo večja in manjša slana jezera. Značilnost teh jezer je, da nimajo iztoka. Nivo vode v jezeru določa ravnotežje med pritokom sladke vode, padavinami in izhlapevanjem. Z izhlapevanjem se molska koncentracija s časom povečuje vse do zasičenosti.

Obstaja pa še vrsta okolij, kjer pride do povečanja koncentracije topljencev na različne načine. Eno takih so ostanki starodavnih izjemno slanih vod pod zemeljsko površino. Druga okolja so še globokomorske slanice in slanice na Antarktiki. Prve nastanejo zaradi raztapljanja velikih količin soli na morskem dnu kot posledica tektonike soli, druga pa zaradi koncentriranja soli ob zamrzovanju vode. Površina izjemno slanih okolij se povečuje tudi zaradi klimatskih sprememb in posegov človeka v naravo.

Vsem zgoraj omenjenim okoljem je skupna povišana koncentracija soli. Ostali pogoji pa se lahko zelo razlikujejo. Tako imajo okolja različne pH vrednosti, ionsko sestavo, dostopnost hranil, temperaturo. V nekaterih okoljih se pogoji le malo spreminjajo (globokomorske slanice), v drugih pa nihajo glede na vremenske pogoje, letni čas (soline).

2.2 HALOFILNI ORGANIZMI

V zadnjem času je prišlo z izboljšanjem tehnik gojenja, molekularnobioloških metod in kemotaksonomskih študij, do napredka v poznavanju organizmov, ki naseljujejo izjemno slana okolja. Raznoliki so po filogenetskem izvoru, kot tudi po metabolizmu. Med

halofilnimi organizmi najdemo anoksigene in oksigene fototrofe, aerobne heterotrofe, fermentatorje, denitrifikatorje in sulfatne reducente (Oren, 2002).

Halofilni organizmi imajo specifično potrebo po NaCl. Kushner jih je leta 1978 razdelil na osnovi optimalne koncentracije soli:

- nehalofilni – optimalna rast na manj kot 0,2 M NaCl
- rahlo halofilni – optimalna rast pri 0,2 – 0,5 M NaCl
- zmerno halofilni – optimalna rast pri 0,5 – 2,5 M NaCl
- ekstremno halofilni – optimalna rast pri 2,5 – 5,2 M NaCl
- halotolerantni – tolerirajo povečanja v koncentraciji soli,
rast boljša v odsotnosti soli

2.2.1 Prilagoditve organizmov na življenje v izjemno slanih okoljih

V naravnih habitatih se mikroorganizmi stalno soočajo s spremembami okolja. Poleg spreminjanja dostopnosti hranil, temperature, pH, se v nekaterih okoljih pogosto spreminja osmolarnost. Poleg izjemno slanih okolij, se osmolarnost zaradi padavin in izhlapevanja stalno spreminja tudi drugod. Adaptacije celic na osmotski stres so koordinirani procesi in segajo od prilagoditev celične površine, nadzora celične morfogeneze, rasti in delitve (Hohmann, 2002).

Visoka osmolarnost v izjemno slanih okoljih je za celico škodljiva. V okolju je osmotski tlak manjši kot v celici. Ker biološke membrane prepuščajo vodo, to povzroči izhajanje vode iz celice, dokler se osmotska tlaka na obeh straneh celične membrane ne izenačita. To seveda vodi v dehidracijo, kar povzroči porušenje strukture membrane, lizo celice, metabolno toksičnost in s tem inhibicijo rasti in celične delitve. Za vzpostavitev celičnega turgorja mora biti citoplazma hiperosmotska. Mikroorganizmi uporabljajo dve glavni strategiji za zagotovitev primerne turgorja (Roberts, 2005):

Organski kompatibilni topļenci (osmoliti):

RAZTOPINE IONOV DVOJČKOV:

- betain
- ektoin in hidroksiektoin
- Nε-acetil-β-lizin in β-glutamin

NENABITE RAZTOPINE:

- ogljikovi hidrati (glukoziļglicerol, α-manoziļgliceramid, trehaloza, saharoza)
- nenabite aminokisline in peptidi (N-α-karbamoil-L-glutamin 1-amid, N-acetilglutaminilglutamin amid)

ORGANSKI ANIONI:

- β-glutamat
- β-hidroksibutirat in derivati
- polioli (glicerol) in ogljikovi hidrati (α-glukoziļglicerat, α-manoziļglicerat)

Kot odgovor na osmotski stres celica osmolite sintetizira ali pa jih transportira v celico iz okolja. Njihovo kopičenje pomaga vzdrževati celični turgor, volumen celice in koncentracijo elektrolitov v celici. Čeprav so po kemijski sestavi različni, imajo nekaj skupnih značilnosti: nizka molekulska masa, vodotopnost pri visokih koncentracijah, nenabiti ali v obliki ionov dvojčkov pri fiziološkem pH. V nekaterih primerih lahko osmoliti delujejo kot kemijski šaperoni in pomagajo pri stabilizaciji proteinov ob različnih stresih. Prilagoditev znotrajceličnih mehanizmov na povišane koncentracije osmolitov ni potrebna. To strategijo uporablja večina živih celic.

K⁺ in drugi anorganski ioni:

Nekatere halofilne bakterije in arheje v celici akumulirajo anorganske ione. Ta strategija zahteva prilagoditve intracelularnih mehanizmov na povišane koncentracije ionov. Celična rast je zato do neke mere zmanjšana.

Tako kot večina evkariontov glive za vzdrževanje homeostatskega ravnotežja uporabljajo osmolite. Hkrati se na osmotski stres odzivajo tudi z drugimi prilagoditvami. Halofilne melanizirane kvasovkam podobne glive v izjemno slanih okoljih vzdržujejo fluidnost membrane s spremembo v sestavi lipidov plazemske membrane (Turk in sod., 2004), poveča se melaniziranost celične stene (Kogej in sod., 2007).

Prilagoditve na življenje ob povišani koncentraciji soli so energetsko zahtevne. Večja kot je slanost okolja, več energije potrebujejo organizmi za preživetje (Roberts, 2005).

2.2.2 Biotehnološki pomen halofilnih mikroorganizmov

Mikroorganizmi so zaradi selekcijskih pritiskov v okoljih s skrajnostnimi pogoji razvili prilagoditve, ki jih lahko izkoriščamo na številnih področjih, tudi v komercialne namene. Halofilna okolja so ubikvitarna in zaradi klimatskih sprememb ter posegov človeka v naravo (kmetijstvo, soljenje cest, industrijski izpusti slanice, zmanjševanje zalog pitne vode) število in raznolikost tovrstnih okolij narašča. Halofilni mikroorganizmi se danes uporabljajo v živilski industriji za proizvodnjo hrane (sojina omaka, ribja juha) in prehranskih dodatkov. Uporabni so pri varstvu in sanaciji okolja, saj imajo vrsto bioremediacijskih potencialov (bioadsorbcija težkih kovin, biodegradacija in biotransformacija raznih organskih polutantov). Poleg živih mikroorganizmov so uporabne tudi številne biomolekule. Zaradi stabilnosti in aktivnosti v slanih okoljih so zanimivi njihovi encimi. Bakteriorodopsin se uporablja v bioračunalništvu, pigmenti kot barvilo v hrani, osmoliti kot zaščitna sredstva pred stresi (Margesin in Schinner, 2001).

2.3 UVRSTITEV RODU *Cladosporium*

Anamorfne glive rodu *Cladosporium* imajo teleomorfe rodu *Davidiella*. Uvrščamo jih v deblo *Ascomycota*, razred *Dothideomycetes*, red *Capnodiales*, družino *Davidiellaceae*. Poleg te klasifikacije obstaja tudi umetna, in sicer jih uvrščamo v skupino *Deuteromycetes*. *Deuteromycetes* so umetno postavljena, netaksonomska skupina gliv, pri katerih ne poznamo spolnega razmnoževanja. Klasifikacija je bila osnovana glede na način tvorbe nespolnih spor. Poznamo sporološko, funkcionalno in ontogenetsko klasifikacijo. Ontogenetska upošteva celoten razvoj glive. Poznavanje razvoja je nujno za razumevanje katerekoli glivne strukture. Način tvorbe konidijev (konidiogeneza) je za klasifikacijo nepogrešljiv (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

Za določene vrste rodu *Cladosporium* je bila ugotovljena povezava s spolnimi stadiji. Danes te vrste uvrščamo v rod *Davidiella* Crous & U. Braun (Braun in sod., 2003).

2.4 EKOLOGIJA RODU *Cladosporium*

Vrste rodu *Cladosporium* so med najbolj pogostimi glivami, ki jih izoliramo iz tal in zraka. So kozmopoliti in jih najdemo od polarnih področij do tropov. Rastejo na zelo velikem številu različnih substratov, gostiteljev in so tako oportuno patogeni kot tudi saprofiti. Osamimo jih iz hrane, barv, tekstila in drugega organskega materiala. Pogosto naseljujejo rastline. Verjetnost, da jih osamimo iz razpadajočega organskega materiala je zelo velika. Nekatere vrste imajo pomembno vlogo v medicini. So pogosti kontaminanti kliničnih laboratorijev (*C. herbarum*), povzročajo alergije, in tudi mikoze pri imunsko oslabljenih bolnikih (Crous in sod., 2007). Pogosto imajo kvarni vpliv na živila. Zaradi sposobnosti rasti pri nizkih temperaturah in v okolju s povišano koncentracijo soli lahko kvarijo tudi konzervirana živila. (Crous in sod., 2007). Njihova preferenca do posameznih okolij v taksonomiji ne igra pomembne vloge. To pa ne velja za gostiteljsko specifične taksone. V glavnem je sprejeto, da je parazit specifičen za določeno družino gostiteljev. Z njihovo pomočjo so pri rastlinah razdelili tradicionalni družini *Liliaceae* in *Iridaceae* na več manjših (David, 1997).

Kulture na trdnem gojišču rastejo relativno počasi, večinoma so olivno-rjave do črno-rjave, včasih tudi sive, rjave ali rjavorumene. Površina je žametna ali razpuščena in s tvorbo številnih konidijev postaja praškasta. Vegetativne hife, konidiofori in konidiji so enako pigmentirani. Barva micelija v stiku s substratom (reverz) je značilno temno zelena do črna. Imajo zapleteno razvejane verige majhnih konidijev, ki so dobro prilagojeni na razširjanje na dolge razdalje v velikem številu (David, 1997).

2.5 ZGODOVINA NOMENKLATURE RODU *Cladosporium*

Začela se je z opisom vrste *Dematium herbarum* Pers. (Persoon, 1794), ki je bila opisana kot gliva lesne gnilobe. Persoon jo je uvrstil v svoj red "ordo *Nematothecium*". Tja je uvrščal rodove s pokončnimi konidioforji, kot so *Monilia*, *Aspergillus*, *Botrytis*. Persoon je do leta 1801 v rod *Dematium* uvrstil 17 vrst. Prvič se je ime *Cladosporium* pojavilo leta 1816, ko je Link vanj uvrstil *D. herbarum*. Z leti se je ime v literaturi uveljavilo in leta 1886 je Saccardo vanj uvrstil 110 vrst. *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link sta Clements in Shear (Clements in Shear, 1931) predlagala kot lektotip rodu. Temu so sledili de Vries (de Vries, 1952), Hughes (Hughes, 1958) ter Prasil in de Hoog (Prasil in de Hoog, 1988). Sčasoma je število opisanih vrst znotraj rodu *Cladosporium* hitro naraščalo. Rod je postal velik in vanj so bile uvrščene številne morfološko podobne glive. S podrobnim proučevanjem poznanih in na novo odkritih vrst se je izkazalo, da je definicija rodu nedoločna. V zadnjih desetletjih je postajalo vse bolj jasno, da je potrebna revizija definicije rodu in vanj uvrščenih taksonov. Prvi sodoben koncept rodu je leta 1997 predlagal David. Z izdelavo slik s pomočjo VEM je ugotovil, da imajo konidiji in konidiogene celice značilno venčasto brazgotino z osrednjo kupolo in obročem z gladkim robom. Nadaljne razisave, tudi filogenetske, so omogočile revizijo predlaganih imen. V rodu *Cladosporium* je po zadnjih podatkih opisanih 772 imen. Od teh le majhno število vrst znamo gojiti v kulturi, zato prava številka ni poznana (Crous in sod., 2007). V zadnjih letih je prišlo do podrobne analize rodu in postavljenih je bilo nekaj temeljnih ciljev:

- vpeljati standardizirane pogoje in protokole za gojenje anamorfov in teleomorfov v kulturi

- določiti morfološke lastnosti, na osnovi katerih jih lahko prepoznavamo v kulturah
- opisati rod in ga zasnovati tako, da vanj ne bodo uvrščene morfološko podobne, a filogenetsko nesorodne glive
- določiti informativne genske lokuse, s katerimi lahko razlikujemo vrste rodu *Cladosporium* in vpeljati zbirko podatkov sekvenc, iz katere lahko oblikujemo identifikacijske ključe

2.6 MORFOLOGIJA RODU *Cladosporium*

2.6.1 Makromorfološke lastnosti kultur

Makromorfološke lastnosti, pomembne pri opisu rodu, so hitrost rasti kolonij, barva micelija ob stiku s substratom, strukture kolonij, prisotnost zračnega micelija na gojiščih MEA in OA, zmožnost sporulacije in tvorba sekundarnega micelija in eksudata na različnih gojiščih (Zalar in sod., 2007).

