

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Klara MAUČEC

**VPLIV SLANOSTI OKOLJA NA STRUKTURO IN MORFOLOGIJO
CELIČNE STENE GLIVE *Wallemia* s.p.**

DIPLOMSKA NALOGA

**INFLUENCE OF SALINE ENVIRONMENT ON THE MORPHOLOGY OF THE
CELL WALL OF FUNGI *Wallemia* s.p.**

GRADUATION THESIS

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov ter na katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Elektronske mikrografije smo izdelali z elektronskim mikroskopom FEI Quanta 200 3D na Univerzitetnem centru za Elektronsko mikroskopijo v Mariboru ter elektronskim mikroskopom FEI Strata DB 235M na Oddelku za fiziko Univerze Modena e Reggio Emilia, Italija (Universita di Modena).

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Nino Gunde-Cimerman, za somentorico prof. dr. Damjano Drobne, za recenzentko prof. dr. Kristino Sepčič ter za predsednika komisije prof. dr. Davida Stoparja.

Mentorica: prof. dr. Nina Gunde-Cimerman

Somentorica: prof. dr. Damjana Drobne

Recenzentka: prof. dr. Kristina Sepčič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David Stopar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani,
Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Nina Gunde-Cimerman

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Damjana Drobne

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Kristina Sepčič

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Klara Maučec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 579.234 : 579.26: 546.33'131 (043) =163.6
KG morfologija mikroorganizmov/ halofilni mikroorganizmi/ stres/ hiperosmotski stres/ kserofilne glive/ bazidiomicetne glive/ askomicetne glive/ ultrastruktura celične stene/ celične stene/ črne kvasovke/ *Hortaea werneckii*/ rod *Wallemia*/ *Saccharomyces cerevisiae*/ elektronska mikroskopija
AV MAUČEC, Klara
SA GUNDE-CIMERMAN, Nina (mentorica) / DROBNE, Damjana (somentorica) / SEPČIČ, Kristina (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2009
IN VPLIV SLANOSTI OKOLJA NA STRUKTURO IN MORFOLOGIJO CELIČNE STENE GLIVE *Wallemia* s.p.
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 66 str., 9 pregl., 24 sl., 1 pril., 92 vir.
IJ SL
JI sl/en
AI Dolgo je veljalo, da le prokarionti naseljujejo izjemno slana okolja, izsledki nedavnih raziskav pa dokazujejo, da so vode solin tudi habitat halofilnih evkariontov. Glive so razvile različne strategije za premagovanje osmotskega stresa. Med najpomembnejše štejemo akumulacijo nizko molekularnih organskih snovi in kationov, spremembe v sestavi membrane ter prilagoditve na nivoju celične stene. Slednje so bile predmet naše študije. Primerjali smo spremembe v debelini celične stene zaradi hiper osmotskega stresa med halofilnimi in na slanost občutljivimi vrstami gliv. V raziskovalnem projektu smo uporabili kserofilne glive bazidiomicetnega rodu *Wallemia* ter jih primerjali s halofilno askomicetno črno kvasovko *Hortaea werneckii* in mezofilno kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*. Rezultati so pokazali, da je povečanje debeline celične stene lastno le halofilnim mikroorganizmom, ki so visoko prilagojeni na življenje v hiperslanih okoljih, medtem ko se celična stena na slanost neprilagojene vrste *Saccharomyces cerevisiae* stanjša. Najizrazitejšo zadebelitev celične stene pri povišani slanosti smo opazili pri ekstremno halofilni vrsti *Wallemia ichthyophaga*, za katero je značilna specifična rast v sarcinam podobnih strukturah. Najbolj izstopajoča morfološka sprememba ob hiperosmotskem stresu pri glivi *Hortaea werneckii* je reorganizacija pigmenta celične stene, pri *Saccharomyces cerevisiae* pa so invaginacije plazemske membrane, ki so komplementarne izboklinam na notranji strani celične stene. Kateri molekularni in fiziološki procesi sodelujejo pri zadebelitvi celične stene pri halofilnih glivah iz rodu *Wallemia*, ostaja predmet nadaljnjih raziskav.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.234 : 579.26: 546.33'131 (043) =163.6
CX morphology of microorganisms/ halophilic microorganisms /stress/ hyperosmotic stress/ xerophilic fungi/ basidiomycetous fungi/ ascomycetous fungi/ ultrastructure of cell wall / cell walls/ black yeasts/ *Hortaea werneckii* / genus *Wallemia* s.p./ *Saccharomyces cerevisiae*/ electron microscopy
AU MAUČEC, Klara
AA GUNDE-CIMERMAN, Nina (supervisor) / DROBNE, Damjana (co-advisor)/ SEPČIČ, Kristina (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2009
TI INFLUENCE OF SALINE ENVIRONMENT ON THE MORPHOLOGY OF THE CELL WALL OF FUNGI *Wallemia* s.p.
DT Graduation thesis (University studies)
NO XI, 66 p., 9 tab., 24 fig., 1 ann., 92 ref.
LA SI
AL sl/en
AB For a while there was a general belief that the only inhabitants of hypersaline environments were prokaryotic microorganisms. Recently studies have revealed that halophilic eucaryotes are also inhabitants of salterns. Fungi have developed different strategies to counteract salt stress. Most important are accumulation of low molecular weight organic compounds and cations, changes in membrane composition and adaptation on the cell wall level. The latter was the subject of our study. The influence of salinity on cell wall thickness was compared between halophilic and salt-sensitive species. In research project we used xerophilic fungi from basidiomycetous genus *Wallemia* that were compared with halophilic ascomycetous black yeast *Hortaea werneckii* and mesophilic yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The results revealed that increased cell wall thickness is an important feature of halophilic microorganisms that are highly adapted to life in hypersaline environments. However at increased osmolarity of the growth medium the cell wall thickness of salt-sensitive species *Saccharomyces cerevisiae* is reduced. Most significant increase in cell wall thickness at high salinity was observed in extremely halophilic species *Wallemia ichthyophaga*, that grew in multicellular clumps, or sarcina-like structures. The most evident morphological change at hyperosmotic stress in halophilic black yeasts *Hortaea werneckii* was reorganisation of cell wall pigments, while invaginations in plasma membrane that are complementary to bulges formed on the inner surface of the cell wall were observed in *Saccharomyces cerevisiae*. Which molecular and physiological mechanisms are involved in changes of the cell wall thickness of halophilic fungi *Wallemia* spp. stays the matter of additional research.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGELDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	2
1.2 CILJ	2
1.3 DELOVNA HIPOTEZA	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 SLANA OKOLJA IN ŽIVLJENJE V NJEM	4
2.1.1 Hiperzlana okolja	4
2.1.2 Temeljni pojmi: kserofilnost, halofilnost in halotoleranca	5
2.2 HALOFILNI MIKROORGANIZMI	6
2.2.1 Fiziološke in morfološke prilagoditve na slano okolje	6
2.2.1.1 Spremembe v sestavi membrane zaradi povišane slanosti okolja	7
2.2.1.2 Izločanje izvenceličnih glikoproteinov zaradi povišane slanosti okolja	8
2.2.1.3 Akumulacija kompatibilnih topljencev zaradi povišane slanosti okolja	8
2.2.1.4 Signalne poti osmotskega stresa pri glivah	9
2.2.2 Biotehnološki pomen halofilnih gliv	10
2.3 FILOGENTSKI, MORFOLOŠKI IN EKOLOŠKI OPIS RODOV IN VRST, VKLJUČENIH V RAZISKAVO	11
2.3.1 Rod <i>Wallemia</i>	11
2.3.1.1 Filogenetska uvrstitev rodu <i>Wallemia</i>	12
2.3.1.2 Morfologija in ekologija rodu <i>Wallemia</i>	13
2.3.2 Vrsta <i>Hortaea werneckii</i>	14
2.3.2.1 Morfološke značilnosti vrste <i>Hortaea werneckii</i>	14
2.3.2.2 Življenjski cikel vrste <i>Hortaea werneckii</i>	14
2.3.2.3 Ekologija vrste <i>Hortaea werneckii</i>	15
2.3.3 Vrsta <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
2.3.3.1 Življenjski krog <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
2.3.3.2 Ekologija vrste <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16

2.4	ZGRADBA EVKARIONTSKE CELIČNE STENE	17
2.4.1	Komponente celične stene.....	17
2.4.1.1	Zgradba in organizacija celične stene filamentoznih gliv	19
2.4.1.2	Zgradba in organizacija celične stene pri kvasovkah.....	20
2.4.2	Delovanje in vloge celične stene	21
2.4.3	Vpliv slanosti na strukturo celične stene.....	21
2.4.3.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
2.4.3.2	<i>Hortaea werneckii</i>	22
3	MATERIAL IN METODE.....	23
3.1	SEVI IN RASTNI POGOJI	23
3.2	METODE	24
3.2.1	Priprava histoloških preparatov za presevno elektronsko mikroskopijo (TEM) mikroorganizmov	24
3.2.2	Priprava histoloških preparatov za vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM) mikroorganizmov	25
3.3	MATERIALI.....	26
3.3.1	Kemikalije in reagenti.....	26
3.3.2	Gojišča, raztopine in pufri.....	27
3.3.3	Laboratorijski pribor, naprave in drugi pripomočki.....	29
4	REZULTATI.....	32
4.1	MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI IN ULTRASTRUKTURA CELIČNE STENE GLIVE <i>Wallemia</i> spp.	32
4.1.1	Makroskopski opis kulture.....	32
4.1.2	Morfološke značilnosti in ultrastruktura celične stene pri vrstah <i>Wallemia sebi</i> in <i>Wallemia muriae</i>	33
4.1.3	Morfološke značilnosti in ultrastruktura celične stene pri vrsti <i>Wallemia ichthyophaga</i>	36
4.2	MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI IN ULTRASTRUKTURA CELIČNE STENE GLIVE <i>Hortaea werneckii</i>	40
4.2.1	Makroskopski opis kulture.....	40
4.2.2	Morfologija in ultrastruktura celične stene pri vrsti <i>Hortaea werneckii</i>	40
4.3	MORFOLOGIJA IN ULTRASTRUKTURA CELIČNE STENE PIVSKE KVASOVKE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
5.	RAZPRAVA IN SKLEPI	48
4.1	RAZPRAVA	48
4.2	SKLEPI	54

5	POVZETEK.....	55
----------	----------------------	-----------

6	VIRI.....	58
----------	------------------	-----------

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Poglavitni polimeri prisotni v celičnih stenah pri različnih taksonomskih skupinah gliv, skupaj s perforiranimi septami (Kavanagh, 2005: 6).....	20
Preglednica 2: Označe sefov, okolje ter država izolacije sefov iz mikrobiološke zbirke, uporabljene za diplomsko delo.....	23
Preglednica 3: Optimalne ter maksimalne slanosti za rast posameznih vrst gliv.....	24
Preglednica 4: Postopek infiltracije in polimerizacije dehidriranih vzorcev:.....	25
Preglednica 5: Seznam uporabljenih kemikalij s proizvajalcem in državo porekla.....	26
Preglednica 6: Ustrezna količina NaCl v 1000 ml gojišča glede na zeleno slanost gojišča.....	27
Preglednica 7: Laboratorijske naprave in drugi pripomočki.....	30
Preglednica 8: Makroskopski opis kolonij iz rodu <i>Wallemia</i> na trdnem YNB gojišču pri nizki in visoki koncentraciji NaCl.....	32
Preglednica 9: Morfološke lastnosti kolonij vrst <i>Wallemia sebi</i> , <i>Wallemia muriae</i> , <i>Wallemia ichthyophaga</i> , gojenih v tekočem YNB gojišču.....	39