2.6.2 Mikromorfološke lastnosti kultur

Za glive anamorfne oblike se za klasifikacijo uporabljajo značilnosti nespolnih struktur razmnoževanja. To so konidiofor, konidiogena celica in konidij. Tvorba konidijev (konidiogeneza) je najpomembnejši proces s katerim razvrščamo devteromicetne glive. V razvoju konidija ločimo naslednje faze (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002):

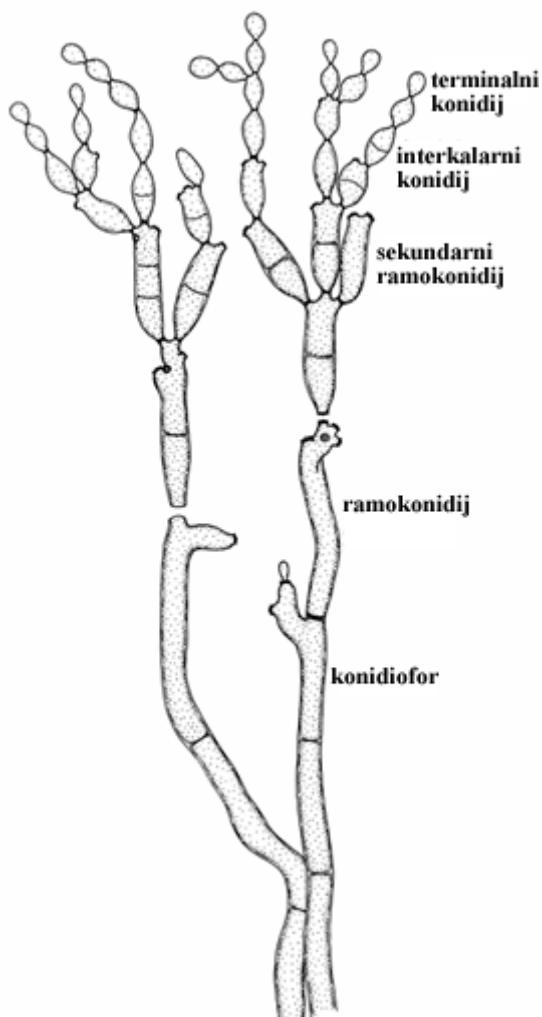
Iniciacija

Konidiji pri rodu *Cladosporium* nastanejo z blastično konidiogenezo (blastokonidiji).

Izraščanje konidiogene celice

Po tvorbi prvega konidija lahko konidiogena celica raste na različnih mestih. Pri rodu *Cladosporium* je izraščanje konidiogene celice akropetalno. Na vrhu vsakega konidija se

tvori eden ali več konidiogenih lokusov; s sproščanjem konidijev na konidiogenih lokusih nastanejo verižice konidijev. Konidiji ostanejo kontinuirno povezani med celotno konidiogenezo. Akropetalne verižice so ponavadi razvejane.



Slika 1: Akropetalno izraščanje konidiogene celice rodu *Cladosporium* (Schubert in sod., 2007)

Značilnosti nespolnih struktur rodu *Cladosporium* (David, 1997):

Konidiofor

Razvejan: Razvejane konidioforje imajo številne vrste.

Ponovna rast: Ni značilnost, po kateri bi razlikovali vrste znotraj rodu. Ob nastopu za rast neugodnih pogojev se rast konidioforjev ustavi. Celične stene konidioforja se utrdijo in odebelijo. Pri nekaterih vrstah pride ob ugodnih pogojih do ponovne rasti na apikalnem delu in tvori se nova konidiogena celica. Posledice so vidne spremembe v pigmentaciji in debelosti celične stene.

Konidiogena celica

Brazgotina na konidiogenem lokusu in konidiju: Venčasta oblika brazgotine je značilna za rod. Brazgotino sestavljata dve komponenti: venec oz. obroč, ki nastane na mestu, kjer sta bili pred odpadanjem konidijev celični steni združeni. Druga je centralna kupola, ki je nabrekla, izbočena septa, ki je delila konidij in konidiogeno celico. Za rod je značilen gladek rob brazgotine. Gladek rob je posledica enakomernega odpadanja konidijev. Razlike v obliki brazgotine med različnimi vrstami so minimalne in v glavnem posledica različne debeline obroča.

Konidij

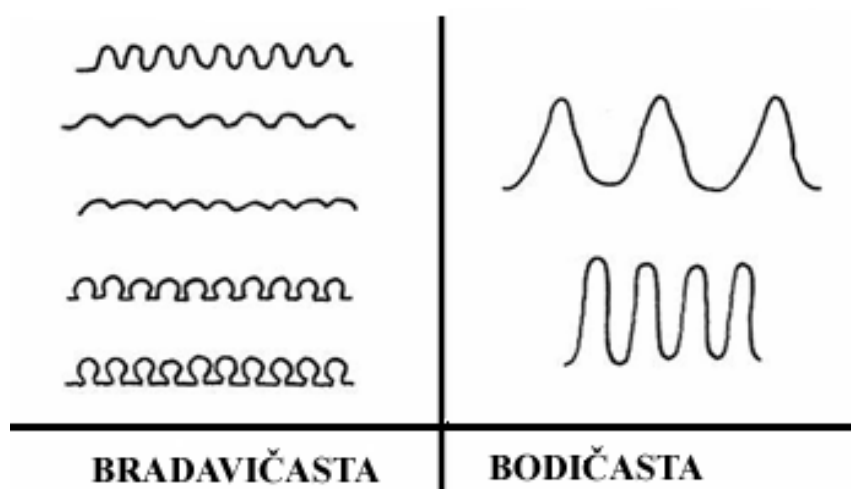
Verižice: Verižice se pojavljajo pri vseh vrstah. Nastajajo akropetalno in so bujno razvejane. Posledica razvejanosti so konidiji na dnu verige, ki jih imenujemo ramokonidiji in so večji od ostalih, septirani ter imajo več kot eno brazgotino. Stopnja razvejanja med vrstami rodu *Cladosporium* je zelo različna. Ni še znano, kakšen je vpliv dedne zasnove in gojenja. Razvejanost je lahko različna pri rasti na naravnem substratu ali v kulturi.

Septiranost: Konidij gliv rodu *Cladosporium* imajo lahko tudi na isti verižici različno število sept. Ramokonidiji so ponavadi septirani.

Oblika: Konidiji so lahko okrogli, ovalni, elipsoidni, podolgovati in cilindrični. Pri nekaterih predstavnikih je lahko sredina konidija ožja od obeh koncev, pri drugih je lahko spodnji del manjši od zgornjega dela.

Mere: Dolžina konidijev se razlikuje znotraj iste verige. Ramokonidiji so lahko tudi več kot 5-krat večji od konidijev na koncu verige. Širina konidijev je pomemben kriterij za razlikovanje med nekaterimi vrstami.

Površina: Konidiji imajo lahko gladko, hrapavo, bradavičasto in bodičasto površino.



Slika 2: Površina konidijev (David, 1997)

2.7 IDENTIFIKACIJA GLIV RODU *Cladosporium*

Za identifikacijo so pomembne fiziološke, morfološke in genetske značilnosti. Glavna morfološka diagnostična lastnost rodu *Cladosporium* je značilna venčasta brazgotina na konidiogeni celici in konidiju. Za identifikacijo vrst rodu *Cladosporium* so pomembni pigmentiranost, oblika, površina in velikost konidijev.

Za celovito poznavanje in razumevanje organizmov ter njihovo ustrezno klasifikacijo, so danes analize genomov organizmov neizbežne. Sekvenčna analiza ribosomske DNA, predvsem variabilnih regij notranjih distančnikov ITS (1, 5.8, 2) in 18S rDNA je pokazala nekatere razlike znotraj rodu *Mycosphaerella*. Posledično so teleomorfne oblike rodu *Cladosporium* uvrstili v nov rod *Davidiella* (Braun in sod., 2003). K boljšemu razumevanju filogenije rodu in opisu novih vrst rodu *Cladosporium* so pripomogle tudi

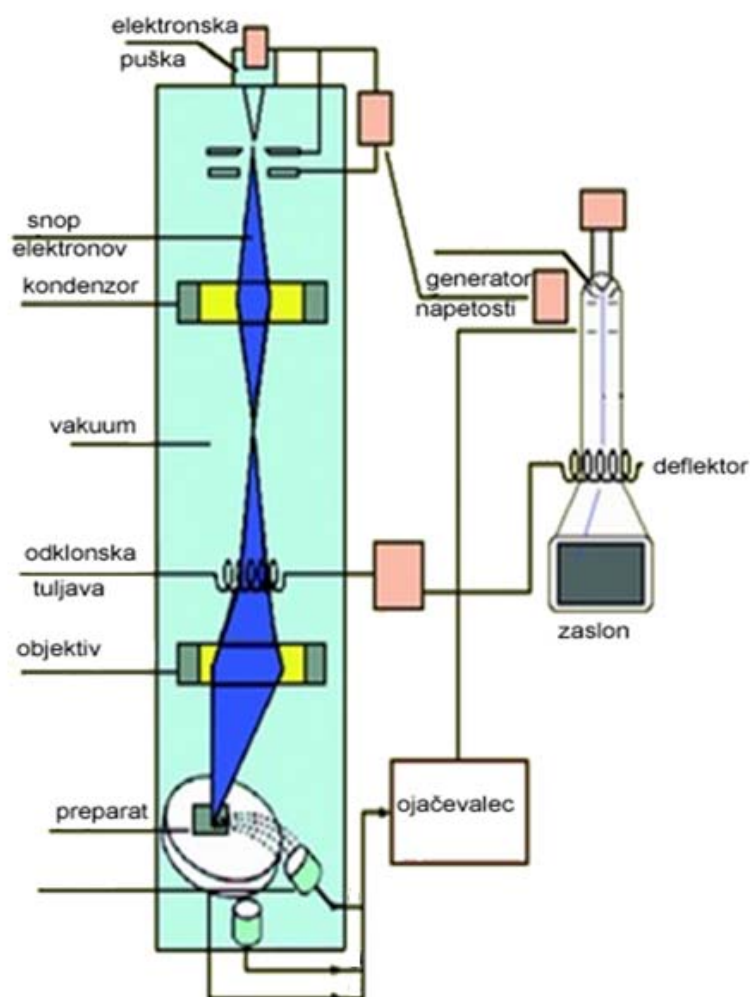
analize določenih predelov ribosomske DNA (SSU rDNA, LSU nrRNA, ITS rDNA), ter eksonov in intronov aktina, kalmodulina, translacijskega elongacijskega faktorja α , histona H3 in beta tubulina. Na podlagi teh rezultatov so bile v rodu *Cladosporium* opisane številne nove vrste, filogenetsko manj sorodni, a morfološko podobni taksoni pa so bili premeščeni v druge rodove (Zalar in sod., 2007; Crous in sod., 2007; Schubert in sod., 2007).

2.8 PRIPRAVA BIOLOŠKEGA VZORCA

Za pregled bioloških vzorcev z vrstičnim elektronskim mikroskopom (VEM) je potrebno uporabiti specifične metode priprave. Z njimi vzorce obdelamo tako, da so obstojni v okolju VEM. Ključno pri pripravi je, da preparati kljubujejo vakuumu in snopu elektronov, pri tem pa ohranijo obliko, ki daje adekvatno sliko naravnega stanja.

2.8.1 Vrstični elektronski mikroskop

Vrstični elektronski mikroskop omogoča opazovanje površin preparatov. Z njim lahko opazujemo površine z elektronsko ločljivostjo v nanometrskem področju in v širokem razponu povečav, ki sega pri sodobnih komercialnih mikroskopih od 10 do 500000. Odlikuje ga velika globinska ostrina.



Slika 3: Zgradba vrstičnega elektronskega mikroskopa (VEM)

Pri elektronski mikroskopiji je izvor za nastanek signala snop elektronov. Vir elektronov je elektronska puška. V njej iz kovinske katode izsevamo elektrone in jih pospešimo proti anodi. Snop elektronov, ki zapusti elektronsko puško s pomočjo elektromagnetnih leč, zberemo v ozek snop in usmerimo na površino preparata. Sistem elektromagnetnih odklonskih leč premika snop elektronov po površini preparata.

Ko elektroni zadanejo vzorec, pride na področju, ki se imenuje interakcijski volumen, do vrste interakcij med njimi in atomi v vzorcu. Za tvorbo slike v VEM je pomembna interakcija, pri kateri prihaja do izbijanja sekundarnih elektronov. Te zazna detektor (slika

4). Slika preparata na zaslonu nastaja sinhrono s pomikanjem snopa elektronov po površini preparata. Signal krmili svetlost žarka na zaslonu. Povečava mikroskopa je razmerje med površino zaslona in površino, ki jo tipa elektronski snop na preparatu. Ker imajo elektroni majhno maso, je njihova pot v zraku omejena. Zato je za nastanek elektronskega oblaka in formiranje elektronskega snopa potrebno vzdrževati v koloni elektronskega mikroskopa vakuum.