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz HOG signalne poti, kot adaptacije na hiperslana okolja pri halofilni glivi <i>Hortaea werneckii</i> (Plemenitaš in sod., 2008: 72).....	10
Slika 2: Filogenetsko drevo debela Basidiomycota sestavljeno na podlagi analiz SSU rDNK (Zalar in sod., 2005a: 316).....	12
Slika 3: Shematski prikaz celične stene gliv (Grün, 2003: 11).....	18
Slika 4: Kompakten micelijski pelet glive <i>Wallemia sebi</i> pri 5 % NaCl, vrstična elektronska mikrografija.....	33
Slika 5: Vpliv koncentracije NaCl na morfologijo hif pri glivi <i>Wallemia sebi</i> ; 5 % NaCl (A), 20 % NaCl (B); svetlobni mikroskop.....	34
Slika 6: Površina hif glive <i>Wallemia muriae</i> pri 20 % NaCl (A) in glive <i>Wallemia sebi</i> pri 5 % NaCl (B); vrstična elektronska mikrografija.....	34
Slika 7: Pigmentacija in debelina celične stene pri glivi <i>Wallemia sebi</i> pri 5 % NaCl (A) in 20 % NaCl (B); presečna elektronska mikrografija.....	35
Slika 8: Invaginacije plazemske membrane in vsebnost vakuol pri glivi <i>Wallemia muriae</i> pri 5 % NaCl (A) in 20 % NaCl (B); presečna elektronska mikrografija.....	35
Slika 9: Ekstracelularni polimeri, ki prekrivajo zunanji sloj celične stene pri glivi <i>Wallemia sebi</i> 5 % NaCl (A) in 20 % NaCl (B); presečna elektronska mikrografija.....	36
Slika 10: Nitasta rast glive <i>Wallemia muriae</i> , 20 % NaCl (A) in rast v večceličnih skupkih glive <i>Wallemia ichthyophaga</i> , 25 % NaCl (B); vrstična elektronska mikrografija.....	37
Slika 11: Vpliv slanosti na površino večceličnih skupkov pri glivi <i>Wallemia ichthyophaga</i> 15 % NaCl (A) in 25 % NaCl (B); vrstična elektronska mikrografija.....	37
Slika 12: Vpliv koncentracije NaCl na debelino celične stene pri glivi <i>Wallemia ichthyophaga</i> 15 % NaCl (A), 25 % NaCl (B); presečna elektronska mikrografija.....	38
Slika 13: Strukturirana celična stena glive <i>Wallemia ichthyophaga</i> 25 % NaCl (A,B); presečna elektronska mikrografija.....	39
Slika 14: Gliva <i>Hortaea werneckii</i> v gojišču z 10 % NaCl (A) in 20 % NaCl (B).....	41
Slika 15: Debelina celične stene glive <i>Hortaea werneckii</i> , pri 10 % NaCl (A) in 20 % NaCl (B); presečna elektronska mikrografija.....	41
Slika 16: Organiziranost melaninskih granul in EPS v celični steni glive <i>Hortaea werneckii</i> pri 10 % NaCl (A) in 20 % NaCl (B); presečna elektronska mikrografija.....	42
Slika 17: Prečni septum pri glivi <i>Hortaea werneckii</i> pri 10 % NaCl (a) in 20 % NaCl (b); presečna elektronska mikrografija.....	43
Slika 18: Invaginacije plazemske membrane glive <i>Hortaea werneckii</i> pri 10 % NaCl (a) in 20 % NaCl (B); presečna elektronska mikrografija.....	43
Slika 19: Površina glive <i>Hortaea werneckii</i> , ki je rastla na gojišču brez soli; vrstična elektronska mikrografija.....	44
Slika 20: Debelina celične stene kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pri 0 % NaCl (A) in 5 % NaCl (B); presečna elektronska mikrografija.....	45
Slika 21: Globoke invaginacije plazemske membrane so vidne pri kvasovki <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v gojišču s 5 % NaCl; presečna elektronska mikrografija.....	45
Slika 22: Brazgotina, ki ostane na površini celične stene kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v gojišču brez soli po končanem brstenju; presečna elektronska mikrografija.....	46
Slika 23: Vakuole kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v gojišču brez soli (A) in pri 5 % NaCl (B); presečna elektronska mikrografija.....	46
Slika 24: Gladka površina kvasnih celic <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pri 0 % NaCl; vrstična elektronska mikrografija.....	47

KAZALO PRILOG

Priloga A: Razmerje med vodno aktivnostjo in koncentracijo soli (Stopar, 2007: 176)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

μl	mikroliter (10^{-6} litra)
μm	mikrometer (10^{-6} metra)
a_w	vodna aktivnost
dH ₂ O	destilirana voda
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EPS	ekstracelularni polimeri (extracellular polymeric substances - EPS)
HOG pot	signalna pot odziva na visoko osmolarnost (high-osmolarity glycerol)
ITS regija	regija notranjega distančnika (internal transcribed spacer) v rDNA
LSU	velika podenota (ang. large subunit)
M	molarna koncentracija
m/V	razmerje med maso in prostornino
MiliQ	ultra čista destilirana voda
MZKI	mikrobiološka zbirka kemijskega inštituta
rDNA	v jedru kodirani geni za ribosomalno RNA (rRNA)
rDNK	ribosomalna deoksiribonukleinska kislina
RNK	ribonukleinska kislina
TEM	presevna elektronska mikroskopija (transmission electron microscopy)
SSU	majhna podenota (Small Subunit)
YBN	kvasna dušikova osnova (yeast nitrogen base)

1 UVOD

Hiperslana okolja so dolgo veljala izključno za habitat prokariontov. Kljub temu so obstajala poročila o glivah, ki preživijo v okoljih z nizko vodno aktivnostjo, kserofilnih. Kserofilne glive so veljale izključno za kvarljivce hrane, konzervirane z visoko koncentracijo soli ali sladkorja. Leta 2000 je bila prva objava o solinah, kot naravnem habitatu gliv (Gunde-Cimerman in sod., 2000). Intenzivne raziskave v zadnjih letih so pripomogle, da so glive danes razpoznane za integralen del naravne halofilne mikrobne združbe. Večina adaptacijskih mehanizmov na povišano slanost halofilnih gliv se razlikuje od mehanizmov prokariontov.

Preživetje in rast mikroorganizmov v okoljih z veliko slanostjo zahteva kompleksne adaptacije na tako ekstremne pogoje. Najbolj značilna ter najbolj proučena halofilna gliva v vodah solin je črna kvasovka *Hortaea werneckii* (Gunde-Cimerman in sod., 2000). Visoko stopnjo adaptacije na povišano slanost *Hortaea* izraža skozi svoj ekstremofilni ekotip, ki se kaže v specifični meristematski rasti ter spremembi strukture celične stene in pigmentacije (Kogej in sod., 2006a). Pri glivah so danes poznane številne osmoadaptacije, ki vključujejo akumulacijo osmolitov (Kogej in sod., 2006a; Kogej in sod., 2006b), izločanje natrijevih ionov s pomočjo natrijevih črpalk (Almagro in sod., 2001), modifikacijo plazemske membrane (Turk in sod., 2004) in celične stene ter spremembo v morfologiji kolonij (Kogej in sod., 2006a).

Wallemia je rod kozmopolitskih ozmofilnih gliv. Na podlagi svojstvene morfologije, evolucije in kserotolerance glive *Wallemia* spp. uvrščamo v razred *Wallemiomycetes*, red *Wallemiales*. Na podlagi analiz majhne jedrne podenote ribosomalne DNK, kserotolerance ter velikosti konidijev so znotraj rodu *Wallemia* poznane tri vrste: *Wallemia sebi*, *Wallemia muriae* in *Wallemia ichthyophaga* (Zalar in sod., 2005a). Slednja je spoznana za najbolj halofilni evkariontski organizem opisan doslej, zato je kot modelni organizem primerna v študijah adaptacij na hiperslane pogoje.

Celična stena je ključnega pomena pri vzdrževanju osmotske homeostaze gliv, saj celico ščiti tako pred mehanskimi poškodbami, kot pred dehidracijo zaradi visokih koncentracij

solí v okolju. Celična stena je torej prva obrambna linija pred stresnimi vplivi iz okolja. Ravno zaradi tega je adaptacija na nivoju celične stene eden od najpomembnejših dejavnikov za uspešno rast pri nizki vodni aktivnosti (Kapteyn in sod., 1999).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Red *Wallemiales*, ki ga uvrščamo med bazidiomicetne glive vsebuje edini opisan rod *Wallemia*. Glive rodu *Wallemia* so bile izolirane iz sladke, slane ali posušene hrane ter iz izjemno slane vode evaporacijskih bazenov solin v Mediteranu in Mrtvem morju. Rod *Wallemia* zajema tri vrste: *Wallemia sebi*, *W. muriae* in *W. ichthyophaga*, pri čemer so vse tri kserofilne, le slednja je tudi halofilna gliva. Glive iz rodu *Wallemia* proizvajajo mikotoksin valeminol ter so eden od povzročiteljev kvarljivosti konzerviranih živil.

Celična stena je rigidna in hkrati dinamična struktura, ki se neprestano prilagaja na spremenljive pogoje. Dejavniki, ki vplivajo na spremembe v celični steni so: življenjski cikel celic, dostopnost nutrientov ter okoljski pogoji (npr. pH, temperatura, nizka/visoka vodna aktivnost). Ker je celična stena vpletena v različne fiziološke procese in je v neposrednem stiku z okoljem je poznavanje dinamike in vzrokov prilagajanja ob hiperosmotskem stresu sila pomembna za boljše razumevanje osmoadaptacije v ekstremnih pogojih. Za razvoj novih fungicidnih sredstev je prav tako pomembno natančnejše poznavanje sestave celičnih sten gliv.

1.2 CILJ

Predhodne raziskave so pokazale, da je lipidna sestava celičnih membran halofilov ob rasti pri višjih koncentracijah soli drugačna, kot v okolju brez soli. Prav tako so ugotovili, da slanost vpliva na morfologijo ter melanizacijo črnih kvasovk (Kogej, 2002). Zaradi omenjenih ugotovitev smo se odločili, da preverimo, kako slanost vpliva na kserofilne glive rodu *Wallemia*.

Namen diplomske naloge je:

- ugotoviti vpliv različne koncentracije soli na strukturo celične stene glive *Wallemia* spp.;

- seznaniti se s postopki priprave mikroskopskih preparatov;
- seznaniti se s presevno in vrstično mikroskopijo;
- primerjati debelino celičnih sten, membranskih in podmembranskih struktur gliv pri različnih slanostih s pomočjo elektronske mikroskopije;
- opisati potencialne spremembe plazemske membrane zaradi osmotskega stresa pri mezofilni kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*;
- pridobiti slike prečnih sept hif gliv rodu *Wallemia*;
- s pomočjo elektronskega mikroskopa pridobiti in analizirati slike večceličnih skupkov glive *Wallemia ichthyophaga*.

1.3 DELOVNA HIPOTEZA

Na podlagi ugotovitev, da se morfologija ter stopnja melanizacije celične stene črnih kvasovk spreminja v odvisnosti od slanosti gojišča, ki jih je preučila Kogej (2002), smo postavili hipotezo, da se debelina celične stene gliv rodu *Wallemia* z nižanjem vodne aktivnosti prav tako spreminja. Pričakujemo razlike v debelini celične stene med tremi vrstami iz rodu *Wallemia* ter tudi razlike v pigmentaciji, EPS in celični morfologiji.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SLANA OKOLJA IN ŽIVLJENJE V NJEM

Dolgo se je domnevalo, da glive ne naseljujejo naravnih hiperslanih okoljih. V zadnjem času se pojavljajo številni zapisi o diverziteti halofilnih in halotolerantnih gliv, ki pripadajo različnim rodovom melaniziranih in nemelaniziranih filamentoznih gliv ter kvasovk (Gunde-Cimerman in sod., 2005a).

2.1.1 Hiperslana okolja

Sol (NaCl) je gotovo ena najbolj zastopanih snovi na Zemlji, saj je navzoča v vodah vseh oceanov, ki pokrivajo 70 odstotkov površine našega planeta. Hiperslana okolja nudijo specifične pogoje za rast mikroorganizmov. Naravna hiperslana okolja razdelimo med terestrična in vodna okolja. Primeri takih okolij so obmorski pesek, slana zemlja, bazeni solin, naravna slana jezera ter površine hrane konzervirane s soljo (Gunde-Cimerman in sod., 2005b: 14).

Hiperslana okolja uvrščamo med ekstremna okolja zaradi njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti. Te lastnosti so visoke koncentracije NaCl in drugih soli, rapidne spremembe v vodni aktivnosti, nizke koncentracije kisika ter visoko UV sevanje.

V nekaterih primerih hiperslanih okolij so specifične fizikalno-kemijske lastnosti znane. Vode solin vsebujejo pretežno anione (Cl^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-}) ter občasne izjemno visoke koncentracije biološko pomembnih nutrientov. V nasičenih vodah solin je topnost O_2 izjemno nizka (Oren, 1999; Oren, 2002). Voda hiperslanega Mrtvega morja ima posebno ionsko sestavo, in sicer prevladujejo divalentni ioni (Mg^{2+} , Ca^{2+}) (Stiller in Nissenbaum, 1999). V Mrtvem morju je raztopljenega malo organskega materiala, ta pa je predvsem na račun primarnih producentov ter priobalnega rasti. Naravna jezera so hiperslana zaradi topografije, geologije in splošnih klimatskih pogojev okolja, kjer se jezero nahaja.

2.1.2 Temeljni pojmi: kserofilnost, halofilnost in halotoleranca

Dostopnost vode je esencialnega pomena za življenje sploh in je odvisna od soli, sladkorjev in drugih topljencev, ki so v vodi raztopljeni. Visoke koncentracije NaCl povzročajo tako ionski kot osmotski stres, ki ima za posledico dehidracijo celic gliv. Vodna aktivnost (a_w) je mera za kemijski potencial vode pri izbrani temperaturi, kjer je potencial vode količina dela na enoto vode, ki ga opravi voda, ko se premika izotermno in reverzibilno od izbranega do referenčnega stanja. Vrednosti vodne aktivnosti variirajo v območju med 0 in 1. Mikroorganizmi so po dosedanjih odkritjih sposobni preživeti v območju od 0,999 do 0,60 vodne aktivnosti (Pitt in Hocking, 1985).

Voda difundira iz območja z nizko koncentracijo topljencev v območje z visoko koncentracijo topljencev s procesom osmoze. V primeru, ko so celice v okolju z nizko vodno aktivnostjo (npr. slano okolje), voda iz celice uhaja. Da bi organizmi preprečili lastno dehidracijo zaradi osmoze, so morali razviti različne prilagoditvene mehanizme, ki so omogočali preživetje v okoljih z zmanjšano vodno aktivnostjo. Slanost posredno vpliva na rast mikroorganizmov, saj vpliva na že zgoraj omenjeno aktivnost vode, osmotski pritisk v celici, denaturacijo proteinov, stanje membrane (ionski tokovi) ter senčenje nabojev.