2.8.2 Priprava mikrobiološkega vzorca

Temeljne zahteve za pregled preparata z VEM:

- preparat mora biti obstojen v vakuumu
- preparat mora biti obstojen v snopu elektronov
- zadostna emisija sekundarnih elektronov
- odsotnost motečih nabijanj
- čistost preiskovane površine

Biološki vzorci tem zahtevam redko zadostijo. Zaradi visoke vsebnosti vode niso obstojni v vakuumu. Snop elektronov jih lahko poškoduje. Biološki materiali niso prevodni. Z izborom metode in tehniko priprave vzorcev zagotovimo, da so temeljne zahteve za pregled bioloških vzorcev z VEM izpolnjene. Pri pripravi skoraj vedno prihaja do nezaželenih sprememb. Le te zakrijejo ali popačijo naravno stanje vzorcev. Cilj priprave preparata je t.i. ekvivalentna slika, ki mora čimbolj odražati naravno stanje. Izpolnitev tega cilja je v največji meri odvisna od načina priprave.

Osnovni koraki priprave vzorcev za VEM:

- predpriprava vzorca za fiksacijo
- fiksacija
- dehidracija
- sušenje
- namestitev preparata na nosilec

- prekrivanje s težko kovino

● **Predpriprava vzorca za fiksacijo**

Ker pregled z VEM zahteva čistost preiskovane površine, je potrebno včasih pred fiksacijo s površine vzorcev odstraniti elemente, ki nas ne zanimajo ali ovirajo nadalnje delo: npr. ostanke gojišča v katerem smo gojili celice. Čistost zagotovimo s spiranjem s primernimi pufri ali izotonično raztopino (Watson in sod., 1980).

● **Fiksacija**

Fiksacija je postopek, ki ustavi življenske funkcije in stabilizira strukturo vzorca. Stabilizacija je nujna, saj morajo vzorci prenesti razne sile, ki delujejo na celico med dehidracijo, sušenjem in interakcijo snopa elektronov v elektronskem mikroskopu.

Za pripravo preparatov za VEM se uporabljata dva postopka fiksacije: kemijska in fizikalna. Pri kemijski se uporablja fiksative. Pri fizikalni se za stabilizacijo struktur uporablja zamrzovanje ali segrevanje.

Kemijska fiksacija

Bistvo kemijske fiksacije je, da fiksativ povzroči celično smrt in prepreči avtolitične spremembe. Da lahko fiksativ reagira z nespremenjenimi strukturami v vzorcu, mora prodreti v vzorec v najkrajšem možnem času.

Pri pripravi vzorcev se uporabljajo različni fiksativi v različnih kombinacijah, koncentracijah, pufrih, pH območjih in časovnih okvirih. Fiksacija se izvaja v eni ali več stopnjah:

- primarna fiksacija z aldehidi
- sekundarna fiksacija s spojinami s težkimi kovinami

Aldehidi koagulirajo beljakovine, s tem da navzkrižno povežejo proste amino skupine in s tem ojačajo strukturo preiskovanega vzorca. Ojačanje strukture je pomembno predvsem zato, ker pri dehidraciji prihaja do številnih sprememb. Najbolj pogosto se pri pripravi fiksativa uporabljata formaldehid in glutaraldehid.

Za fiksacijo bioloških vzorcev se običajno uporablja kombinacija obeh. S tem združimo lastnosti obeh: hitro prodiranje in delna stabilizacija struktur s formaldehidom in počasnejše prodiranje ter trajnejša stabilizacija z glutaraldehidom (Waterman, 1980). Za optimalno učinkovitost fiksativa je nujna primerna osmolarnost in pH fiksativa ter čas fiksacije (Watson in sod., 1980).

Kot sekundarni fiksativ se uporablja osmijev tetroksid. Za razliko od aldehydov, ki stabilizirajo aldehide, OsO_4 stabilizira predvsem lipide, ki se v večji ali manjši meri med dehidracijo ekstrahirajo. Izboljša tudi električno prevodnost bioloških vzorcev. Slabost OsO_4 je počasno prodiranje, toksičnost in cena (Waterman, 1980).

Fizikalna fiksacija

Pri fizikalni fiksaciji vzorce fiksiramo z zamrzovanjem. Pri tem načinu je ključna hitrost zamrzovanja. Pri počasnem zamrzovanju nastajajoči ledeni kristali praviloma poškodujejo celično strukturo. Hitrost zamrzovanja mora biti tako velika, da pride do vitifikacije vode. Zato je ta metoda primerna za vzorce manjših dimenzij. Zamrzovanje lahko poteka pri zelo različnih temperaturah, tlakih in parcialnih tlakih. Vzorec lahko zamrznemo v tekočem dušiku nezaščiten, lahko pa ga imobiliziramo z različnimi nosilci (Boyde, 1978).

● krio-VEM

Fizikalna fiksacija z zamrzovanjem je eden od korakov metode, s katero biološke vzorce pripravimo za ogled z VEM pri nizki temperaturi. Kriomikroskopiranje (krio-VEM) omogoča ogled zamrznjenih, hidriranih vzorcev. Pri krio-VEM dosežemo ločljivosti in povečave preparatov, ki so enake ali boljše kot pri VEM pri sobni temperaturi. Krio-VEM zmanjša število korakov priprave vzorcev za ogled z VEM. Najbolj pogosto vzorce

zamrznemo v tekočem dušiku. Nato vzorce prekrijemo s težko kovino. Prekrivanje s težko kovino in mikroskopiranje preparatov poteka pri nizkih temperaturah. Temperature morajo biti tako nizke, da med mikroskopiranjem ne prihaja do sprememb lednih kristalov, ki poškodujejo strukturo preparata. S krio-VEM se zmanjša število artefaktov, ki lahko nastanejo pri drugih postopkih priprave vzorcev za VEM predvsem med dehidracijo in sušenjem. Najbolj pogosti artefakti, ki lahko nastanejo na vzorcu pripravljenem za krio-VEM, so posledica nepopolne sublimacije vlage na površini vzorca. Glavna omejitev pri pripravi vzorcev za krio-VEM je njihova velikost, saj mora biti hitrost zamrzovanja tako velika, da pride do vitrifikacije vode. (Kamiskyj in Dahms, 2007).

- zamrznjeno sušenje (FD-freeze drying)

Metoda poteka tako, da vzorec najprej fiksiramo z zamrzovanjem in nato z liofilizacijo odstranimo vodo. Pri liofilizaciji led sublimira in vzorec ni izpostavljen silam površinske napetosti, ki ga lahko poškodujejo. Glavne težave nastopijo med zamrzovanjem vzorca, ko se tvorijo kristali ledu in lahko poškodujejo strukture vzorca. Zamrzovanje lahko poteka pri različnih pogojih, odvisno od velikosti in narave vzorca. Če je hitrost zamrzovanja primerna, se naravno stanje vzorca dobro ohrani (Boyde, 1978).

- **Dehidracija**

Dehidracija je postopek s katerim vodo v vzorcu zamenjamo z drugim medijem. Vzorec mora biti zaradi pogojev (vakuum) v koloni elektronskega mikroskopa med opazovanjem suh. Zaradi nizkega tlaka v koloni voda iz vzorca izpari in ga poškoduje. Če bi vzorec sušili na zraku, se zaradi sil površinske napetosti, ki nastajajo ob umikanju površine izhlapevajoče vode, pojavijo deformacije celičnih struktur. Zato je potrebno jakost sil površinske napetosti prehajajoče vode zmanjšati na najmanjšo možno mero (Watson in sod., 1980). To dosežemo tako, da vodo odstranimo z mediji, ki imajo najmanjšo možno površinsko napetost. Večinoma so v uporabi topila, ki izhlapevajo hitreje kot voda in imajo majhno površinsko napetost. Največ se uporablja različne alkohole in aceton. Običajna metoda za odstranitev vode v vzorcu je uporaba vrste naraščajočih koncentracij etanola do absolutne koncentracije. Postopno naraščanje koncentracij je potrebno za ohranitev

osmotskega ravnotežja. Čas inkubacije v vsaki koncentraciji je od 5 do 20 minut, odvisno od velikosti objekta in difuzijske prevodnosti (Watson in sod., 1980).

• Sušenje

Sušenje je postopek s katerim iz vzorca odstranimo vodo ali dehidracijski medij. Mediji, ki jih izberemo omogočijo, da med sušenjem prihaja do čimmanjših sil površinske napetosti, ki lahko poškodujejo strukturo vzorca. Uporablja se eter, aceton in pogosto HMDS. Najbolj pogosto uporabljena metoda sušenja vzorcev pri mikroskopiji z VEM je sušenje pri kritični točki.

Sušenje pri kritični točki (CPD-critical point drying)

Ta metoda je dobro poznana in najbolj pogosto uporabljena pri sušenju vzorcev za VEM. Aparature za izvajanje metode so danes izpopolnjene in komercialno dostopne. Navodila za delovanje so večinoma podobna: hlajenje komore, vstavljanje vzorca v komoro, dovajanje intermedija (običajno $\text{CO}_2(\text{l})$) in odstranjevanje dehidracijskega medija, segrevanje nad kritično temperaturo in tlak in počasno prezračevanje komore nad kritično točko. Najtežji korak pri vsem je zagotoviti, da je bil ves dehidracijski medij odstranjen, zato se večkrat zamenja $\text{CO}_2(\text{l})$. (Cohen, 1979; Watson in sod, 1980).

Kritična točka je definirana kot točka, kjer sta pri določenih pogojih (temperatura, tlak) gostota plina in tekočine enaka. Izparilna toplota pri in nad kritično točko je enaka nič in razlik med dvema fazama ni več. Pri in nad kritično točko obstaja homogeni ravnotežni sistem, ki se imenuje superkritična tekočina. Pri kritični točki prehaja tekočina v plinasto stanje brez fazne meje zato sile površinske napetosti ne nastajajo. (Atkins, 1990; Watson in sod, 1980).

Kritična točka vode je: $T = 374\text{ }^{\circ}\text{C}$; $p = 218\text{ atm}$. Pri teh pogojih se vsi biološki vzorci uničijo. Ker se voda ne meša z intermediji, ki se uporabljajo pri CPD (CO_2 , N_2O , Freoni), jo je potrebno odstraniti z ustreznim dehidracijskim medijem.

Sušenje s HMDS

Sušenje s HMDS je alternativna metoda sušenju pri CPD. HMDS je kapljevina z izredno majhno površinsko napetostjo, ki hitro hlapi. Dobro se meša z večino dehidracijskih medijev. S to metodo vzorce posušimo tako, da s HMDS odstranimo dehidracijski medij. Nato pustimo vzorce na zraku in počakamo da HMDS iz vzorcev izhlapi. Tako dobimo suh vzorec. V primerjavi s CPD je postopek sušenja bistveno hitrejši, cenejši in manj zahteven. Uporablja se za sušenje različnih vrst bioloških preparatov. Spremembe, ki nastanejo med sušenjem s HMDS so običajno večje kot pri CPD, vendar še vedno dovolj majhne, da lahko z opazovanjem preparata z VEM dobimo uporabne rezultate (Bray in sod., 1993).

● **Namestitev preparata na nosilec**

Preparat moramo namestiti na nosilec, ki ga lahko vstavimo v elektronski mikroskop. Nosilci so kovinski in zagotavljajo dobro električno in toplotno prevodnost. Nosilci omogočajo opazovanje preparata iz različnih zornih kotov.

Večje preparate pritrdimo z lepilom, ki vsebuje koloidno srebro. Manjše preparate, kot so na primer posamezne celice, pritrdimo najprej na stekelce in nato na kovinski nosilec.

● **Prekrivanje s težko kovino**

S prekrivanjem s težko kovino naredimo električno in toplotno prevoden preparat. Prevodnost zmanjša nabijanje elektronov in poveča delež sekundarnih elektronov vzorca. Običajno se uporablja zlato ali zlitine zlata. Za izdelavo kovinske prevleke na površini vzorca se uporabljata dve tehniki: naparevanje in napraševanje. Slednja je za VEM bolj primerna, saj omogoča izdelavo enakomernejše prevleke. Običajna debelina prevleke je 20-30 nm. Premajhna debelina povzroči nabijanje, predebela pa zakrije podrobnosti na površini preparata (Echlin, 1978).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POSKUSNI OBJEKT

Pri naši nalogi smo gojili in opazovali nitaste halofilne glive z VEM.

3.1.1 Glive

Uporabili smo seve naslednjih vrst:

Preglednica 1: Seznam vrst rodu *Cladosporium* z virom in lokacijo osamitve

Ime vrste in zbirke biokulture	Vir	Lokacija
<i>Cladosporium dominicanum</i> EXF-732 T; CBS 119415	izjemno slana voda	Dominikanska republika, slano jezero Enriquilio
<i>Cladosporium fusiforme</i> EXF-449 T; CBS 119471	izjemno slana voda	Slovenija, Sečoveljske soline
<i>Cladosporium halotolerans</i> EXF-572 T; CBS 119416	izjemno slana voda	Namibija, soline
<i>Cladosporium langeronii</i> EXF-1000; CBS 189.54 NT	mikoze	Braziliya
<i>Cladosporium psychrotolerans</i> EXF-391 T; CBS 119412	izjemno slana voda	Slovenija, Sečoveljske soline
<i>Cladosporium velox</i> EXF-2522; CBS 119417 T	bambus	Indija, Charidij
<i>Cladosporium salinae</i> EXF-335 T; CBS 119413	izjemno slana voda	Slovenija, Sečoveljske soline
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> EXF-997; CBS 193.54 NT	človeški nohti	-
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> EXF-328	izjemno slana voda	Sečoveljske soline

Legenda: T = tipska vrsta; NT = neotipska vrsta

3.1.2 Gojenje gliv

Gojenje gliv je potekalo na Katedri za biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo. Kulture so bile shranjene v zbirke EXF (zbirka ekstremofilnih gliv) Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete.