Skozi leta so se spreminjale tudi definicije organizmov, prilagojenih na rast v slanih okoljih – danes poznani kot halofili. Gunde-Cimerman in sod. (2000; 2005a) so ugotovili, da so glive halofilne v primeru, da so izolirane iz okolja, kjer je slanost med 17 in 32 % NaCl ter so *in vitro* sposobne rasti najmanj pri 17 % NaCl. Glive so halotolerantne v primeru, da so izolirane iz okolij z nižjo slanostjo in so *in vitro* sposobne rasti do 17 % NaCl.

Večina halofilnih gliv, ki raste na hiperslanih substratih izraža kserofilni fenotip (Filtenborg in sod., 2000), ki se odraža kot sposobnost rasti pri nizki vodni aktivnosti, ne glede na kemijsko naravo topljenca (Hocking, 1993; Pitt in Hocking, 1985). Po definiciji so glive kserofilne v primeru, da dobro rastejo pri vodni aktivnosti 0,85 ali manj, kar ustreza 17 % NaCl ali 50 % glukozi v rastnem mediju (Gunde-Cimerman in sod., 2005a)

Glive, ki so sposobne rasti pri nizki vodni aktivnosti v prisotnosti visokih koncentracij topljencev, so med najbolj razvitimi mikroorganizmi na Zemlji (Pitt in Hocking, 1985).

Preživetje halofilov v naravi je odvisno predvsem od dostopnosti okolja z nizko vodno aktivnostjo, kjer je kompeticija izredno omejena, ter od ekoloških niš, ki imajo sezonski pritek nuričev, ki so bistvena komponenta za tovrstni energetsko potratni način življenja. Prave halofilne glive zaradi lastnega energetsko potratnega metabolizma za rast potrebujejo velike količine vira ogljika, ki je v hiperslanih okoljih dostopen predvsem na račun primarne produkcije.

2.2 HALOFILNI MIKROORGANIZMI

2.2.1 Fiziološke in morfološke prilagoditve na slano okolje

Glive lahko rastejo pri dosti nižji vodni aktivnosti, kot prokarionti ter so sposobne preživeti velike osmotske in termalne fluktuacije, nizke temperature okolja, visoko UV sevanje in nizko razpoložljivost nutrientov. Stres zaradi hiperslanosti ter stres zaradi nizkih temperatur okolja imata skupno posledico - celično dehidracijo in pri glivah aktivirata enake odzivne mehanizme.

Različni organizmi so razvili različne strategije za premagovanje osmotskega stresa. Pomembnejši mehanizmi so (Gunde-Cimerman in sod., 2005a):

- spremembe v sestavi membrane ter njenih lastnosti,
- izločanje izvenceličnih glikoproteinov,
- učinkoviti transportni sistemi za izločitev ionov ter sistemi za uskladičenje ionov, ki zmanjšajo njihov toksični učinek v citosolu celice,
- akumulacija nizkomolekularnih organskih snovi, imenovanih kompatibilni topljenci,
- specifični signalno transdukcijski mehanizmi, ki zaznavajo ter se odzovejo na povečane koncentracije soli.

2.2.1.1 Spremembe v sestavi membrane zaradi povišane slanosti okolja

Takojšen odziv morskih halotolerantnih kvasnih celic na povečano osmolarnost je zmanjšanje celičnega volumna, izguba celične polarnosti, razpad aktinskega citoskeleta ter spremembe v permeabilnosti plazemske membrane (Hernandez-Saavedra in sod., 1995). Spremembe v sestavi membrane in njenih lastnosti so pomembni za adaptacijo na visoke slanosti (Russell, 1989).

Steroli in fosfolipidi so poglavitni lipidni gradniki evkariontskih membran. Njuno razmerje v celičnih membranah je bistvenega pomena za samo strukturno organizacijo in fluidnost le-teh. Faktorji, ki vplivajo na fluidnost membrane, so:

- vrsta maščobnih kislin v fosfolipidih (dolžina verig in stopnja nasičenosti),
- količina sterolov v membrani,
- narava polarnih glav fosfolipidov.

Halotolerantne glive poznajo zelo raznolike alteracije lipidne sestave membrane, kot posledico osmotskega stresa in halotolerance. Pri halofilni glivi *Hortaea werneckii* sta bili dokazani visoko razmerje med fosfolipidi in steroli ter visoka stopnja nenasičenosti fosfolipidnih maščobnih kislin v membrani, ko je le-ta bila izpostavljena visokim slanostim. Vsebnost sterolov se ob povečani slanosti ne spremeni znatno. Prevladujoči tipi fosfolipidov so fosfatidilholin, fosfatidiletanolamin ter anionski fosfolipidi (Turk in sod., 2004).

Poleg natančne regulacije fluidnosti membrane je pri visokih slanostih bistvena za preživetje mikroorganizmov tudi permeabilnost ionskih kanalov v njej. Oba mehanizma vplivata na vnos nutrientov, elektronski transport ter zaznavanje okolja. Prikazana dejstva razodevajo, da je povečana fluidnost membrane v širokem območju slanosti odločilnega pomena za halotoleranco (Turk in sod., 2004).

Steroli kot komponenta evkariontskih bioloških membran imajo pri regulaciji fluidnosti bistveno vlogo. Raziskave so pokazale, da je pri ekstremofilni črni kvasovki *Hortaea*

werneckii biosinteza sterolov povsem drugače regulirana kot pri mezofilni kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* (Petrovič in sod., 1999). V prisotnosti osmotskega stresa je pri glivi *Hortaea werneckii* povečana aktivnost HmgCoA reduktaze, ki je poglavitni regulatorni encim v sintezi sterolov. Aktivnost zgoraj omenjenega encima je pri optimalnih slanostih nizka (Vaupotič in Plemenitaš, 2004).

2.2.1.2 Izločanje izvenceličnih glikoproteinov zaradi povišane slanosti okolja

Različni izvencelični glikoproteini so bili izolirani pri številnih glivah iz medija s povišano slanostjo. V sladkornem delu glikoproteinov je v prisotnosti NaCl prevladovala predvsem manoza, medtem ko je bil proteinski del predvsem iz glutaminske kisline. Vloga tukaj opisanega mehanizma za premagovanje osmotskega stresa, naj bi bila v zadrževanju molekul vode s strani glikoproteinov in posredno v zaščiti vodnega režima celice (Breierova in sod., 1997a; Breierova in sod., 1997b).

2.2.1.3 Akumulacija kompatibilnih topljencev zaradi povišane slanosti okolja

Prisotnost visokih koncentracij soli v okolju pomeni, da je organizem izpostavljen nevarnosti dehidracije zaradi osmoze. Halofilne in halotolerantne glive izenačujejo visok zunanji osmotski tlak z akumulacijo nizkomolekularnih snovi, ki kompenzirajo osmotski stres (Oren, 1999). Za večino evkariontskih organizmov ioni soli niso primerni za izenačenje osmotskih pritiskov, saj imajo v višjih koncentracijah škodljive učinke na celico.

Po Hochachka in Somero (2002) so za vzdrževanje pozitivnega turgorskega tlaka v hiperslanih okoljih do sedaj bile odkrite štiri glavne skupine osmolitov pri različnih mikroorganizmih:

- polioli, kot so glicerol in arabitol ter disaharid trehaloza,
- amino kisline: prolin, glutamat, alanin ter njihovi derivati, npr. taurin,
- metildušikovi in metisulfatni topljenci,
- urea.

Najpogosteje akumulirani kompatibilni topljenci pri halotolerantnih in halofilnih glivah so polioli: glicerol, eritritol, inositol, arabinol, ksilitol in manitol, kjer je glicerol daleč najpomembnejši (Bloomberg in Adler, 1992). Znotrajcelična akumulacija glicerola je bila opažena tudi pri na slanost občutljivi kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*.

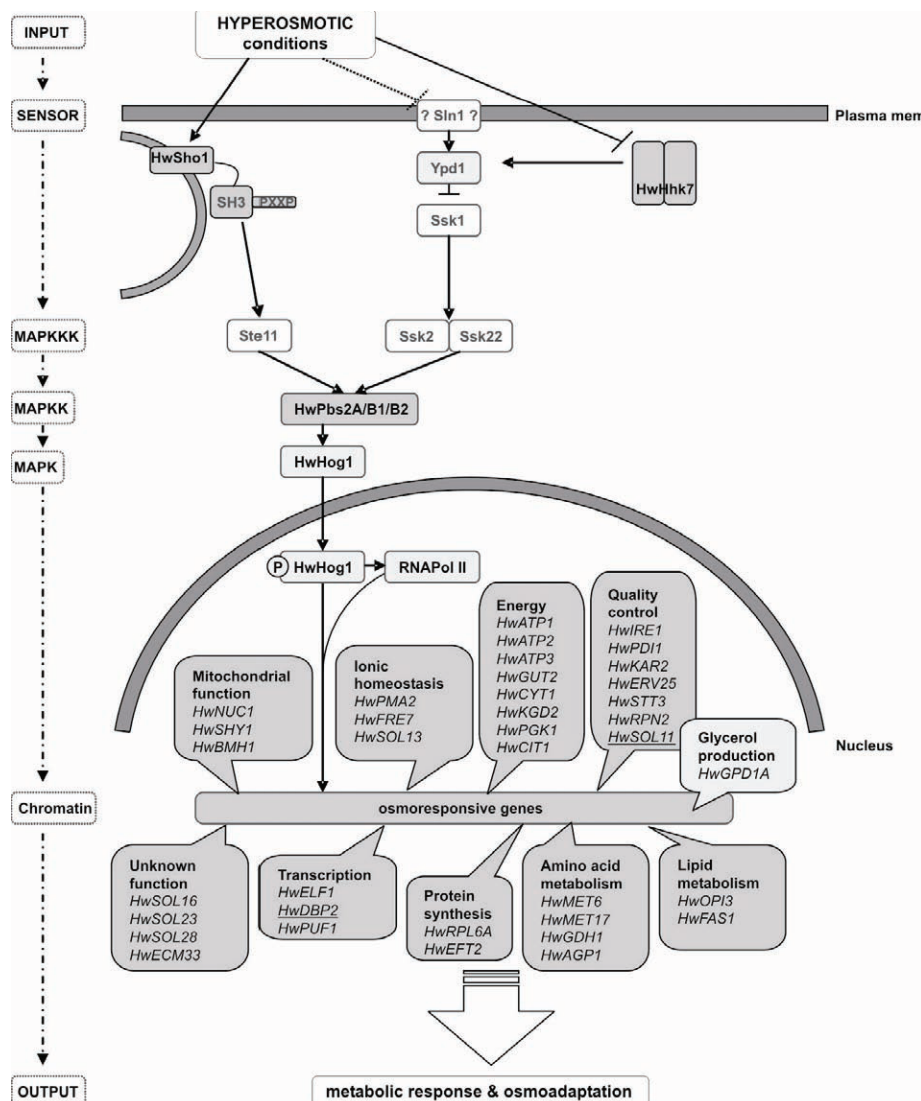
Povečana znotrajcelična koncentracija glicerola je lahko posledica povečane endogene sinteze, ali pa aktivnega vnosa izvenceličnega glicerola. Tovrstni prilagoditveni mehanizmi na osmotski stres so energetsko zelo potratni, za kar so potrebne velike količine ATP (Yagi, 1992; Oren, 1999). Povezava med rezistenco na osmotski stres ter konstitutivnim izražanjem membranskih prenašalcev za aktivni vnos glicerola v celico nakazuje, da je vnos glicerola eden od bistvenih mehanizmov halotolerance (Lages in sod., 1999).

2.2.1.4 Signalne poti osmotskega stresa pri glivah

Najpomembnejša signalna pot, ki zaznava osmotski stres pri glivi *Saccharomyces cerevisiae*, je HOG (high osmolarity glycerol) pot. Glavni encim, ki je pod kontrolo te signalne poti, je glicerol-fosfat dehidrogenaza (*gpd*). Njegova ekspresija je povezana s sintezo glicerola kot posledico osmotskega stresa.

Raziskave so potrdile pomembnost vloge HOG signalne poti v osmoadaptaciji tudi pri glivi *Hortaea werneckii*. Dražljaji, ki aktivirajo omenjeno signalno pot so hiperosmotski stres, oksidativni stres ter toplotni stres. V hiperslanih okoljih osmoregulatorni geni pri glivi *Hortaea werneckii* drugačni, kot pri na slanost občutljivi *Saccharomyces cerevisiae* (Plemenitaš in sod., 2008; Slika 1).

Poznane so tudi druge signalne poti, ki vključujejo proteinsko kinazo A, fosfatidilinozitol 3,5-difosfat in povečano citosolno koncentracijo kalcija, vendar je njihova vloga v fiziologiji gliv še dokaj nepoznana (Tamas in Hohmann, 2003).



Slika 1: Shematski prikaz HOG signalne poti kot adaptacije na hiperslana okolja pri halofilni glivi *Hortaea werneckii* (Plemenitaš in sod., 2008: 72).

2.2.2 Biotehnoški pomen halofilnih gliv

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

Ena izmed fizioloških posebnosti halofilov je produkcija kompatibilnih topljencev, ki imajo potencialno uporabno vrednost pri stabilizaciji makromolekul (npr. encimov in nukleinskih kislin) (Herbert, 1992; Ventosa in Nieto, 1995; Aguilar, 1996).

Farmacevtska in prehrabena industrija sta usmerili svojo pozornost v produkcijo eksopolimerov halofilov. Le-ti so zanimivi zaradi njihovih emulgatorskih lastnosti in viskoznosti, ki s povečano slanostjo narašča (Zalar in sod., 2000).

Ekstremofilne glive sintetizirajo encime z zanimivimi biotehnološkimi lastnostmi, saj imajo veliko termično in kemično stabilnost ter minimalno možnost kontaminacije v industrijski produkciji. Halofilne črne kvasovke producirajo ekstracelularne hidrolitične encime, aktivne pri visoki slanosti (Zalar in sod., 2000).

Halofili producirajo tudi sekundarne metabolite s farmakološkimi lastnostmi. To so encimski inhibitorji, antibiotiki ter inhibitorji rasti. Kljub temu da halofilna gliva *Hortaea werneckii* producira substance z antibiotskimi lastnostmi (Brauers in sod., 2001), je njen potencial še slabo raziskan in zato tržno neizkoriščen.

2.3 FILOGENTSKI, MORFOLOŠKI IN EKOLOŠKI OPIS RODOV IN VRST, VKLJUČENIH V RAZISKAVO

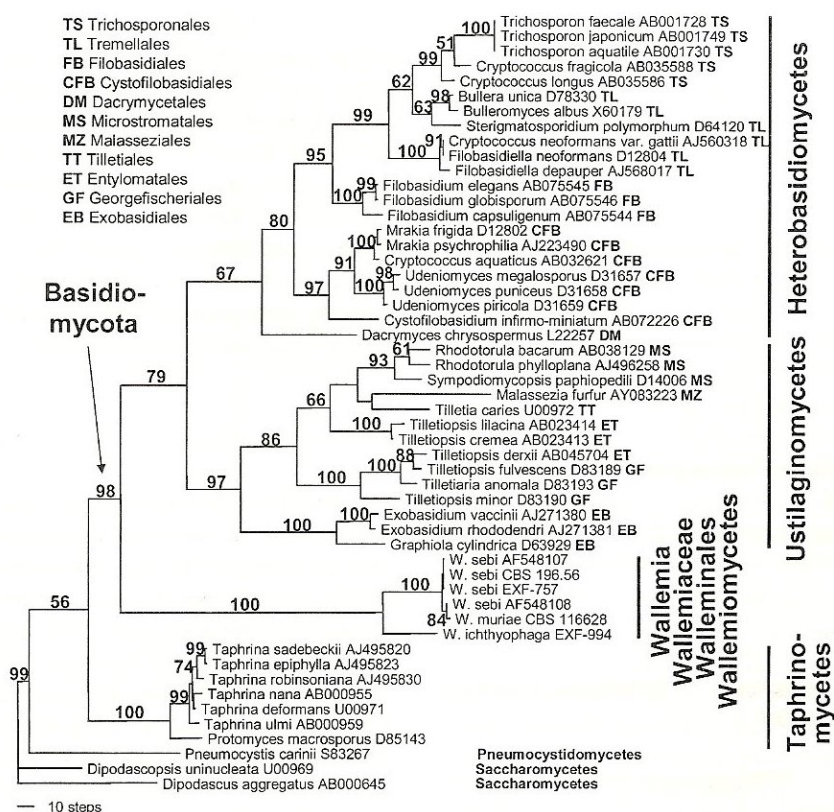
2.3.1 Rod *Wallemia*

Rod *Wallemia* obsega tri kserofilne vrste, ki so bile izolirane iz sladke, slane ter posušene hrane (Samson in sod., 2002), iz evaporacijskih jezov v Sredozemskem, Karibskem ter Mrtvem morju (Zalar in sod., 2005a), zemlje (Domsch in sod., 1980) ter iz zraka (Takahashi, 1997).

Rod *Wallemia* je prvič predstavil Johan-Olsen leta 1887, ko je vrsto *W. Ichthyophaga* Johan-Olsen opisal kot počasi rastočo, kserofilno vrsto, ki tvori poseben tip konidijev.

2.3.1.1 Filogenetska uvrstitev rodu *Wallemia*

Bazidiomicetni rod *Wallemia* spp. je bil nedavno na osnovi analiz SSU rDNA filogenetsko uvrščen kot sesterska skupina *Ustilaginomycetes* in *Hymenomycetes* (Slika 2). Zaradi omenjene sorodnosti s taksoni, ki vsebujejo kvasovkam podobne anamorfe, ter sorodnosti s taksoni z biotrofnim parazitskim življenjskim slogom lahko domnevamo, da je *Wallemia* spp. filogenetsko starodaven takson.



Slika 2: Filogenetsko drevo debla Basidiomycota, sestavljeno na podlagi analiz SSU rDNK (Zalar in sod., 2005a: 316).

Dodaten dokaz o filogenetski starodavnosti rodu *Wallemia* so prinesle raziskave, ki so pokazale velike količine nukleotidnih substitucij v SSU rDNK in LSU rDNK pri glivah rodu *Wallemia*. Le-te so se na dolgi rok nakopičile skozi evolucijo, ali pa so posledica izumrtja bližnjih sorodnikov (Zalar in sod., 2005a).

Filogenetsko pozicijo razreda *Wallemiomycetes* je proučeval tudi Matheny s sodelavci (2006). Po primerjavah nukleotidnih sekvenc 18S, 25S in 5.8S rRNK ter genov, ki kodirajo jedrne proteine, so prišli do zaključka, da je *Wallemiomycetes* zgodnja linija znotraj debela Basidimycota, saj zavzema osnovno pozicijo blizu Entorrhizomycetidae (Matheny in sod., 2006). Glede na specifično morfologijo, evolucijo in kserotoleranco je bil leta 2005 predlagan nov bazidiomicetni razred *Wallemiomycetes* z redom *Wallemiales*.

Znotraj rodu *Wallemia* so poznane tri kserofilne vrste: *W. ichthyophaga*, *W. muriae* in *W. sebi*. Med posameznimi vrstami obstajajo razlike v nukleotidnih zaporedjih LSU rDNK ter ITS1, ITS2 rDNK, ki kažejo na to, da je halofilna *W. ichthyophaga* filogenetsko precej oddaljena od ostalih dveh vrst. Na podlagi velikih molekularnih razdalj v nukleotidnih sekvencah je verjetno, da med danes poznanimi vrstami rodu *Wallemia* manjkajo vezni taksoni, ker so izumrli ali še niso bili izolirani in identificirani (Zalar in sod., 2005a).

2.3.1.2 Morfologija in ekologija rodu *Wallemia*

Poleg molekularne oddaljenosti so prisotne tudi določene morfološke razlike med vrsto *W. ichthyophaga* ter ostalima dvema vrstama *W. muriae* in *W. sebi*. *W. ichthyophaga* je edina, ki tvori sarcinam podobne strukture. Kljub omenjeni razliki pa imajo vse tri vrste veliko skupnih morfoloških lastnosti, ki pričajo o njihovem tesnem sorodstvu. Pri vseh treh najdemo artrosporam podobne konidije, ki se v enotah po štiri oddeljujejo od konidioforjev (Zalar in sod., 2005a). Omenjena morfologija konidioforov ter bazoavksalni tip konidiogeneze sta edini primerek v kraljestvu gliv in sta tipična predvsem za vrsto *W. muriae* (Hamsi in Morgan-Jones, 1973; Madelin in Dorabjee, 1974; Cole in Samson, 1979).

Določeni sevi iz rodu *Wallemia* proizvajajo toksine valeminol in valeminon (Wood in sod., 1990; Frank in sod., 1999), ki pri človeku povzročajo podkožne infekcije (de Hoog in sod., 2000) ter določene alergološke težave, kot npr. t.i. bolezen kmetovih pljuč (Lappalainen in sod., 1998; Roussel in sod., 2004).

2.3.2 Vrsta *Hortaea werneckii*

Hortaea werneckii je prevladujoča vrsta med askomicetnimi črnimi kvasovkami redu *Dothideales*, ki so dominantna skupina gliv, ki naseljujejo soline po svetu. Prvič je bila izolirana v slovenskih solinah leta 1995. *Hortaea werneckii* je sposobna preživeti drastične spremembe v slanosti okolja. Zaradi njene sposobnosti rasti v mediju z 0 do 32 % NaCl je primeren modelni organizem za laboratorijske študije adaptacij na spremembe slanosti.

Na podlagi analiz 18S rDNK so rod *Hortaea* filogenetsko uvrstili med askomicetne črne kvasovke, red *Dothideales* (Sterflinger in sod., 1999).

2.3.2.1 Morfološke značilnosti vrste *Hortaea werneckii*

Hortaea werneckii je črna kvasovka, saj producira temen pigment DHN melanin tako na zunanji kot na notranji strani celične stene. Črne kvasovke so melanizirane glive, ki vsaj del svojega življenjskega cikla preživijo v kvasni, brsteči obliki. Za črne kvasovke je značilen polimorfizem, meristematska rast, endokonidiacija, pogostost muriformnih celic, ki se razvijejo iz nedefiniranih hif, ter debele melanizirane celične stene (de Hoog, 1993; Zalar in sod., 1999). *Hortaea werneckii* je meristematska gliva, saj tvori počasno rastoče kolonije zgrbančenega videza in se reproducira z izodiametričnim povečevanjem ter delitvijo celic (Sterflinger in sod., 1999). V tekočem gojišču raste v skupkih, kjer so celice v notranjosti skupkov zaščitene in je minimalizirano število celic, ki so direktno izpostavljene težkim razmeram okolja.

2.3.2.2 Življenjski cikel vrste *Hortaea werneckii*

Na podlagi izključno morfoloških lastnosti črne kvasovke težko identificiramo do vrste predvsem zaradi njihove morfološke plastičnosti ter polimorfnega življenjskega cikla. Polimorfni življenjski cikel glive *Hortaea werneckii* zajema tri oblike rasti: kvasno, filamentozno ter meristematsko rast. Katera oblika rasti se bo uveljavila, je odvisno od

pogojev v okolju. Če je na voljo dovolj razpoložljivih nutrientov, hidrofilna kvasna rast hitro kolonizira hiperslana okolja.

Ob povečani slanosti se kvasne oblike celic gliv odzovejo z meristematskim razvojem brstov ter z dormantnimi sklerocijskimi telesci. Meristematske celice sproščajo hčerinske celice z endogeno konidizacijo tako, da se celična stena materinske celice »olušči«. Pod ugodnimi življenjskimi pogoji iz kvasnih celic kalijo hife, ki hitro naselijo substrat.

V primeru suše in drugih neugodnih pogojev okolja gliva razvije aerofilno, hidrofobno hifno rast s produkcijo endogenih konidijev, medtem ko v ekstremno neugodnih pogojih gliva tvori dormantna sklerocijska telesa. Morfološki polimorfizem ter kompleksni življenjski krog glivam omogočata preživetje in adaptacije v spremenljivih ekoloških nišah (Uijthof, 1996).

2.3.2.3 Ekologija vrste *Hortaea werneckii*

Na podlagi populacijske dinamike zgleđa, da so soline naravni habitat glive *Hortaea werneckii* (Gunde-Cimerman in sod., 1997). Izolirali so jo tudi iz drugih ekstremnih okolij: kamenine ob morski obali, izsušene vroče in mrzle puščave. *Hortaea werneckii* je povzročitelj površinske kožne bolezni, imenovane tinea nigra, ki se pojavlja v tropih in v glavnem prizadene dlani (Mittag, 1993; Severo in sod., 1994). Območje slanosti, pri kateri *Hortaea werneckii* raste *in vitro*, je od 0 % do 32 % NaCl (nasičena raztopina), s širokim območjem optimalne slanosti za rast 6-14 % NaCl.

2.3.3 Vrsta *Saccharomyces cerevisiae*

Vrsta *Saccharomyces cerevisiae*, bolje poznana kot pivska kvasovka, je elipsoidne oblike z velikim premerom 5-10 μm ter manjšim premerom 1-7 μm in je opisana kot ne-osmotolerantna kvasovka (Kavanagh, 2005).

Kvasovke so definirane kot enocelične glive, z redkimi izjemami, ki se razmnožujejo vegetativno z brstenjem. Brstenje nastopi, ko se izboklina na celični steni prične večati.

Brst se od materinske celice lahko odcepi, ko je le-ta še majhen ali ko sta celici podobnih velikosti (Samson in sod., 2004).

2.3.3.1 Življenjski krog *Saccharomyces cerevisiae*

Brstenje je najpogostejša oblika vegetativne reprodukcije pri kvasovkah. Za askomicetne kvasovke je značilna multilateralna tvorba brstov. Za nastanek brstov je potrebna oslabitev celične stene v materinski celici, ki skupaj z napetostjo, ki jo ustvarja turgorski tlak omogoča izrivanje citoplazme v prostor, ki je obdan z novo nastalo celično steno. Pri sintezi polisaharidov celične stene sodelujeta predvsem encima glukan in hitin sintetaza. Hitin je polimer N-acetilglukozamina, ki tvori obroč med materinsko celico in brstom ter ostane kot brazgotina brsta na površini materinske celice po končani celični delitvi.

Kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* lahko preklaplajo med haploidnim in diploidnim celičnim ciklom. Haploidne oblike dveh različnih paritvenih tipov se podvajajo z mitozo. Diploidne oblike kvasovk lahko rastejo vegetativno ali pa zaradi pomanjkanja nutrientov vstopijo v mejotični cikel podvajanja ali sporulacije. Tako haploidne kot diploidne celice se lahko podvajajo z brstenjem, med katerimi je razlika predvsem v izbiri mest nastanka brstov (Kavanagh, 2005).