Izbrane seve smo gojili na različnih agarnih gojiščih: gojišče iz sladnega ekstrakta ("malt extract agar" - MEA), gojišče iz ovsenih kosmičev ("oatmeal agar" – OA) z dodatkom različnih koncentracij NaCl (5, 10, 17, 20%), ter Czapkovo gojišče ("Czapek yeast agar" – CYA) in krompirjev dekstrozni agar ("potatoe dextrose agar" - PDA). Glive smo gojili tudi na tekočem sladnem gojišču ("malt extract" - ME) gojišču. Po začetnih poskusih na zgoraj navedenih gojiščih, smo se v nadaljevanju odločili za revnejše gojišče, za sintetični hranilni agar ("synthetic nutrient agar" - SNA). Kulture smo vselej inkubirali pri temperaturi 24°C.

Sestava gojišč:

Preglednica 2: gojišče **MEA** (sladni ekstrakt agar)

sladni ekstrat	20 g
pepton	1 g
glukoza	20 g
agar	20 g
destilirana H ₂ O	do 1 L
pH	5,0-5,5

Preglednica 3: gojišče **CYA** (Czapek kvasni agar)

Saharoza (BDH)	30 g
NaNO ₃ (MERCK)	3,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (MERCK)	0,5 g
FeSO ₄ (MERCK)	0,01 g
KCl (MERCK)	0,5 g
kvasni ekstrakt (Difco)	5 g
agar (Bie&Berntsen)	15 g
trace metal solution	1,0 ml
destilirana H ₂ O	do 1 L

Preglednica 4: gojišče **SNA** (sintetični hranilni revni agar)

KH ₂ PO ₄	1 g
KNO ₃	1 g
MgSO ₄	0,5 g
KCl	0,5 g
glukoza	0,2 g
saharoza	0,2 g
Bacto agar (Difco)	20 g
destilirana H ₂ O	do 1 L

Preglednica 5: gojišče **PDA** (krompirjev dekstrozni agar)

pripravljena mešanica (Oxoid)	42 g
destilirana H ₂ O	do 1 L

Preglednica 6: gojišče **OA** (ekstrakt ovsenih kosmičev)

pripravljena mešanica (Difco)	15 g
agar	12
destilirana H ₂ O	do 1 L

3.2 PRIPRAVA PREPARATOV ZA VEM

3.2.1 Kemikalije za pripravo preparatov za VEM

3.2.1.1 Fiksativi

Formaldehid: pripravili smo ga z depolimerizacijo paraformaldehida (Agar).

Glutaraldehid: pripravili smo ga iz 25% glutaraldehida (EM grade-Agar).

Fiksirali smo s fiksativom "Naš", ki je bil razvit na Oddelku za biologijo. To je modifikacija fiksativa Karnovsky. Vsebuje 1% glutaraldehida, 0,4% formaldehida v 0,1 M kakodilatnem pufri. Njegov pH = 7,2. Osmolarnost je cca 400-500 mosmol.

3.2.1.2 Pufri

Po fiksaciji smo spirali z 0,1 M Na-kakodilatnim pufrom (pH=7,2) proizvajalca Sigma.

3.2.1.3 Obdelava preparata po fiksaciji

Po fiksaciji smo preparate spirali, dehidrirali, posušili in prekrili z zlatom.

Dehidracija: etanol, aceton.

Sušenje: CO₂, HMDS

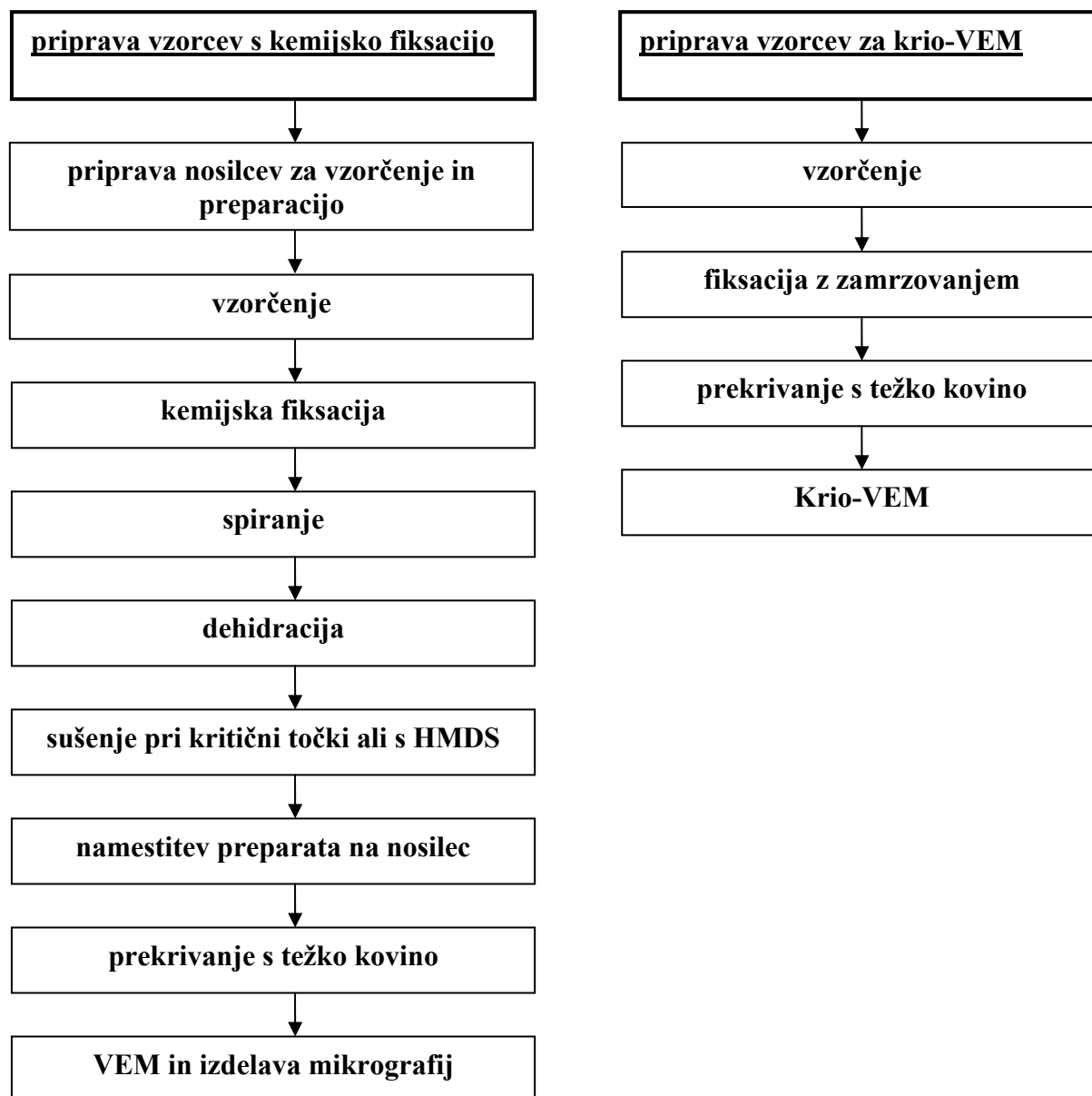
Namestitev preparata na nosilec: prevodni koloid srebra (Dotite, Silver Print).

Prekrivanje: zlato.

3.2.1.4 Krio-VEM

Tekoči dušik za pripravo mikroskopa in zamrzovanje vzorcev.

3.2.2 Priprava preparatov za mikroskopiranje z VEM



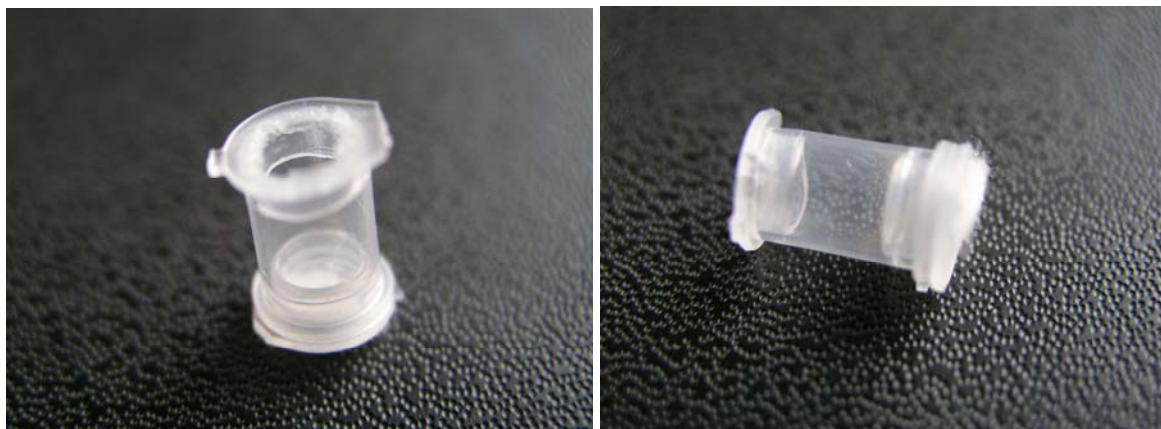
Slika 4: Osnovni koraki priprave preparatov za mikroskopiranje z VEM

3.2.2.1 Priprava vzorcev s kemijsko fiksacijo

- priprava nosilcev za vzorčenje in preparacijo vzorcev

Z VEM smo želeli izdelati mikrofotografije, na katerih bodo vidne nepoškodovane glivne strukture na površini agarskega gojišča. Ker se površinske strukture nitastih gliv med vzorčenjem in preparacijo zlahka poškodujejo, smo vzorce zaščitili z nosilci. Pri začetnih poskusih smo vzorce zaščitili s komercialnimi nosilci iz sintranega stekla (Balzers). Ker je v vseh poskusih prišlo do močnega krčenja preparatov, smo izdelali cevke. Cevke so ščitile vzorec med vzorčenjem in nadaljno pripravo preparata.

Cevke smo pripravili iz 0,5ml mikrocentrifugirk po Eppendorfu za polimerazno verižno reakcijo (PCR epice). Epici smo z olfa nožem odrezali spodnji del in pokrovček ter tako dobili ravno cevko. Pokrovčku smo nato izrezali sredino in dobili obroč.

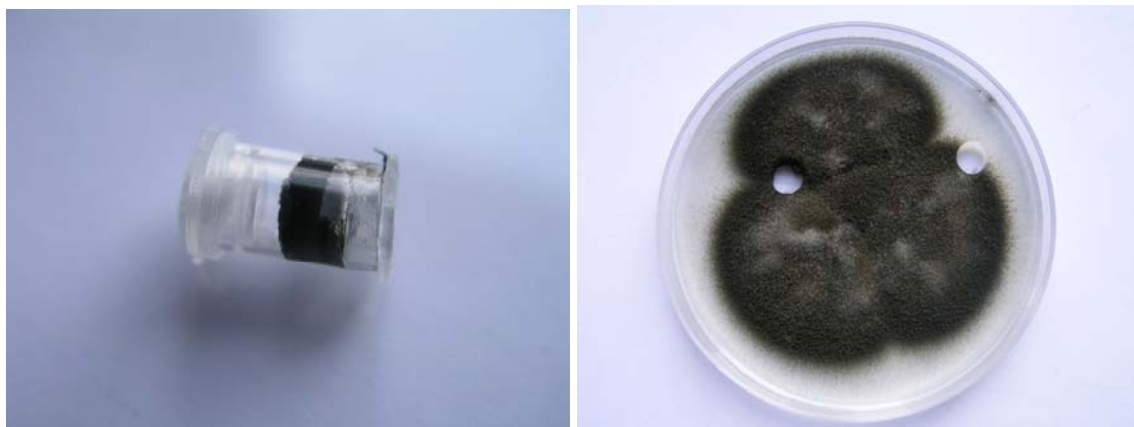


Slika 5: nosilci za vzorčenje in preparacijo

- vzorčenje

Vzorčenje je potekalo v laminariju ob uporabi aseptičnih tehnik dela. Iz agarnih plošč smo izrezali izbrano področje na koloniji s pomočjo predhodno pripravljenih cevk in jih na obeh koncih zaprli z obročastim pokrovčkom. Na koncu, kjer je bila na agarju kolonija,

smo pri nekaterih vzorcih na pokrovček zagostili vato tako, da so med pripravo kemikalije počasneje difundirale. Odtise smo odvezemali iz različnih delov kolonij (sredina, rob) ter tako dobili različno stare in različno goste dele micelija.



Slika 6: jemanje agarnih odtisov s cevkami

- fiksacija

Cevke z vzorci smo fiksirali 2 uri.

- spiranje s pufrom

S spiranjem v pufru po fiksaciji smo iz vzorca odstranili prebitni fiksativ. Spirali smo s kakodilatnim pufrom 3-krat po 10 minut.

- dehidracija

Preparate smo dehidrirali v etanolni vrsti. Po začetnih poskusih smo po dehidraciji z absolutnim etanolom slednjega zamenjali z acetonom. Z uporabo acetona rezultati niso bili boljši, zato ga v nadaljnjih poskusih nismo uporabljali.