2.3.3.2 Ekologija vrste *Saccharomyces cerevisiae*

Naravni habitat kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* je površina sadja, čeprav je njena vloga najbolj poznana v prehrambeni industriji. Vrsta *Saccharomyces cerevisiae* je občutljiva na povišano slanost. DNA čip tehnologija je pokazala, da ima izpostavljanje visokim slanostim za omenjeno vrsto drastične posledice na nivoju genske ekspresije (Crespo in sod., 2001; Gash in sod., 2000).

Zmanjšanje velikosti, izguba polarnosti celice, razpad aktinskega citoskeleta ter spremembe v permeabilnosti plazemske membrane so nekateri izmed takojšnjih odzivov na povečano osmolarnost kvasnih celic (Slaninova in sod., 2000).

2.4 ZGRADBA EVKARIONTSKE CELIČNE STENE

Celična stena je bistvenega pomena za preživetje gliv. Njena edinstvena sestava je tako idealna tarča za razvoj novih fungicidnih sredstev. Celična stena celico ščiti pred osmotskim tlakom, stresi iz okolja ter določa njeno obliko. Celična stena je na eni strani opisana kot rigidna struktura glikoproteinov in polisaharidov, na drugi pa kot dinamična struktura, ki je dovolj fleksibilna, da se uspešno prilagaja rasti celice (Grün, 2003).

2.4.1 Komponente celične stene

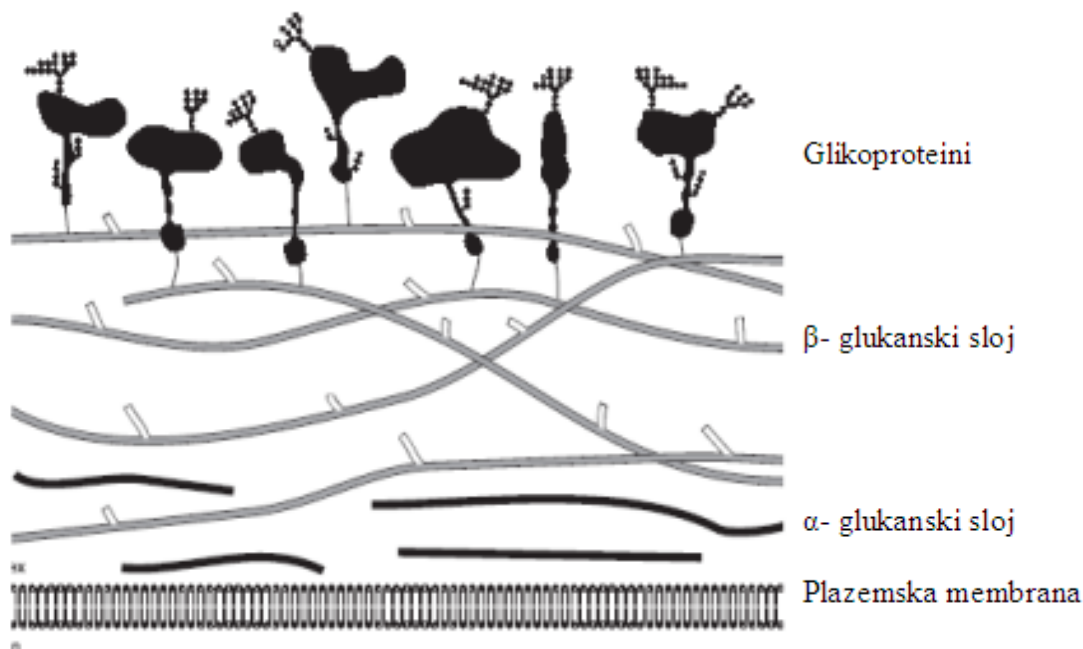
Večino celičnih sten gliv sestavljajo naslednje komponente (Slika 3):

- (1,3)- β -glukan (glukan je polimer glukoze),
- (1,6)- β -glukan,
- (1,3)- α -glukan,
- Hitin,
- glikoproteini.

Sloj α -glukana je fibrilaren in ima strukturno vlogo. V primeru da je prisoten, leži tesno ob plazemski membrani in tako naredi osnovni sloj celične stene tog. Po Grün, 2003, je sloj α -glukana, iz $\alpha(1,3)$ glukanskih polimerov. $\alpha(1,4)$ glikozidi so redkeje prisotni. α -glukanski sloj v celični steni v kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ni prisoten in njegova porazdelitev med filogenetskimi taksoni je nekoliko svojstvena. Znotraj askomicetnih gliv ga najdemo pri kvasovkah rodu *Schizosaccharomyces*, pri bazidiomicetnih glivah predstavlja poglavitno komponento celične stene, medtem ko je pri *Hymenomyces* popolnoma odsoten (Grün, 2003).

β -glukani so v celični steni gliv v dveh oblikah in sicer v obliki (1,3)- β -glukanov ter v obliki (1,6)- β -glukanov. Prvi so prisotni v celičnih stenah večine gliv z izjemo celičnih sten hif gliv *Zygomycota* (Barreto-Bergter in Gorin, 1983; Wessels in Sietsma, 1982). Veriga (1,3)- β -glukana (1500 glukoznih monomerov/ verigo) ima vzmeti podobno strukturo, ki celični steni zagotavlja elastičnost in raztezno trdnost. (1,3)- β -glukani so med seboj povezani preko (1,6)- β -vezi. Na druge komponente celične stene so vezani kovalentno

(glej Slika 3), in sicer: z nereducirajočim koncem je (1,3)- β -glukan prečno vezan na reducirajoče konce verig hitina preko 1-4 vezi (Klis in sod., 2002; Kollar in sod., 1997).



Slika 3: Shematski prikaz celične stene gliv. Celično steno sestavlja zunanji sloj iz glikoproteinov ter notranji sloj iz polisaharidov. Sestava celične stene se razlikuje med različnimi vrstami gliv (Grün, 2003: 11).

Z razliko od (1,3)- β -glukanov je (1,6)- β -glukanski polimer krajši in amorfnе strukture. V celični steni ima ključno vlogo pri prečnih povezavah njenih komponent. Preko (1,6)- β -glukanov so (1,3)- β -glukanski polimeri ter hitini povezani z manoproteini in tako formirajo kompaktno celično steno (Kollar in sod., 1997). Kompleksno razvejene strukture glukanov omogočajo tvorbo gelu podobnega matriksa. Med glukanskimi molekulami so različne povezave, ki so močnejše v notranjem ter bolj sproščene v zunanem delu celične stene. Na ta način glukani oblikujejo gelu podoben matriks, ki difundira v zunanje okolje (Ross, 2001).

Najbolj zunanji del celične stene je iz glikoproteinov, kjer je na polipeptidno ogrodje pripet polisaharid, večinoma iz manoze, galaktoze in ksiloze. Tako nastali glikoproteini so manoproteini, peptidogalaktomanani in ksilomanoproteini (Ross, 2001). Glikoproteini imajo pomembno vlogo pri zadrževanju vode, adheziji in virulenci. Manoproteini glive

Saccharomyces cerevisiae, ki so preko (1,3) vezi vezani na (1,6)- β -glukane, so pomembni za prepustnost celične stene (Kollár in sod., 1997).

Hitin je linearen, nerazvejan polimer iz $\beta(1,4)$ -N-acetilglukozaminskih ostankov in tvori mikrofibrile, ki so stabilizirani z vodikovimi vezmi. Delež hitina je v celičnih stenah gliv izredno variabilen. V celičnih stenah hif je njegova količina večja kot v kvasnih celicah (Wang in sod., 1999). Nalaganje hitina v celični steni je prostorsko in časovno uravnano (Bulawa, 1993).

2.4.1.1 Zgradba in organizacija celične stene filamentoznih gliv

Raziskave ultrastrukture celičnih sten gliv so pokazale, da je to debela, kompleksna fibrilarna mreža. Celična stena filamentoznih gliv je sestavljena iz različnih polisaharidov, ki se razlikujejo glede na taksonomsko skupino (hitin, glukani, manoproteini, hitozan, poliglukuronska kislina ali celuloza, manjše količine proteinov in glikoproteinov (Preglednica 1). Navadno je sredinski del celične stene organiziran v mrežo, ki jo sestavljajo mikrokristalinične mikrofibrilarne komponente. Fibrilarni polimeri so obdani z amorfnim vklopnim matriksom, ki je iz matričnih polimerov (polisaharidi ali glikoproteini). Komponente se med seboj povežejo takoj za rastočim delom hif ter tako še dodatno ojačajo celotno strukturo celične stene.

Kot sem že omenila, je celična stena dinamična struktura, pri kateri so prisotne znatne kvalitativne in kvantitativne razlike med različnimi vrstami gliv, kot tudi med različnimi morfološkimi oblikami iste vrste. Razlike v strukturi celične stene nastanejo tudi kot odziv na stres iz okolja (Kavanagh, 2005).

Preglednica 1: Poglavitni polimeri prisotni v celičnih stenah pri različnih taksonomskih skupinah gliv, skupaj s perforiranimi septami (Kavanagh, 2005: 6).

Taksonomska skupina	Fibrilarni polimeri	Matrični polimeri	Prisotnost/odsotnost perforiranih sept
<i>Oomycetes</i>	$\beta(1,3)$; $\beta(1,6)$ -glukan celuloza	Glukan	Odsotne
<i>Chytridomycetes</i>	Hitin; glukan	Glukan	Odsotne
<i>Zygomycetes</i>	Hitin; hitozan	Poliglukuronska kislina; glukuronomanoproteini	Odsotne
<i>Basidiomycetes</i>	Hitin; $\beta(1,3)$ - $\beta(1,6)$ -glukani	$\alpha(1,3)$ -glukan; ksilomanoproteini	Prisotne (predvsem dolipore)
<i>Ascomycetes/Deuteromycetes</i>	Hitin; $\beta(1,3)$ - $\beta(1,6)$ -glukani	$\alpha(1,3)$ -glukan; galaktomanoproteini	Prisotne (preproste septe z velikimi centralnimi porami)

2.4.1.2 Zgradba in organizacija celične stene pri kvasovkah

Pri kvasovkah so komponente celične stene: polisaharidi (predvsem β -glukani za trdnost), proteini (predvsem manoproteini, ki v najbolj zunanjem sloju odločajo o poroznosti celične stene), lipidi in anorganski fosfati. Hifne celice običajno vsebujejo manjši delež mananov kot celice kvasnih oblik. Primer tovrstne spremembe v kompoziciji celične stene je bil opažen pri prehodu iz kvasne v filamentozno rast pri dimorfni glivah.

Najbolje raziskana je celična stena kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, ki je zgrajena iz (1,3)- β -glukana, ki tvori v alkalnem topno frakcijo (20 %), iz (1,6)- β -glukana (5 %), hitina (2 %) ter manoproteinov (40 %) (Klis in sod., 1997). Zanimiva lastnost omenjene kvasovke je, da je v celični steni odsoten (1,3)- α -glukan.

Elektronska mikroskopija je pokazala, da je celična stena organizirana v slojih, kjer je notranji sloj iz (1,3)- β -glukana, ki tvori gosto prepletene mikrofibrile. Sledita mu plasti (1,6)- β -glukana in manoproteinov (Osumi, 1998; Cabib in sod., 1982). Večji del hitina (90 %) najdemo v septah in brazgotinah brstov (Ross, 2001), po separaciji celic, medtem ko je preostali del hitina porazdeljen po lateralni celični steni (Kollár in sod., 1997). Brazgotine

brstov so pokazatelj starosti kvasnih celic, kjer je število brazgotin enako številu zaključenih celičnih ciklov.

2.4.2 Delovanje in vloge celične stene

Za lažje razumevanje strukture in vrste komponent celične stene je pomembno poznavanje vloge, ki jo ima celična stena hif ter kvasnih celic. Najbolj očitna lastnost celične stene je definiranje oblike celic gliv. Pri filamentozni rasti togost stranskih sten hifam daje cilindrično obliko, medtem ko nalaganje materiala celične stene na konce hif omogoča apikalno rast. Podobno je pri nepolariziranem nalaganju komponent celične stene kvasovk, ki celicam zagotavlja sferično obliko. Celična stena je v tem primeru manj toga, saj celica enakomerno raste v vse smeri.

Ostale, a nič manj pomembne vloge celične stene gliv je opisal Ross (2001). Struktura celične stene vpliva na vnos nutrientov in sekrecijo na različnih mestih hife. Pomembna je za prepoznavanje in adherenco na substrat, ki ga gliva izrablja. Njena funkcija je nezanemarljiva pri prepoznavanju paritvenih tipov kvasovk in njihove fuzije.

Z melanini, polimeri fenolnih metabolitov, celična stena dobi še nekaj prednostnih lastnosti. Melanizirane celične stene so zaščitene pred encimsko razgradnjo, sevanjem ter so bolj odporne na mehanske poškodbe.

2.4.3 Vpliv slanosti na strukturo celične stene

2.4.3.1 Saccharomyces cerevisiae

Ob izpostavitvi slanosti 0,7-1 M KCl je pri neosmotolerantni kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* aktinski skelet razpadel. Med osmotskim stresom so prav tako razpadli citoplazmatski mikrotubuli in sinteza celične stene se je začasno ustavila. Sledila sta zmanjšanje volumna citoplazme in redistribucija periplazmatskega ter/ali matričnega materiala celične stene. Osmotski stres pa ni vplival na samo sintezo komponent celične stene (Slaninova in sod., 2000).

Pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*, ki je bila izpostavljena osmotskemu stresu, so s pomočjo elektronske mikroskopije odkrili globoke invaginacije plazemske membrane. Membranske invaginacije naj bi predstavljale površinsko rezervo, saj se večajo glede na trenutni turgorski tlak. Globoke invaginacije, ki se tvorijo ob hiperosmotskem stresu, so komplementarne izboklinam na notranji strani celične stene (Slaninova in sod., 2000). Tovrstne invaginacije so opazili tudi pri drugih mikroorganizmih, ki so bili izpostavljeni povečani slanosti (Javor, 1989). Na podlagi tovrstnih ugotovitev se predvideva, da hiperosmotski šok inducira spremembe v organizaciji celične stene, predvsem zaradi prerazporeditve matrične periplazmatske snovi in gradnikov celične stene v invaginacije plazemske membrane.

2.4.3.2 *Hortaea werneckii*

Črne kvasovke so temno obarvane zaradi sinteze DHN melanina, tako v slanih kot neslanih pogojih. Melaninske granule so pri črni kvasovki *Hortaea werneckii* nameščene bolj na površini celične stene. Študije ultrastrukture celične stene so pokazale, da je organizacija melaninskih granul odvisna od koncentracije soli v rastnem mediju. Melaninska zrna v celični steni halofilnih črnih kvasovk se s povečanjem slanosti pomaknejo proti zunanjim slojem celične stene in oblikujejo bolj strnjen sloj. Melanizacija je vezana tudi na starost celic. Omenjeni rezultati nakazujejo na potencialno vlogo melanina, kot osmoprotektanta celične stene pri halofilnih črnih kvasovkah (Kogej in sod., 2001).

Membranski lipidi črne kvasovke *Hortaea werneckii* med rastjo v gojišču z visokimi koncentracijami soli vsebujejo večje količine nenasičenih maščobnih kislin. Kvasovke se v hiperslanih okoljih med seboj razlikujejo tudi po razmerju med steroli in fosfolipidi, ki je pri nehalotolerantni *Saccharomyces cerevisiae* večje kot pri ekstremno halotolerantni kvasovki *Hortaea werneckii*. Omenjeno nas pripelje do zaključka, da ekstremno halotolerantne vrste pri spremenljivih slanostih ohranjajo večjo fluidnost membran kot na sol občutljive kvasovke (Turk in sod., 2004).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 SEVI IN RASTNI POGOJI

Raziskovali smo vpliv spremembe slanosti na morfologijo in debelino celične stene pri vseh treh vrstah rodu *Wallemia*: *W. sebi*, *W. muriae* in *W. ichtyophaga*; vrsti *Hortaea werneckii* in vrsti *Saccharomyces cerevisiae*. Dobili smo jih iz Mikrobiološke zbirke EXF Katedre za biologijo mikroorganizmov Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Preglednica 2: Oznake sevov, okolje ter država izolacije sevov iz mikrobiološke zbirke, uporabljene za diplomsko delo.

Vrsta	EXF oznaka	Oznake v drugih zbirkah	Okolje izolacije	Država Izolacije
<i>W. sebi</i>	EXF- 958	CBS 818.96	Seme sončnice, hiperslana voda	Švedska
<i>W. muriae</i>	EXF- 951	CBS 116628	Sečoveljske soline	Slovenija
<i>W. ichtyophaga</i>	EXF- 994	/	Sečoveljske soline	Slovenija
<i>Hortaea werneckii</i>	EXF- 225	MZKI B-736	Sečoveljske soline	Slovenija
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EXF-531	K-86 (w.t.)	/	/

Glive smo gojili v tekočih YNB gojiščih ustrezne slanosti, ki smo jih predhodno avtoklavirali pri 121 °C za 15 minut. Kulture smo inkubirali v temi pri 28 °C na rotacijskem stresalniku (180 obr/min). Kulture smo gojili do eksponentne faze rasti. Eksponentno fazo rasti za glive *Wallemia spp.* smo določili iz rastnih krivulj, ki so bile izdelane z merjenjem količine suhe biomase (Zajc, 2009). Eksponentno fazo rasti za glivi *Hortaea werneckii* in *Saccharomyces cerevisiae* smo določili z merjenjem optične gostote. Vsako izmed vrst smo gojili pri dveh izbranih slanostih. Optimalne ter maksimalne slanosti za rast posameznih vrst gliv, ki smo jih uporabili v poskusih, so navedene v tabeli 3:

Preglednica 3: Optimalne ter maksimalne slanosti za rast posameznih vrst gliv

	opt. slanost (% NaCl)	maks. slanost (% NaCl)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	5
<i>Hortaea werneckii</i>	10	20
<i>W. sebi</i>	5	20
<i>W. muriae</i>	5	20
<i>W. ichtyophaga</i>	15	25

3.2 METODE

3.2.1 Priprava histoloških preparatov za presevno elektronsko mikroskopijo (TEM) mikroorganizmov

Celice smo v eksponentni fazi rasti iz gojišča filtrirali skozi nitrocelulozni filter s porami velikosti 1,2 µm. Fiksirali smo jih tako, da smo jim dodali približno 1 ml fiksativa (2,5 % glutaraldehyd in 4 % paraformaldehid v 0,1 M fosfatnem pufru (pH 7,2)) in jih inkubirali 2 uri pri sobni temperaturi. Fiksativu smo dodali ustrezno količino NaCl, da smo v vzorcih imeli enako osmolarnost kot v ravnem mediju. Fiksirane vzorce smo nato trikrat sprali v 0,1 M fosfatnem pufru (pH 7,2) z ustreznim gradientom NaCl (3 x 10 minut). Da bi preprečili izgubo celic med nadaljnjim postopkom, smo jih imobilizirali tako, da smo na fiksirane in sprane vzorce kanili nekaj kapljic 3 % vodnega agarja (45-55 °C), jih dobro premešali in pustili, da se je agar strdil. Imobilizirane vzorce smo narezali v majhne blokce (1 x 1 x 5 mm), ki smo jih ponovno prenesli v epice. Sledila je postfiksacija z 1 % OsO₄ v 0,1 M fosfatnem pufru (pH 7,2) pri 4 °C za 1 uro. Po sekundarni fiksaciji smo vzorce 3 x po 10 minut spirali z 0,1 M fosfatnim pufrom (pH 7,2) in jih dehidrirali v naraščajoči alkoholni vrsti:

30 % EtOH:	10 min
50 % EtOH:	2 x 10 min
70 % EtOH:	2 x 10 min
80 % EtOH:	2 x 10 min
90 % EtOH:	2 x 10 min
100 % EtOH:	3 x 10 min

Preglednica 4: Postopek infiltracije in polimerizacije dehidriranih vzorcev:

INFILTRACIJA	100 % EtOH : Agar 100 = 1:1	2 uri
	Agar 100	čez noč
	Agar 100	1 ura
POLIMERIZACIJA	Agar 100	1 ura
	Agar 100	3 dni, 65 °C

Infiltrirane in polimerizirane vzorce smo z diamantnim nožem narezali na ultratanke rezine (70-80 nm) in jih kontrastirali z 2-4 % uranil acetatom ter svinčevim citratom po postopku, ki ga je opisala Kogejeva (2002).

Kontrastirane rezine smo analizirali s presevnim elektronskim mikroskopom PHILIPS CM 100 pri pospeševalni napetosti 80 kV in jih fotografirali z digitalnim fotoaparatom Gatan Bioscan Camera 792 na Oddelku za biologijo na Biotehniški fakulteti.

3.2.2 Priprava histoloških preparatov za vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM) mikroorganizmov

Celice smo v eksponentni fazi rasti iz gojišča s plastično brizgo filtrirali skozi polikarbonatni filter, nameščen v polipropilenskem filtrskem nosilčku (Agar Scientific).

Postopke fiksacije in dehidracije smo izpeljali enako kot pri pripravi histoloških preparatov za TEM. Postopka se razlikujeta le v zadnjih korakih, kjer vzorcev za FIB/SEM mikroskopijo nismo vklopili v paraplast temveč, smo jih osušili tako, da smo jim dodali 1,1,1,3,3,3- heksametildisilazan (HMDS) za 45 minut pri sobni temperaturi. Ko je ves HMDS izhlapel, smo suhe celice namestili na aluminijske nosilčke ter jih s pomočjo naparjevalca Bal-Tec SCD 050 naparili z zlatom. Tako pripravljene vzorce smo analizirali z FEI Strata DB 235M FIB/SEM elektronskim mikroskopom na Univerzi v Modeni, Italija.

3.3 MATERIALI

3.3.1 Kemikalije in reagenti

Preglednica 5: Seznam uporabljenih kemikalij s proizvajalcem in državo porekla

Kemikalija	Proizvajalec in poreklo
1,1,1,3,3,3- heksametildisilazan (HMDS)	
aceton	Merck, Darmstadt, Nemčija
agar agar	Biolife, Milano, Italija
Bacto pepton	Difco Lab., Detroit, Mi., ZDA
BDMA	Agar scientific
CSM (Complete Supplement Mixture)	Q-Biogene, Bio 101 Systems, Illkirch, Francija
DDSA	Agar scientific
etanol	Riedel- de Haën, Seelze, Germany
glukoza	Kemika, Zagreb, Hrvaška
glutaraldehyd	SPI-Chem, SPI Supplies, West Chester, ZDA
HMDS	Merck, Hohenbrun, Germany
KOH	Kemika, Zagreb, Hrvaška
MNA	Agar scientific
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Merck, Darmstadt, Nemčija
NaCl (POCH)	SODU chlorek CZ.D.A, Gliwice, Poland
NaH_2PO_4	Merck, Darmstadt, Nemčija
Na_2HPO_4	Merck, Darmstadt, Nemčija
ozmijev tetroksid, 4 % $[\text{OsO}_4]$	SPI-Chem, SPI Supplies, West Chester, ZDA
paraformaldehid	Fluka Chemie AG; Buchs, Švica
paraplast	Monoject Scientific Inc., Athy, Co. Kildare, Irska
sladni ekstrakt	Biolife, Milano, Italija
svinčev citrat $[\text{Pb}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$	SPI-Chem, SPI Supplies, West Chester, ZDA
uranil acetat	SPI-Chem, SPI Supplies, West Chester, ZDA
zlato	
YNB (Yeast Nitrogene Base)	Q-Biogene, Bio 101 Systems, Illkirch, Francija

3.3.2 Gojišča, raztopine in pufri

Gojišča

Priprava trdnih gojišč s sladnim ekstraktom (MEA):

sladni ekstrakt	20 g
pepton	1 g
glukoza	20 g
agar	20 g
destilirana voda	do 1000 ml
pH, uravnan na 7,0	

Priprava tekočih gojišč s kvasnim ekstraktom in dušikovo osnovo (YNB) :

CSM (Complete Supplement Mixture)	0,8 g
YNB (Yeast Nitrogene Base)	1,7 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0 g
glukoza	20,0 g
destilirana voda	do 1000 ml
pH, uravnan na 7,0	

Gojišču smo dodali ustrezno količino NaCl glede na želeno slanost gojišča.

Preglednica 6: Ustrezna količina NaCl v 1000 ml gojišča glede na želeno slanost gojišča

Odstotek NaCl v gojišču YNB (m/V)	Ustrezna količina NaCl v 1000ml gojišča
5 %	50 g
15 %	150 g
20 %	200 g
25 %	250 g

Gojišča smo avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Gojišča, ohlajena na sobno temperaturo, smo do uporabe shranili v hladni sobi pri 4 °C.

Raztopine in pufri

0,2 M natrijev fosfatni pufer (pH 7,2 pri 25 °C):

Založni raztopini:

I: 0,2 M dibazični natrijev fosfat : 28,39 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, destilirana voda do 1000ml

II: 0,2 M monobazični natrijev fosfat: 31,31 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, destilirana voda do 1000ml

0,1 M natrijev fosfatni pufer:

založna raztopina I	36 ml
založna raztopina II	14 ml
destilirana voda	do 100ml

Fiksativ:

2,5 % glutaraldehid in 4 % formaldehid v 0,1 M natrijevem fosfatnem pufru (pH 7,2):

25 % glutaraldehid	22 ml
10 % formaldehid	88 ml
0,2 M natrijevem fosfatni pufer (pH 7,2)	110 ml

Postfiksativ:

1 % OsO_4 v 0,1 M natrijevem fosfatnem pufru:

4 % OsO_4	4 ml
destilirana voda	4 ml
0,2 natrijev fosfatni pufer (pH 7,2)	8 ml

Pred uporabo ga ohladimo na 4 °C.

Kontrastirno sredstvo:

2-4 % uranil acetat v 50 % etanolu:

uranil acetat	200 do 400 mg
absolutni etanol	5 ml
bidestilirana voda	5 ml

Shranimo v temi za pleksi steklom.

Svinčev citrat:

10 N NaOH:

NaOH	4 g
bidestilirana H ₂ O brez CO ₂	10 ml

svinčev citrat:

10 N NaOH	0,2 ml
svinčev citrat	0,01 do 0,04 g
bidestilirana H ₂ O brez CO ₂	10 ml

Shranjujemo v hladilniku do 1 mesec.

3.3.3 Laboratorijski pribor, naprave in drugi pripomočki

Laboratorijski pribor uporabljen pri raziskovalnem delu:

- aluminijski nosilčki za vzorce pri elektronski mikroskopiji,
- cepilne zanke,
- injekcijske brizge,
- kapalke,
- laboratorijske rokavice (nepudrane lateks in nitrilne rokavice),
- laboratorijska steklovina (čaše, merilni valji, lij),

- mikrocentrifugirke (Eppendorf, Hamburg, Nemčija),
- mrežice za ultratanke rezine,
- nastavki za pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija),
- nitrocelulozni filtri s porami 1,2 μm (Millipore Co., Bedford, Mass., ZDA),
- objektiva in krovna stekelca,
- pincete,
- plastične petrijevke premera 70 mm (Golias, Slovenija),
- polavtomatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija),
- polikarbonatni filter (Agar scientific, Velika Britanija),
- polipropilenski filtrski nosilček (Agar scientific, Velika Britanija).