Postopek dehidracije:

30-odstotni etanol	10 minut
50-odstotni etanol	10 minut
70-odstotni etanol	10 minut
80-odstotni etanol	10 minut
90-odstotni etanol	10 minut
100-odstotni etanol	3-krat 10 minut

- sušenje pri kritični točki

Preparate smo sušili pri kritični točki iz CO₂(l). Uporabljali smo aparaturo Balzers critical point dryer CPD 030. Za temeljito odstranjevanje etanola, smo večkrat zamenjali CO₂(l) in prezračevali preko noči.

- sušenje s HMDS

Postopek je potekal tako, da smo z etanolom dehidrirane vzorce sušili v HMDS 3-krat po 10 minut.

- napraševanje preparata z zlatom

Uporabili smo napraševalec Balzers SCD 050. Za ustrezno debelino prevleke, smo napraševali 5-10 minut pri napetosti 1 kV in toku 10mA.

- mikroskopiranje in izdelava mikrografij

Preparate smo opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom Jeol 840A.

Mikrografije smo izdelali tam, kjer so bile glivne strukture dobro ohranjene. Izdelali smo tudi mikrografije poškodovanih glivnih struktur, ki so nam služile kot kontrola.

3.2.2.2 Priprava vzorcev za krio-VEM

Priprava je potekala v naslednjih korakih:

- priprava mikroskopa za kriomikroskopijo

Montaža enote za kriomikroskopijo in enote za izdelavo prevleke s težko kovino. Hlajenje mikroskopa s tekočim dušikom.

- vzorčenje

Seve gliv smo gojili v tekočem gojišču. Majhne vzorce gliv smo odvzeli s površine tekočega gojišča.

- zamrzovanje v tekočem dušiku

V tekočem dušiku smo ohladili nosilce preparatov. Nato smo majhne vzorce micelija namestili v ohlajen nosilec preparatov in ga zamrznili v tekočem dušiku. Zamrzovanje je potekalo hitro in je trajalo manj kot minuto.



Slika 7: zamrzovanje v tekočem dušiku

- mikroskopiranje in izdelava mikrografij

Najprej smo pripravili vrstični elektronski mikroskop za opazovanje zamrznjenih vzorcev. Nato smo vzorce hitro prenesli v enoto mikroskopa, kjer poteka prekrivanje z zlatom. Sledil je ogled vzorcev z mikroskopom.

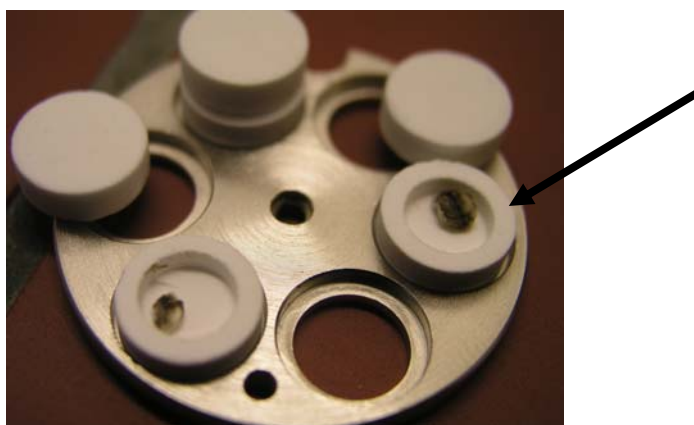
4 REZULTATI

4.1 OPTIMIZACIJA PRIPRAVE PREPARATOV ZA VEM

4.1.1 Kemijska fiksacija

Pri začetnih poskusih smo vzorčili iz gojišča MEA. Z metodo kemijska fiksacija s sušenjem pri kritični točki smo preparirali nezaščitene vzorce. Pri pregledu preparatov z VEM se je izkazalo, da s to metodo priprave vzorcev ostanejo strukture celic gliv nepoškodovane. Vendar na preparatih vse značilnosti nitastih gliv niso bile jasno vidne. Micelij je bil pregost. Prišlo je do sprememb struktur gliv na površini trdnega gojišča, saj so hife in strukture nespolnega razmnoževanja naključno ležale na površini agarja. Ker smo želeli izdelati mikrografije, na katerih so vidne značilnosti, ki so v pomoč pri identifikaciji nitastih gliv, smo metodo poskušali optimizirati.

Izbrali smo gojišče SNA, saj smo pričakovali, da bodo glive na tem gojišču tvorile redkejši micelij in konidiofore. Vzorce smo zaščitili s komercialnimi nosilci iz sintranega stekla. V vseh poskusih je prišlo do močnega krčenja preparata po sušenju pri kritični točki, zato v nadaljnjih poskusih tovrstnih nosilcev nismo več uporabljali.



Slika 8: Nosilci iz sintranega stekla: po vzorčenju je bil agarški odtis enako velik kot notranji obod nosilca. S puščico je označen košček močno skrčenega agarnega odtisa z glivnimi strukturami.

Namesto komercialnih nosilcev smo izdelali cevke, s katerimi smo izrezali odtise vzorce iz agarnih plošč. Cevke so štitele površino kolonij tako med vzorčenjem kot med preparacijo. Odtise smo odvezli na različnih mestih kolonij in s tem zajeli različno stare in različno goste micelije. Pri nekaterih poskusih je zaščita s cevkami ohranila organiziranost občutljivih struktur zračnega micelija, pri drugih ne (slika 14).

Pri večini poskusov smo s pripravo vzorcev z metodo kemijska fiksacija s sušenjem pri kritični točki dobili dobre rezultate in izdelali uporabne mikrografije. Vendar tekom celotnega dela nekateri poskusi niso uspeli. Preparat se je bodisi močno skrčil ali pa so glivne celice kolabirale. Ker je pri večini neuspešnih poskusov na stekelcu komore CPD aparature nastal kondenz, smo predvidevali, da so vzroki za krčenje preparatov najverjetneje v nepopolni dehidraciji. Zato smo skrbno izvedli vse korake dehidracije. Zadnji korak dehidracije z absolutnim etanolom je najbolj problematičen. Največkrat je od njega odvisno ali smo iz vzorcev odstranili vso vodo. Absolutni etanol je zelo higroskopičen. Pri delu z njim smo pazili, da ni vezal vlage iz zraka. Pri nekaterih poskusih smo po dehidraciji z absolutnim etanolom slednjega zamenjali z manj higroskopičnim acetonom. Z uporabo acetona rezultati niso bili boljši, zato ga v nadaljnjih poskusih nismo uporabljali. Pripravljali smo tudi različno stare vzorce in spremljali ali starost vzorcev vpliva na njihovo pripravo. Vzorčili smo iz agarnih plošč, na katerih so bile kolonije stare od dva dni do dva meseca. S tem smo dobili vzorce, ki so se razlikovali v sestavi gojišča, vsebnosti vode in starosti kultur. Vzrokov, zaradi katerih priprava vedno ni uspela, nismo odkrili.

Vzporedno s sušenjem pri kritični točki, smo izvedli poskus pri katerem smo vzorce posušili s HMDS. Preparati so se po sušenju le malo skrčili in izgledali so primerni za opazovanje z VEM. Med opazovanjem se je izkazalo, da so celice gliv kolabirale. Izdelali smo mikrografije (slika 15) in tega načina priprave nismo uporabljali.

4.1.2 Krio-VEM

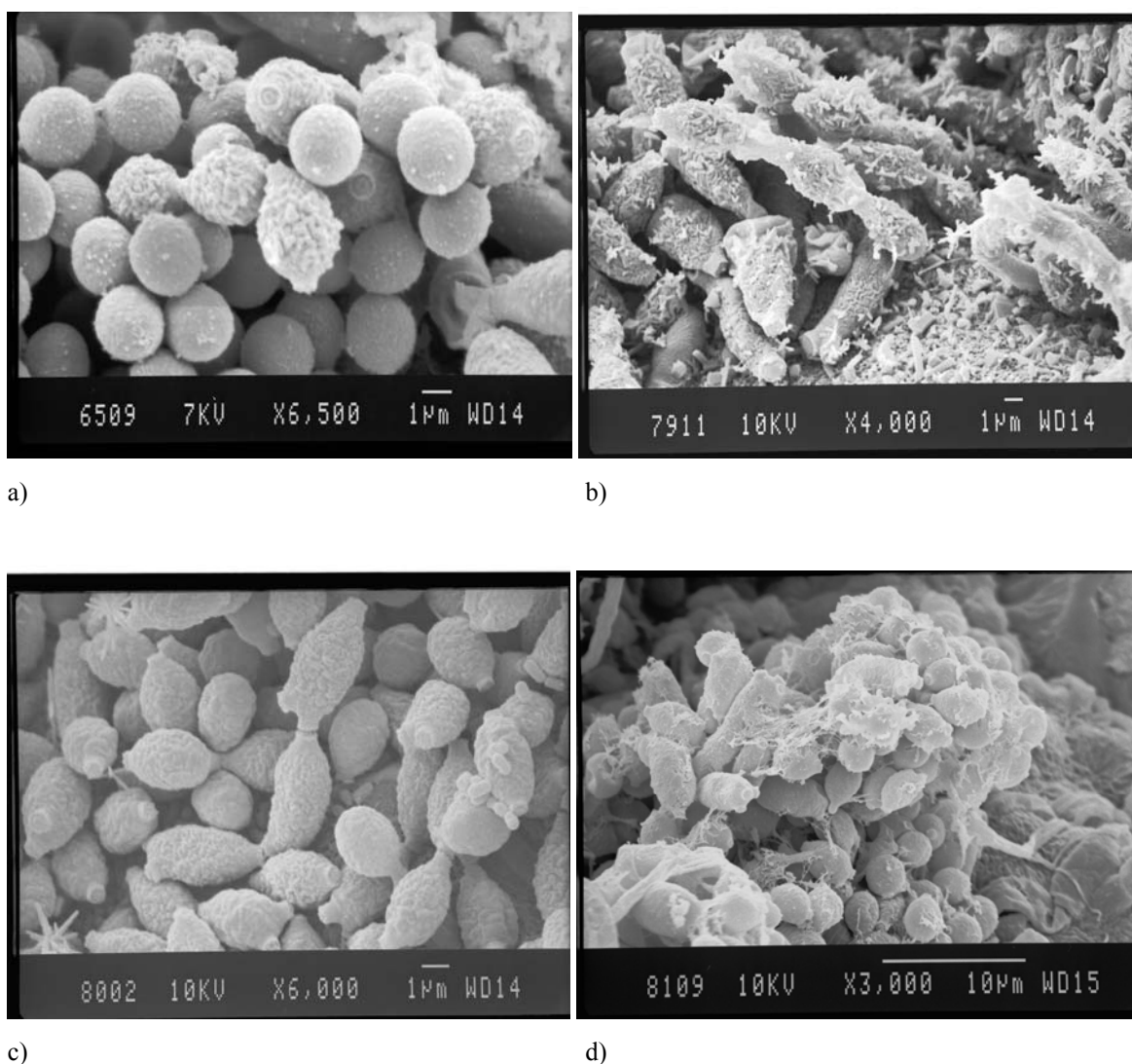
Metode, s katero smo pripravljali vzorce za krio-VEM, nismo poskušali optimizirati, saj smo imeli zaradi specifikacij razpoložljive opreme tehnične težave pri pripravi vzorcev in mikroskopiranju preparatov.

Pri pregledu zamrznjenih, z zlatom prevlečenih preparatov z krio-VEM smo na zaslonu videli zelo goste micelijske strukture, ki so izgledale nepoškodovane. Iz slike na zaslonu je bilo razvidno, da je zamrzovanje vzorca uspelo. Med mikroskopiranjem je prihajalo do motečih nabijanj elektronov, zato ni bilo mogoče izdelati mikrografij, na katerih bi bila vidna adekvatna slika vzorca. VEM, ki smo ga uporabljali, je imel enoto za napajanje zlata na zamrznjen preparat. S to enoto nismo uspeli izdelati takšne prevleke na preparatu, da med pregledom z krio-VEM ne bi prihajalo do motečih nabijanj. Mikrografij nismo izdelali.