Laboratorijske naprave in drugi pripomočki:

Preglednica 7: Laboratorijske naprave in drugi pripomočki.

Naprava	Proizvajalec in poreklo
Avtoklav A-63C	Kambič, Semič, Slovenija
Digitalna kamera DP12	Olympus, Tokyo, Japonska
Električni grelnik	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Elektronski mikroskop FEI Strata DB 235M	FEI, Hillsboro, Oregon, ZDA
Elektronski mikroskop FEI Quanta 200 3D	FEI, Hillsboro, Oregon, ZDA
Laminarij IBK 1V2	Iskra, Slovenija
Lupa	Olympus, Tokyo, Japonska
Magnetno mešalo Rotamix 550MMH	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Mikrovalovna pečica	Gorenje, Slovenija
Mikrotom Leica 2040 Autocut	IMEB
Ultramikrotom Leica Reichert Ultracut S	IMEB
Naparjevalnik Bal-Tec SCD 050	Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein
PH meter Metrohm 713	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Presevni elektronski mikroskop Philips CM100 z digitalnim fotoaparatom Gatan Bioscan Camera 792	Philips
Spektrofotometer (UV/VIS)	Perkin Elmer, Waltham, ZDA
Stresalnik Innova 44	New Brunswick Scientific, Edison, ZDA

se nadaljuje

Nadaljevanje

Preglednica 7: Laboratorijske naprave in pripomočki

Naprava	Proizvajalec in poreklo
Svetlobni fazno-kontrastni mikroskop BX 51	Olympus, Tokyo, Japonska
Tehtnica EXACTA310 EB	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Vibracijski mešalnik	Tehtnica, Železniki, Slovenija

4 REZULTATI

4.1 MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI IN ULTRASTRUKTURA CELIČNE STENE GLIVE *WALLEMIA* SPP.

Opazovali smo morfologijo in ultrastrukturo celične stene pri glivah *Wallemia* spp., *Hortaea werneckii* in *Saccharomyces cerevisiae*, prilagojenih na rast pri različnih koncentracijah NaCl, da bi bolje spoznali vlogo celične stene pri osmoadaptaciji.

4.1.1 Makroskopski opis kulture

Glive vrst *Wallemia sebi*, *Wallemia muriae* in *Wallemia ichthyophaga* smo gojili na trdem YNB gojišču z ustrežno koncentracijo NaCl na 30 °C v temi. Po 14 dneh smo opazovali makroskopske značilnosti kolonij na ploščah.

Preglednica 8: Makroskopski opis kolonij iz rodu *Wallemia* na trdnem YNB gojišču pri nizki in visoki koncentraciji NaCl.

	<i>Wallemia sebi</i>		<i>Wallemia muriae</i>		<i>Wallemia ichthyophaga</i>	
	5 % NaCl	20 % NaCl	5 % NaCl	20 % NaCl	15 % NaCl	25 % NaCl
Barva, oblika kolonije	Belo-rjave, točkaste kolonije	Rjasto rjave z belim robom	Rjave, okrogle kolonije z belim robom	Rjave kolonije, nepravilnih oblik	Rjave do rumenkasto-olivno zelene, točkaste kolonije	Bele, rumeno-zelene kolonije, kupolastega profila
Rob	Valovit	Valovit	Valovit	Valovit	Valovit	Valovit
Konsistenca (ustroj)	Suhe, prašnate kolonije	Suhe, prašnate kolonije	Suhe, prašnate kolonije	Suhe, prašnate kolonije	Mehke, sluzaste kolonije	Mehke, sluzaste kolonije, nagubana površina
Hife	Se rahlo razraščajo v gojišče	Se rahlo razraščajo v gojišče	Se globoko razraščajo v gojišče	Se globoko razraščajo v gojišče	Se globoko razraščajo v gojišče	Se rahlo razraščajo v gojišče
Reverz	Rjav	Rjav	Rjav	Rjav	Rumen	Svetlo rumen

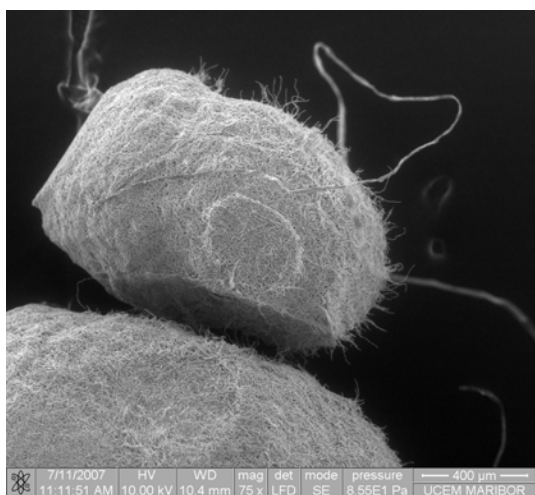
Točkaste kolonije glive *Wallemia* spp. so odvisno od koncentracije NaCl na gojišču YNB obarvane bež, zeleno, rjavo. Reverz kolonij je rjav. Oblika kolonij je spremenljiva, pahljačaste oblike, površina je prašnatega izgleda. Hife se pri vseh treh vrstah razraščajo v

gojišče. Na gojišču YNB z visoko koncentracijo NaCl kolonije rastejo počasneje (Preglednica 8).

4.1.2 Morfološke značilnosti in ultrastruktura celične stene pri vrstah *Wallemia sebi* in *Wallemia muriae*

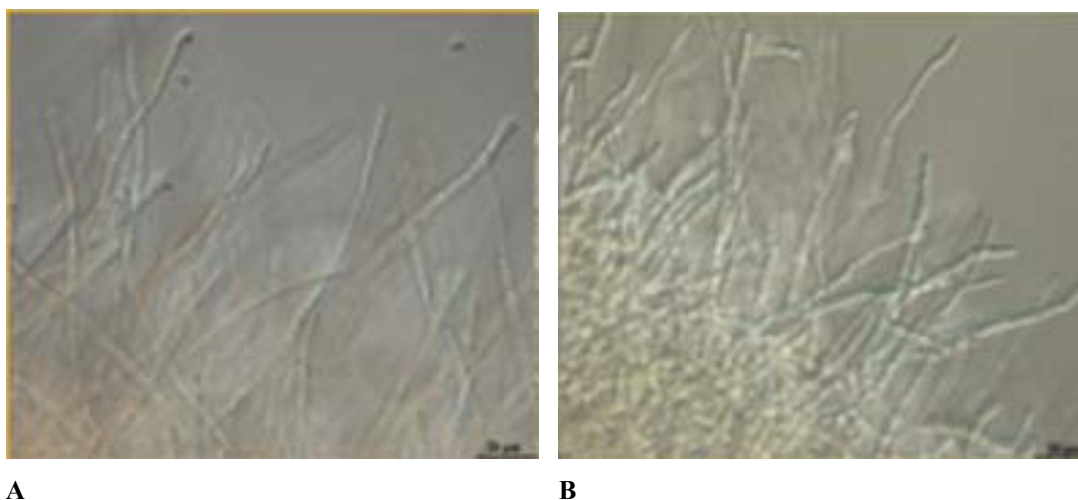
Na podlagi tesnega filogenetskega sorodstva ter zaradi podobnih morfoloških lastnosti smo se odločili rezultate o ultrastrukturi gliv vrste *Wallemia sebi* in *Wallemia muriae* predstaviti skupaj.

Pri 5 % in 20 % NaCl *Wallemia sebi* in *Wallemia muriae* rasteta v obliki filamentoznih hif, ki se prepletajo in tvorijo kompaktno micelijske pelete (Slika 4). V gojišču z nižjo koncentracijo soli so peleti temnejši, okroglih oblik in manjši, medtem ko so v gojišču z višjo koncentracijo NaCl svetlo rjave barve, zvezdastih oblik ter do nekajkrat večji.



Slika 4: Kompakten micelijski pelet glive *Wallemia sebi* pri 5 % NaCl, vrstična elektronska mikrofografija.

Pri visokih koncentracijah NaCl so se pojavile vidne spremembe v premeru hif pri obeh vrstah gliv *Wallemia sebi* in *Wallemia muriae*. Hife so krajše in razvejanost hif je večja v gojiščih z 20 % NaCl v primerjavi z gojišči z nižjo slanostjo (Slika 5). Večceličnih skupkov nismo opazili pri nobeni od testiranih slanosti.

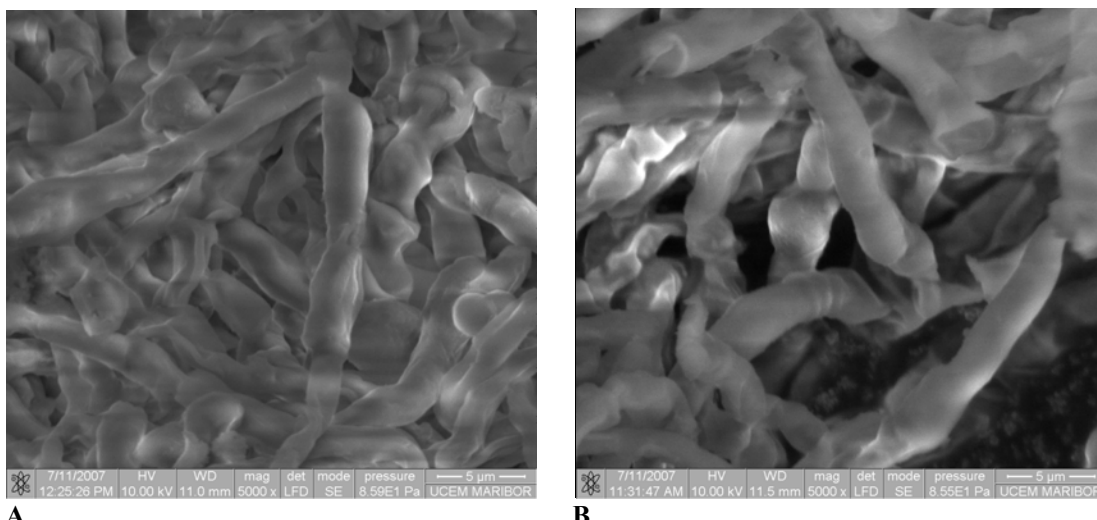


A

B

Slika 5: Vpliv koncentracije NaCl na morfologijo hif pri glivi *Wallemia sebi*; 5 % NaCl (A), 20 % NaCl (B); svetlobni mikroskop.

Vrstična elektronska mikroskopija micelijskih peletov gliv *Wallemia sebi* in *Wallemia muriae* je pokazala relativno gladko in urejeno površino hif pri obeh slanostih (Slika 6).

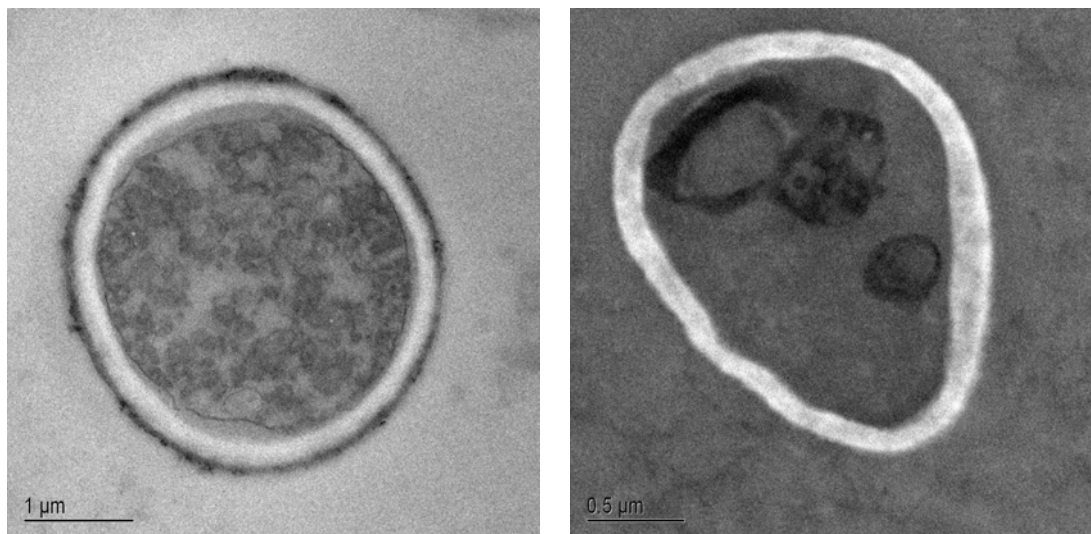


A

B

Slika 6: Površina hif glive *Wallemia muriae* pri 20% NaCl (A) in glive *Wallemia sebi* pri 5 % NaCl (B); vrstična elektronska mikrografija.

S transmisijskim elektronskim mikroskopom smo analizirali hife gliv *Wallemia sebi* in *Wallemia muriae*. Hife imajo pri 5 % NaCl intenzivnejšo pigmentacijo celične stene (Slika 7). Pri 20 % NaCl smo opazili majhno, a neizrazito zadebelitev celične stene pri obeh vrstah.