4.2 MIKROGRAFIJE

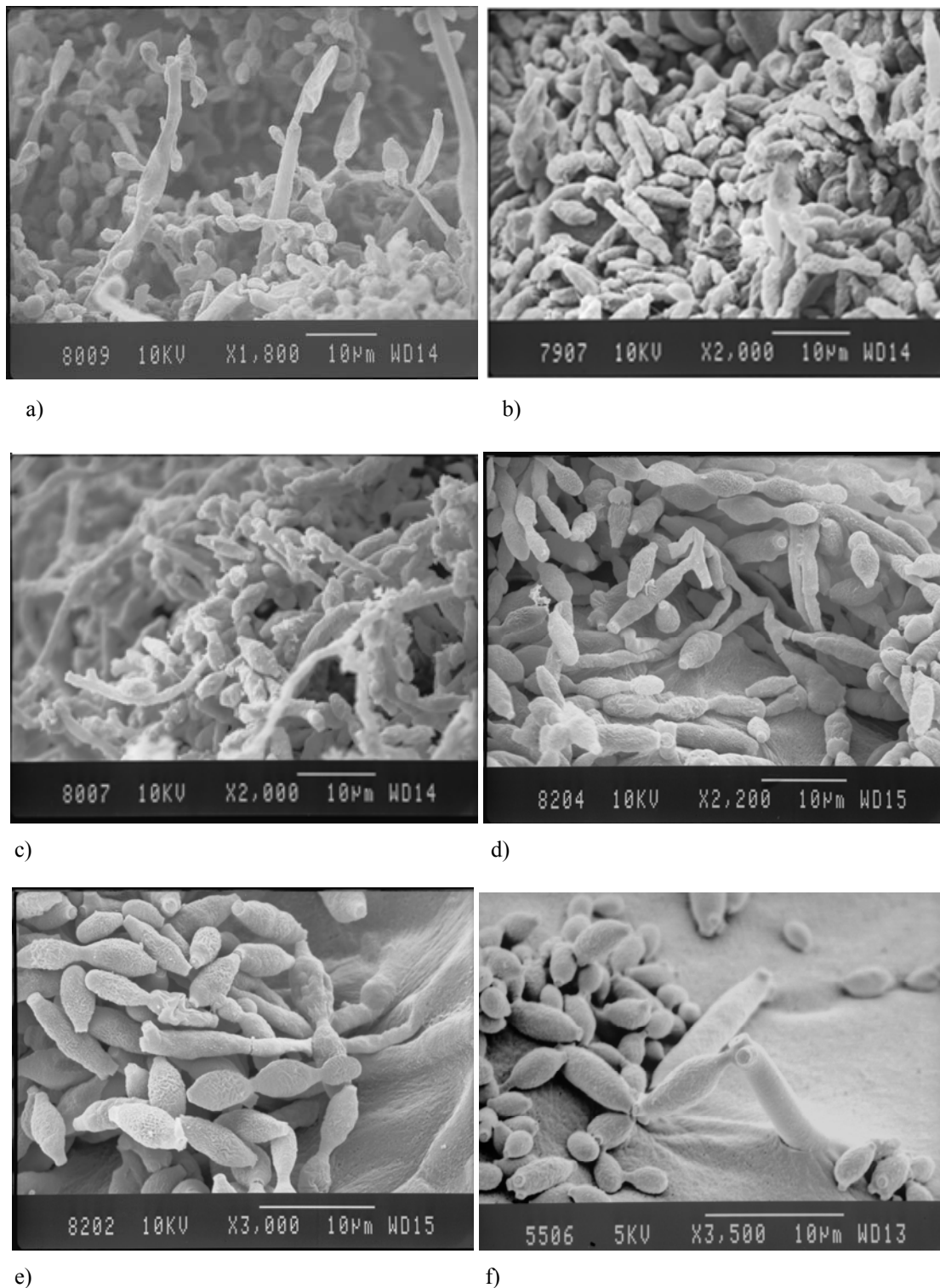
4.2.1 Kemijska fiksacija in sušenje pri kritični točki

Pri nekaterih poskusih je prišlo do kontaminacije vzorcev. Detektirali smo: nečistoče, bakterije in glive.



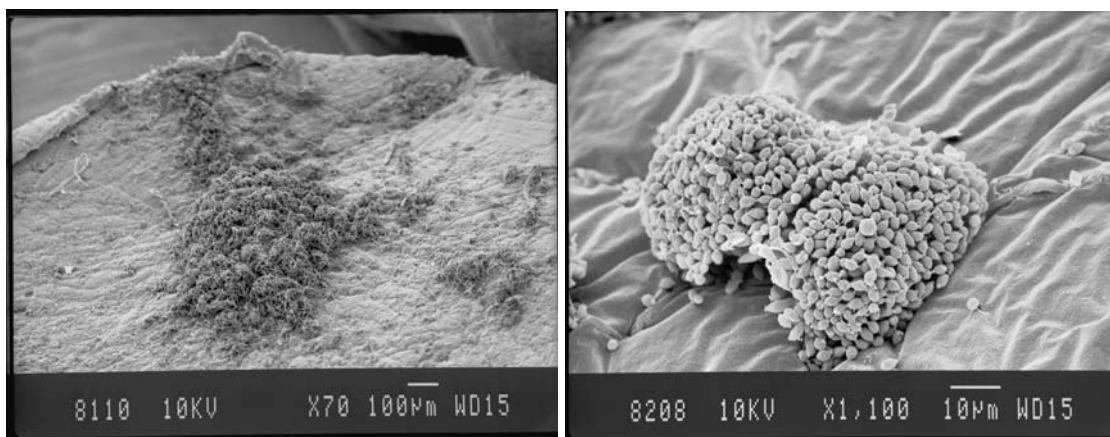
Slika 9: Kontaminacije z nečistočami, bakterijami in glivami: a) kontaminacija vzorca (*Cladosporium dominicanum* EXF-732; okrogli konidiji s skoraj gladko površino) z neznano glivo; b) nečistoče na vzorcu *Cladosporium salinae* EXF-335; c) paličaste bakterije in nečistoče na vzorcu *Cladosporium velox* EXF-2522; d) nečistoče na vzorcu *Cladosporium dominicanum* EXF-732.

Pri nekaterih poskusih cevke vzorca niso zaščitile v zadovoljivi meri. Na mikrografijah (slika 10) so vidne očitne spremembe naravnega stanja vzorcev.



Slika 10: Spremenjeno naravno stanje vzorcev: a) *Cladosporium velox* EXF-2522; b), c), d), e) *Cladosporium salinae* EXF-335; f) *Cladosporium fusiforme*, EXF-449

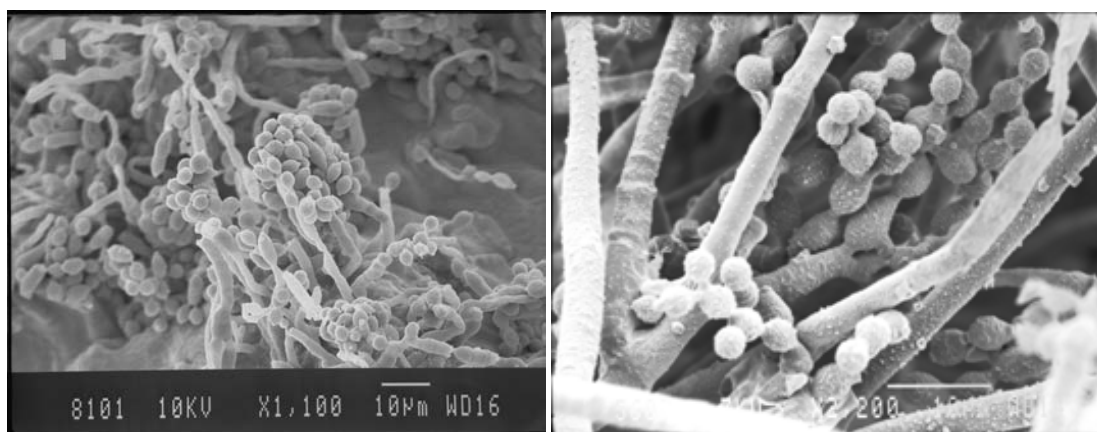
Pri večini poskusov so cevke zaščitile občutljive glivne strukture (slike 11, 12).



a)

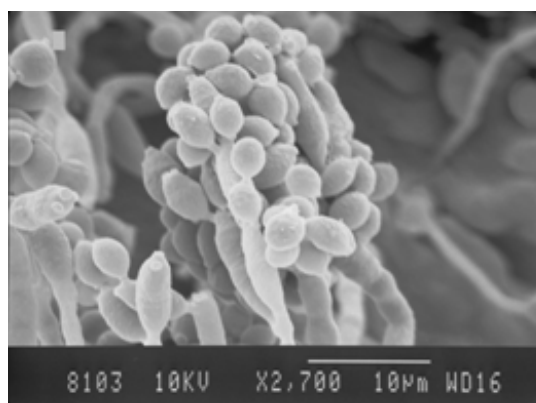
b)

Slika 11: Površina kolonije po odtisu. a) *Cladosporium dominicanum* EXF-732, b) *Cladosporium velox* EXF-2522.



a)

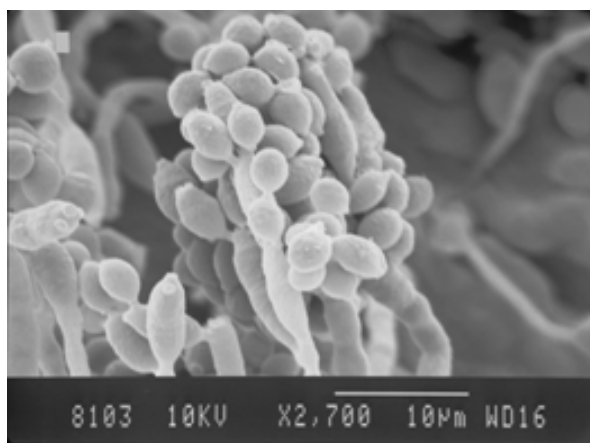
b)



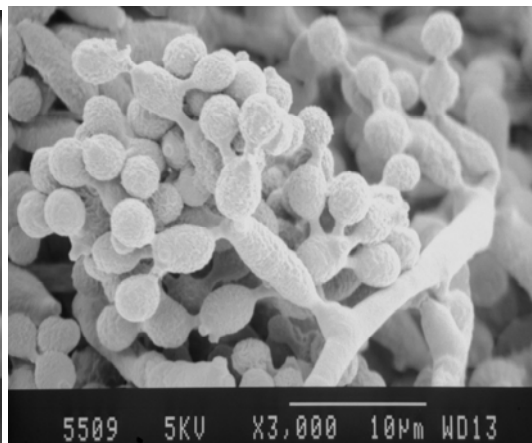
c)

Slika 12: Ohranjene strukture zračnega micelija: a), c) *Cladosporium dominicanum* EXF-732, b) *Cladosporium langeronii* EXF-1000.

Izdelali smo mikrofografije (slike 13, 14, 15, 16), na katerih so vidne glavne značilnosti gliv rodu *Cladosporium*:



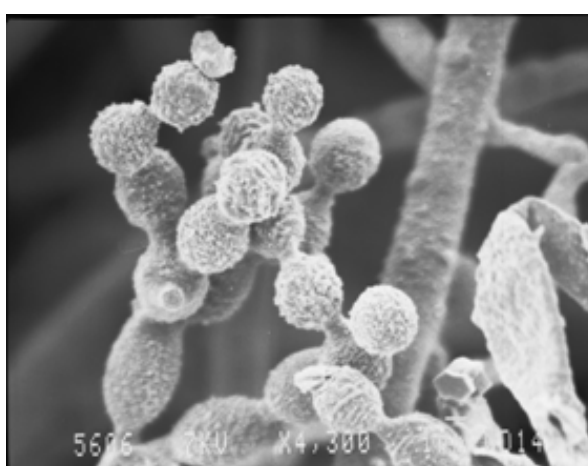
a)



b)

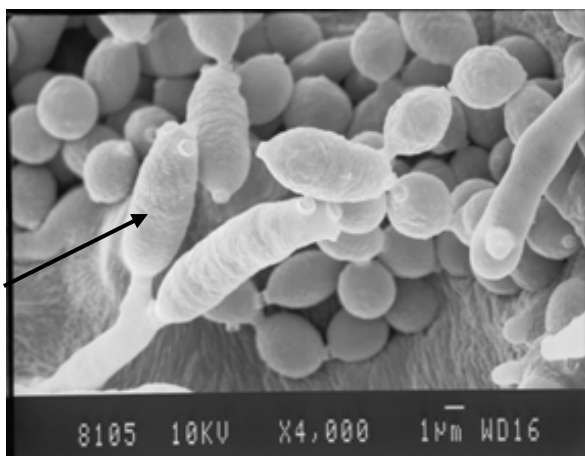


c)

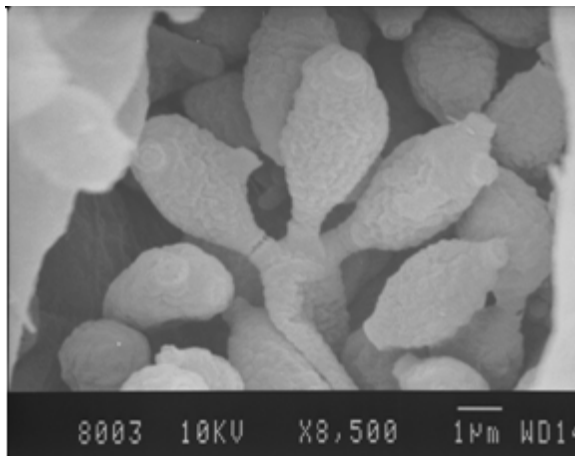


d)

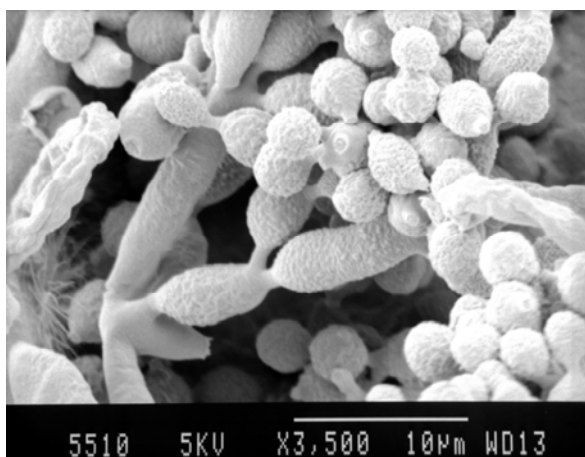
Slika 13: Akropetalno nastale verižice konidijev. a) *Cladosporium dominicanum* EXF-732, b) *Cladosporium sphaerospermum* EXF-997, c) *Cladosporium langeronii* EXF-1000, d) *Cladosporium dominicanum* EXF-732.



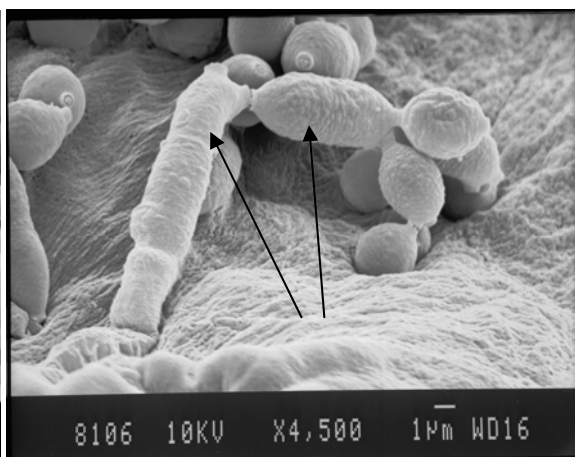
a)



b)

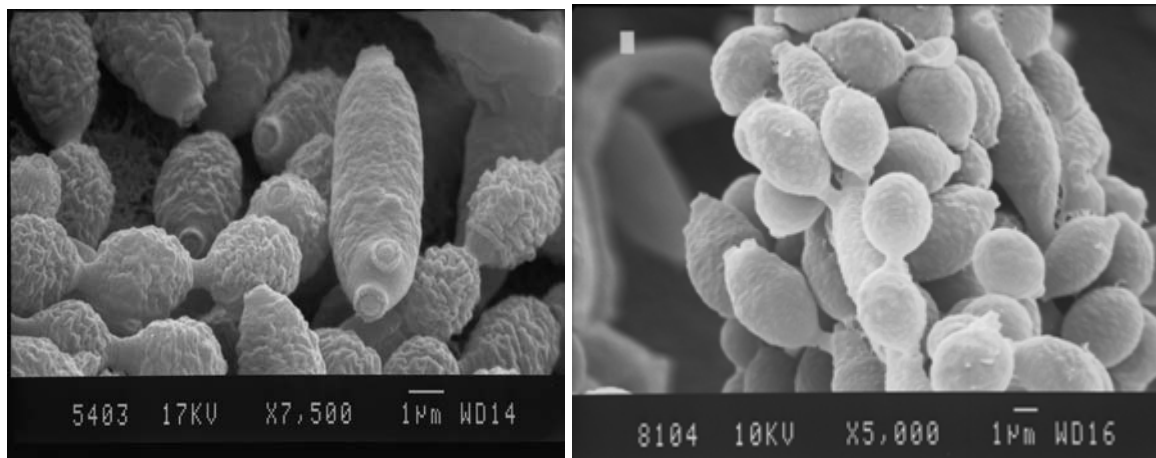


c)



d)

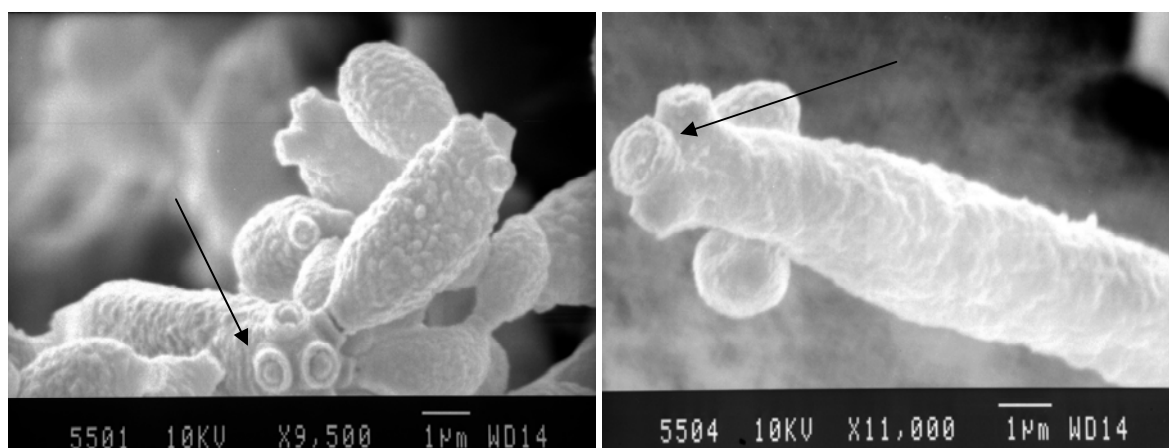
Slika 14: Ramokonidiji. a), d) *Cladosporium dominicanum* EXF-732; b) *Cladosporium velox* EXF-2522; c) *Cladosporium sphaerospermum* EXF-997.



a)

b)

Slika 15: Različna površina konidijev. a) *Cladosporium halotolerans* EXF-572, b) *Cladosporium dominicanum* EXF-732.

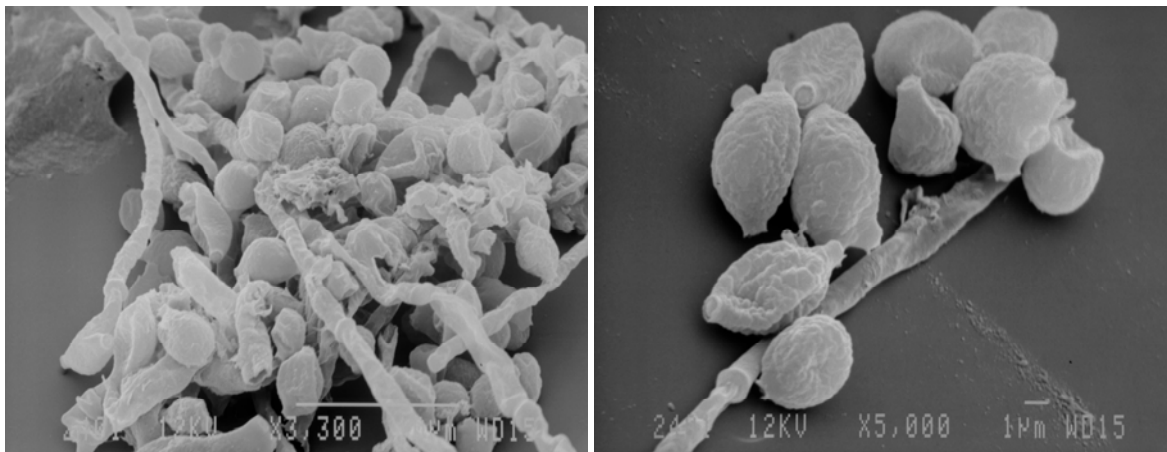


a)

b)

Slika 16: Venčasta brazgotina značilna za rod *Cladosporium*. a), b): *Cladosporium fusiforme*, EXF-449.

4.2.2 Sušenje s HMDS



a)

b)

Slika 17: Kolabirane hife in konidiji. a), b): *Cladosporium sphaerospermum* EXF-328.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Cilj priprave bioloških vzorcev za pregled z VEM je slika, ki čimbolj odraža naravno stanje opazovanega objekta. Zaradi narave bioloških vzorcev je potrebno vzorce pripraviti na specifičen način. Temeljne zahteve za pregled preparata z VEM:

- preparat mora biti obstojen v vakuumu
- preparat mora biti obstojen v snopu elektronov
- zadostna emisija sekundarnih elektronov
- odsotnost motečih nabijanj
- čistost preiskovane površine

Metode za pripravo bioloških vzorcev za pregled z VEM so znane in v osnovi dajejo uporabne rezultate. Kot osrednjo metodo pri naših poskusih smo izbrali kemijsko fiksacijo s sušenjem pri kritični točki. To je konvencionalna metoda priprave različnih bioloških vzorcev za ogled z VEM (Watson in sod., 1980).

Vsako metodo, ki jo izberemo za pripravo vzorcev, je potrebno prilagoditi vrsti vzorca. Naš glavni cilj priprave vzorcev je bil izdelati mikrofografije, na katerih bodo vidne značilnosti, ki so v pomoč pri identifikaciji nitastih gliv. Pri rodu *Cladosporium* so:

- razvejanost konidioforov
- velikost in strukturiranost površine konidijev
- brazgotina na konidiogenem lokusu in konidiju (David, 1997).

Tekom priprave vzorcev nitastih halofilnih gliv se občutljive strukture na površini kolonije zlahka poškodujejo. Do sprememb naravnega stanja vzorca lahko pride že med vzorčenjem. Občutljive strukture se poškodujejo ob stiku površine kolonije s steklovino. Med menjavo kemikalij nastajajo močni tokovi, ki spremenijo površino. Zato smo vzorce zaščitili s komercialnimi nosilci iz sintranega stekla. Nosilci iz sintranega stekla

zagotovljajo kapilarni prehod tekočin skozi steklo, zato do močnih tokov med zamenjavo kemikalij ne prihaja. V vseh poskusih je prišlo do močnega krčenja preparata po sušenju pri kritični točki. Vzrokov, zaradi katerih je bila serija poskusov neuspešna nismo odkrili, zato v nadaljnjih poskusih tovrstnih nosilcev nismo več uporabljali. Namesto komercialnih nosilcev smo izdelali plastične cevke, ki do sedaj še niso bile uporabljene za namen priprave vzorcev in zato predstavljajo pomembno inovacijo pri pripravi glivnih vzorcev. Površino kolonij so ščitile tako med vzorčenjem kot med nadaljno pripravo. Glavna prednost cevk v primerjavi z nosilci iz sintranega stekla je preprosto vzorčenje. Z enostavnim odtisom trdnega gojišča je vzorec že nameščen v nosilcu. S tem zmanjšamo verjetnost morebitnih sprememb površine kolonije med vzorčenjem. Cevke so prozorne, zato lahko med pripravo opazujemo vzorec in zaznamo morebitne spremembe na vzorcu (krčenje med dehidracijo, poškodbe občutljivih glivnih struktur zaradi stika opazovane površine vzorca z nosilcem). Cevke so pri večini poskusov zaščitile vzorce in izdelali smo uporabne mikrofije.

Naš drugi cilj je bil modificirati konvencionalno metodo tako, da bi z manjšo uporabo kemikalij in s krajšim postopkom priprave dobili enako kvalitetne in uporabne mikrofije kot z nemodificirano metodo. Postopki priprave različnih vzorcev nitastih gliv s kemijsko fiksacijo in sušenjem pri kritični točki, ki jih danes navaja literatura (Dugan, 2008; Lopes in sod., 2007; de Melon in Faul, 2004; Driessen in sod., 2005; Sarmiento in sod., 2006) se med seboj bistveno ne razlikujejo. Večinoma se uporabljajo metode, ki so znane dolgo časa in ustrezajo pripravi širokega spektra bioloških vzorcev (Watson in sod., 1980). Razlike med metodami so: uporaba fiksativov z različno osmolarnostjo in sestavo, različni pufri za spiranje ter različni časi fiksacije, spiranja in dehidracije.

Pri fiksaciji smo od vseh pregledanih metod uporabljali najnižje osmolarnosti fiksativov in najkrajši čas fiksacije. Za razliko od večine nismo fiksirali s sekundarnim fiksativom OsO_4 , saj smo predvidevali, da zaradi nizke vsebnosti lipidov v zunanjih strukturah nitastih gliv potrebe po sekundarni fiksaciji z OsO_4 ni. Dehidracijo smo zaključili z absolutnim etanolom, čeprav večina literature navaja zamenjavo etanola z različnimi mediji (aceton, amil acetat). Kvaliteta mikrofij, ki smo jih izdelali, je primerljiva s tistimi iz literature.

Po seriji poskusov smo ugotovili, da ponovljivost naše metode ni idealna. V pregledani literaturi o ponovljivosti podobnih metod nismo našli podatkov. Zaradi slabše ponovljivosti se za izdelavo uporabnih mikrografij poveča čas (ponovna priprava gojišč in gojenje kulture, večje število opravljenih poskusov) v katerem želimo izdelati mikrografijo izbranega vzorca. Pri neuspešni pripravi preparatov je do poškodb (močno zmanjšan volumen preparata) prihajalo med ali po sušenju pri kritični točki.

V primerjavi z biološkimi vzorci (živalske celice) pri katerih plazmalemo podpira citoskelet, vzorcem kot so glive, bakterije in rastline, podpre plazmalemo ali celično steno turgor. Slednji vzorci ob osmotskih stresih hitreje kolapsirajo (Kamiskyj in Dahms, 2007). Mogoče so v primerjavi z nekaterimi biološkimi vzorci halofilne nitaste glive bolj občutljive na razmere, ki vladajo med sušenjem. Vzrok temu bi lahko bilo dejstvo, da zaradi rasti v izjemno slanih okoljih vzdržujejo turgor s pomočjo kompatibilnih topljencev (Roberts, 2005).

Priprava preparata z metodo s sušenjem pri kritični točki za ogled z VEM zahteva določen čas. Najprej pripravimo kulture na ploščah. Nato pripravimo nosilce. Sledi vzorčenje, fiksacija, spiranje in dehidracija, kar traja vsaj 4 ure. Sledi sušenje pri kritični točki preko noči in prekrivanje z zlatom. Da dobimo suh, z zlatom prevlečen preparat torej potrebujemo 24 ur. Tako dobimo vzorec, ki je v eksikatorju dalj časa obstojen. Tudi podroben pregled preparata z VEM zahteva določen čas. Z našo metodo smo izdelali mikrografije, na katerih so vidne nepoškodovane strukture nespolnega razmnoževanja in slike so lahko v pomoč pri identifikaciji ter klasifikaciji nitastih gliv.

S prilagojeno metodo kemijske fiksacije s sušenjem pri kritični točki smo izdelali mikrografije, na katerih so vidne nepoškodovane strukture nespolnega razmnoževanja in slike so lahko v pomoč pri identifikaciji ter klasifikaciji nitastih gliv.

Kot alternativo kemijski fiksaciji smo vzorce pripravili za kriomikroskopijo. S tem načinom priprave dobimo preparate, ki po pravilu najboljše odražajo naravno stanje glive v kulturi, saj zamrznemo živo, predhodno nefiksirano glivo (Kamiskyj in Dahms, 2007). Metode, s katero smo pripravljali vzorce za krio-VEM, nismo poskušali optimizirati, saj

smo imeli zaradi specifikacij razpoložljive opreme tehnične težave pri pripravi vzorcev in mikroskopiranju preparatov.

Priprava VEM za kriomikroskopijo sicer zahteva nekaj časa, vendar je izvedba metode bistveno krajša od kemijske fiksacije s sušenjem pri kritični točki. Za vzorčenje, pripravo na zamrzovanje in zamrzovanje porabimo manj kot 10 minut. Naslednjih 10 minut traja nanos zlata in preparat je pripravljen za ogled z VEM. S pripravo vzorcev za krio-VEM smo uspeli mikroskopirati preparat. Na zaslonu smo videli nepoškodovane strukture micelija, zraslega na tekočem gojišču. Zaradi specifikacij mikroskopa in narave vzorca je bila prevleka iz težke kovine nezadovoljiva in mikrografij nismo izdelali.

5.2 SKLEPI

Za ogled vzorcev nitastih gliv z VEM se danes večinoma uporabljajo metode, s katerimi vzorce pripravimo za krio-VEM. Metode, s katero smo pripravljali vzorce za krio-VEM, nismo poskušali optimizirati, saj smo imeli zaradi specifikacij razpoložljive opreme tehnične težave pri pripravi vzorcev in mikroskopiranju preparatov.

Konvencionalno metodo (kemijska fiksacija s sušenjem pri kritični točki) za pripravo bioloških vzorcev za VEM smo prilagodili tako, da smo izdelali uporabne mikrografije preparatov nitastih gliv:

- uporabili smo gojišče SNA, na katerem tvorijo glive redkejša micelijske strukture
- izdelali smo cevke, ki so zaščitile glivne strukture na površini trdnega gojišča
- zmanjšali smo uporabo kemikalij in skrajšali čas priprave

Tako prilagojena metoda je obvladljiva in lahko jo priporočimo za rutinsko uporabo.

6 POVZETEK

Ekstremofilni organizmi so v zadnjih letih postali zanimiv objekt raziskovanja. Rezultati raziskav dopolnjujejo znanje na številnih področjih. Danes je poznavanje ekosistemov v katerih živijo tovrstni organizmi mnogo boljše ko pred desetletjem. Filogenetske raziskave so dopolnile univerzalno drevo življenja. Številne prilagoditve, ki so jih ekstremofilni mikroorganizmi razvili zaradi življenja v izjemnih pogojih, so za biotehnologijo velika priložnost in hkrati tudi izziv.

Halofilni mikroorganizmi so sposobni rasti v izjemno slanih okoljih. Izjemno slana okolja na Zemlji so raznolika. Večina jih je nastala z izhlapevanjem morske ali sladkovodne vode. Vzroki za nastanek takih okolij so lahko tudi drugi in poznamo globokomorske slanice, slanice na Antarktiki, ostanke starodavnih kontinentalnih slanih jezer. Velikost tovrstnih okolij se danes povečuje zaradi klimatskih sprememb in posegov človeka v naravo.

Halofilne nitaste glive so del mikrobnih združb, ki naseljujejo izjemno slana okolja. Proučevati so jih začeli šele v zadnjem desetletju. Eden najštevilčnejših predstavnikov nitastih gliv v izjemno slanih okoljih je rod *Cladosporium*. Je ubikvitaren in raznolik, saj obsega vsaj 772 vrst. Številne vrste najdemo v okoljih s skrajnostnimi pogoji (nizke temperature, različna koncentracija soli in sladkorjev), zato ga označujemo kot evritolerantnega.

VEM uporabljamo za opazovanje površine vzorcev. Za pregled bioloških vzorcev z vrstičnim elektronskim mikroskopom (VEM) je potrebno uporabiti specifične metode priprave. Z njimi vzorce obdelamo tako, da so preparati obstojni v pogojih med opazovanjem z VEM. Ključno pri pripravi je, da preparati kljubujejo vakuumu in snopu elektronov, pri tem pa ohranijo obliko, ki daje adekvatno sliko naravnega stanja. Ker je to zaradi lastnosti bioloških vzorcev težko, pri pripravi skoraj vedno prihaja do nezaželenih sprememb. Le te zakrijejo ali popačijo naravno stanje vzorcev. Cilj priprave preparata je t.i. ekvivalentna slika, ki mora čimbolj odražati naravno stanje. Izpolnitev tega cilja je v največji meri odvisna od načina priprave. Načini priprave so danes dobro poznani. Razlikujejo se glede na opazovani objekt, pogoje gojenja, elektronski mikroskop, in drugo.

Pri našem delu smo uporabljali različne načine priprave (kemijska fiksacija s sušenjem pri kritični točki, kemijska fiksacija s sušenjem s HMDS, fizikalna fiksacija za krio-VEM). Kot najbolj uporabna se je izkazala priprava vzorcev s kemijsko fiksacijo in sušenjem pri kritični točki. Metodo smo optimizirali in izdelali mikrografije, ki so lahko v pomoč pri taksonomski analizi gliv rodu *Cladosporium*. Metoda je obvladljiva in lahko jo priporočimo za rutinsko uporabo.

7 VIRI

Atkins P.W. 1980. Physical chemistry. 4th ed. New York, W. H. Freeman and Company: 975 str.

Boyde A. 1978. Pros and cons of critical point drying and freeze drying. V: Preparation of biological specimens for scanning electron microscopy. Murphy J.A, Romans G.M. (eds.). O' Hare, Scanning Electron Microscopy, Inc.: 303-314.

Braun U., Craus P.W., Dugan F., Groenwald J.Z., De Hoog S. 2003. Phylogeny and taxonomy of *Cladosporium*-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen., the teleomorph of *Cladosporium* s. Str. Mycological Progres, 2,1: 3-18.

Bray D.F., Bagu J., Koegler P. 1989. Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II, and critical-point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimens. Microscopy Research and Technique, 26,6:489-495.

Clements F.E., Shear C.L. 1931. The genera of fungi. New York, H. W. Wilson: 496 str.
Cit. po: David J.C. 1997. A contribution to the systematics of *Cladosporium*. Revision of the fungi previously referred to *Heterosporium*. Mycological Papers, 172: 1-157.

Cohen A.L. 1979. Critical point drying – Principles and procedures. V: Preparation of biological specimens for scanning electron microscopy. Murphy J.A, Romans G.M. (eds.). O' Hare, Scanning Electron Microscopy, Inc.: 303-323.

Crous P.W. Braun U., Schubert K., Groenewald J.Z. 2007. The genus *Cladosporium* and similar dematiaceous hyphomycetes V: Studies in mycology. Utrecht, Utrecht CBS Fungal Biodiversity Centre: 245 str.

Crous P.W. Braun U., Schubert K., Groenewald J.Z. 2007. Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. Studies in Mycology, 58: 33-56.

David J.C. 1997. A contribution to the systematics of *Cladosporium*. Revision of the fungi previously referred to *Heterosporium*. Mycological Papers, 172: 1-157.

De Melo I.S., Faull J.L. 2004. Scanning electron microscopy of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a biocontrol agent of witches broom disease of cocoa. Brazilian Journal of Microbiology, 35:330-332.

De Vries G.A. 1952. Contribution to the knowledge of the genus *Cladosporium* Link ex. Fr. Baarn, Centralbureau voor Schimmelcultures: 121 str. Cit. po: David J.C. 1997. A contribution to the systematics of *Cladosporium*. Revision of the fungi previously referred to *Heterosporium*. Mycological Papers, 172: 1-157.

Driessen S.A., O'Brien P.A., Hardy G.E St J. 2005. Morphology of the rust fungus *Puccinia boroniae* revisited. Mycologia, 97, 6:1330-1334.

Dugan F.M., Braun U., Groenewald J.Z., Crous P.W. 2008. Morphological plasticity in *Cladosporium sphaerospermum*. Personia, 21:9-16.

Echlin P. 1978. Coating techniques for scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. V: Preparation of biological specimens for scanning electron microscopy. Murphy J.A, Romans G.M. (eds.). O' Hare, Scanning Electron Microscopy, Inc.: 109-132.

Goodhew P.J., Humhreys J. 1988. Electron microscopy and analysis. 2nd ed. New York, Taylor & Francis: 225 str.

Green F., Larsen M., Highley T. 1990. Ultrastructural morphology of the hyphal sheath of wood decay fungi modified by preparation for scanning electron microscopy. Biodeterioration Research, 3: 331-325.

Ho W.H., Goh T.K., Hyde K.D. 1998. Studies of conidial anatomy and conidiogenesis in *Sporoschisma nigroseptatum* using light and electron microscopy. Canadian Journal of Botany, 76, 9: 1614-1623.

Hohmann S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 2: 300-72.

Hughes S.J. 1958. Revisiones hyphomycetum aliquot appendice de nominibus rejiciendis. *Canadian Journal of Botany*, 36:727-836. Cit. po: David J.C. 1997. A contribution to the systematics of *Cladosporium*. Revision of the fungi previously referred to *Heterosporium*. *Mycological Papers*, 172: 1-157.

Javaux E.J. 2006. Extreme life on earth—past, present and possibly beyond. *Research in Microbiology*, 157: 37-48.

Kaminskyj S. G.W., Dahms T. E.S. 2008. High spatial resolution surface imaging and analysis of fungal cells using SEM and AFM . *Micron*, 39, 4: 349-361.

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, 12: 4261-4273.

Link H.F. 1816. Observationes in ordines plantarum naturales. Dissertatio II, sistens nuperas de Mucedinum et Gastromycorum ordinibus observationes. *Der Gesellschaft naturforschender Freunde zu Berlin Magazin für die neuesten Entdeckungen in der gesammten Naturkunde* 7: 25–45. Cit. po: David J.C. 1997. A contribution to the systematics of *Cladosporium*. Revision of the fungi previously referred to *Heterosporium*. *Mycological Papers*, 172: 1-157.

Lopes L.C.L., Rocha M.G., Pinto R.M., Bittencourt C.V., Mourao-Sa D., Weismüller G. BarretoBergter E., Souto-Padron T. 2007. *Aspergillus fumigatus*: influence of different culture media on the ultrastructure of conidial outer cells wall. *Acta Microscopica*, 16:1-2.

Margesin R., Schinner F. 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5: 73-83.

Maugel T.K., Bonar D.B., Creegan W.J., Small E.B. 1980. Specimen preparation techniques for aquatic organisms. V: Preparation of biological specimens for scanning electron microscopy. Murphy J.A, Romans G.M. (eds.). O' Hare, Scanning Electron Microscopy, Inc.: 57-77.

Oren A. 2002. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 28: 56-63.

Persoon C.H. 1794. Neuer versuch einer systematischen entheilung der schwämme. Neues Magazin Für Die Botanik, 1: 63-128. Cit. po: David J.C. 1997. A contribution to the systematics of *Cladosporium*. Revision of the fungi previously referred to *Heterosporium*. Mycological Papers, 172: 1-157.

Prasil K., de Hoog G.S. 1988. Variability in *Cladosporium herbarum*. Transactions of the British Mycological Society, 90: 49-54.

Citirano po: David J.C. 1997. A contribution to the systematics of *Cladosporium*. Revision of the fungi previously referred to *Heterosporium*. Mycological papers, 172: 1-157.

Roberts F.M. 2005. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. Saline Systems, 1:5-5.

Sarmiento P.L., Ciarmela M.L., Thevenet P.S., Minvielle M.C., Basualdo J.A. 2006. Comparison of preparation techniques of mixed samples (fungi–helminth eggs) for scanning electron microscopy by critical point drying. Parasitology Research, 99: 455–458.

Turk M., Mejanelle L., Šentjerc 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.

Waterman R. 1980. Preparation of embryonic tissues for SEM. V: Preparation of biological specimens for scanning electron microscopy. Murphy J.A, Romans G.M. (eds.). O' Hare, Scanning Electron Microscopy, Inc.: 21-44.

Watson L.P., McKee A.E., Merrell B. R. 1980. Preparation of microbiological specimens for scanning electron microscopy. V: Preparation of biological specimens for scanning electron microscopy. Murphy J.A, Romans G.M. (eds.). O' Hare, Scanning Electron Microscopy, Inc.: 45-56.

Zalar P., de Hoog G.S., Schroers H.J., Crous P.W., Groenewald J.Z., Gunde-Cimerman N. 2007. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium shpaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Studies in Mycology*, 58: 157-183.

Zalar P., Gunde-Cimerman N. 2002. Taksonomija in identifikacija gliv. Ljubljana, Študentska založba 92 str.

ZAHVALA