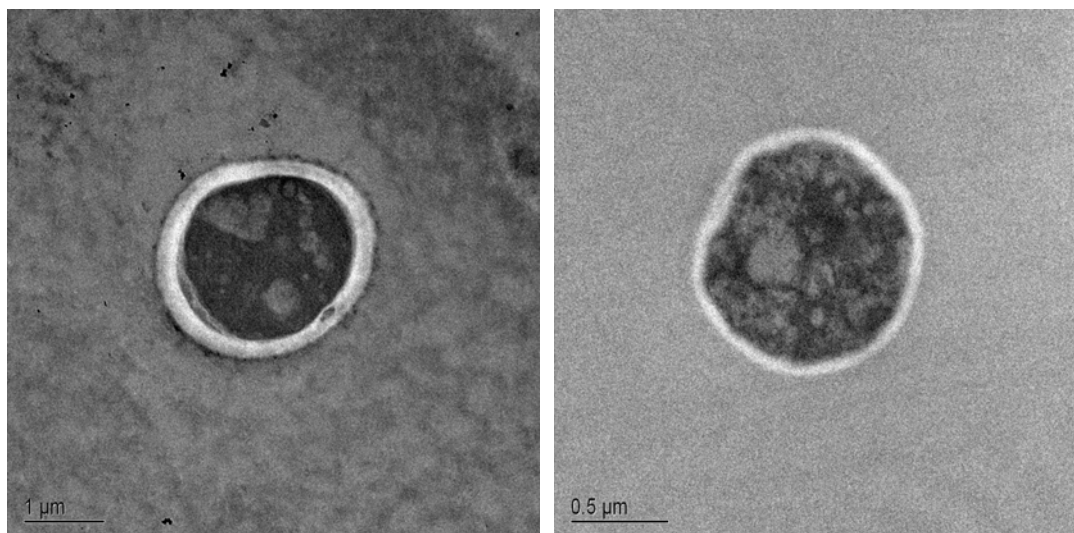


A

B

Slika 7: Pigmentacija in debelina celične stene pri glivi *Wallemia sebi* pri 5 % NaCl (A) in 20 % NaCl (B); presečna elektronska mikrofografija.

Pri višji slanosti so se pojavile nepravilne invaginacije plazemske membrane in povečana znotrajcelična vakuolizacija pri obeh vrstah (Slika 8).

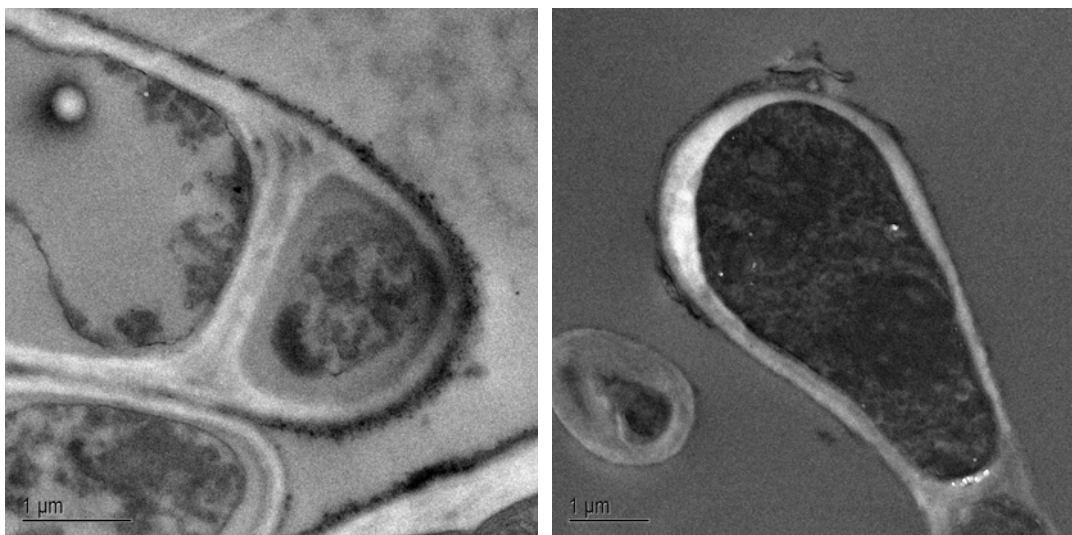


A

B

Slika 8: Invaginacije plazemske membrane in vsebnost vakuol pri glivi *Wallemia muriae* pri 5 % NaCl (A) in 20 % NaCl (B); presečna elektronska mikrofografija.

Neodvisno od koncentracije NaCl v rastnem mediju je zunanji sloj celične stene obeh vrst prekrit s fibrilarnimi ekstracelularnimi polimeri (Slika 9).



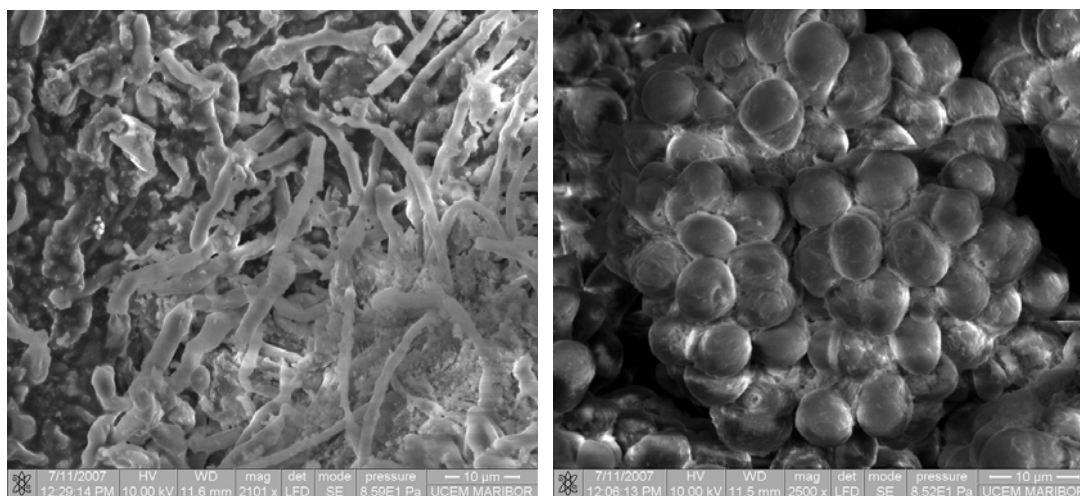
A

B

Slika 9: Ekstracelularni polimeri, ki prekrivajo zunanji sloj celične stene pri glivi *Wallemia sebi* 5 % NaCl (A) in 20 % NaCl (B); presečna elektronska mikrofografija.

4.1.3 Morfološke značilnosti in ultrastruktura celične stene pri vrsti *Wallemia ichthyophaga*

Najbolj očitna morfološka značilnost, po kateri se gliva *Wallemia ichthyophaga* razlikuje od ostalih dveh vrst *Wallemia sebi* in *Wallemia muriae*, je rast v večceličnih skupkih. Skupki so znatno večji pri rasti v mediju z 25 % NaCl (Slika 10).

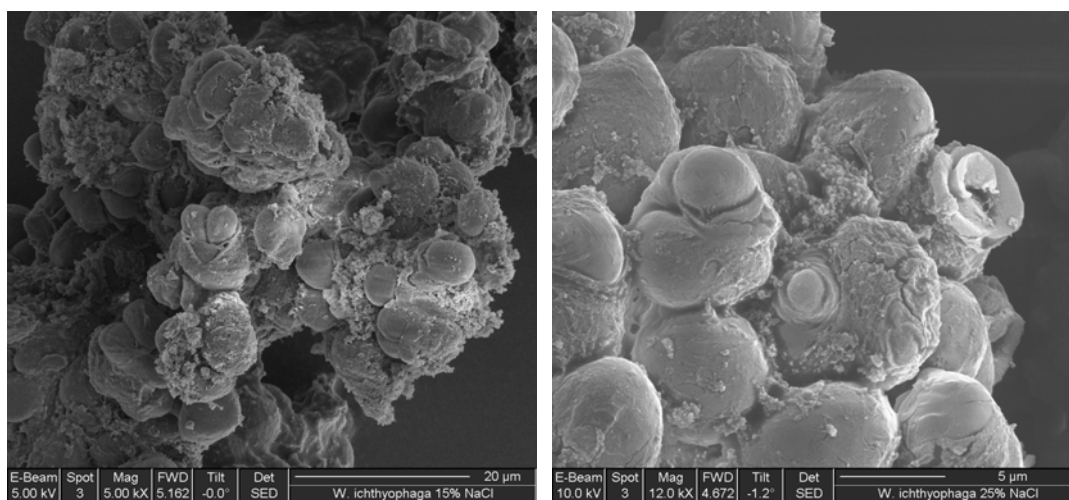


A

B

Slika 10: Nitasta rast glive *Wallemia muriae*, 20 % NaCl (A) in rast v večceličnih skupkih glive *Wallemia ichthyophaga*, 25 % NaCl (B); vrstična elektronska mikrofografija.

Spremembe, ki se pojavijo na površini večceličnih skupkov pri povešani slanosti, smo analizirali z vrstično elektronsko mikroskopijo. Površina celic je pri 25 % NaCl bolj nagubana in manj prekrita s fibrilarnimi ekstracelularnimi polimeri, ki zapolnijo prostore med celicami v večceličnih skupkih (Slika 11).



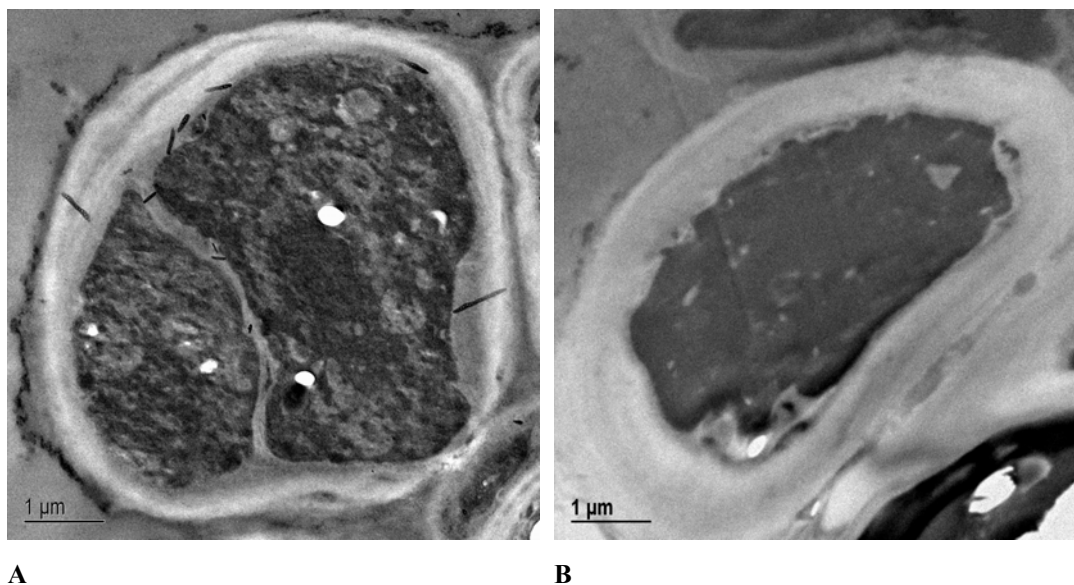
A

B

Slika 11: Vpliv slanosti na površino večceličnih skupkov pri glivi *Wallemia ichthyophaga* 15 % NaCl (A) in 25 % NaCl (B); vrstična elektronska mikrofografija.

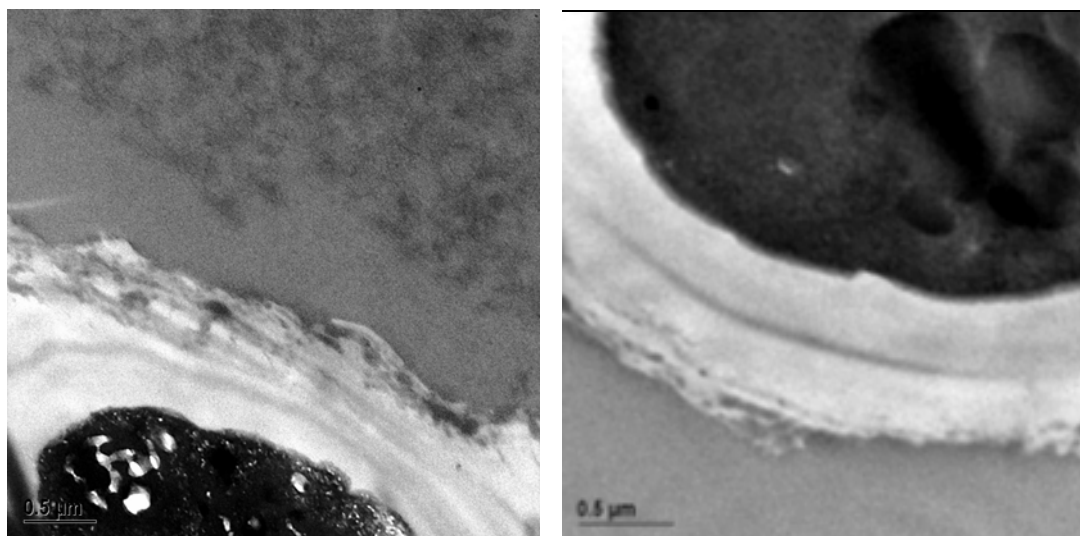
Znatne razlike v debelini celične stene vrste *Wallemia ichthyophaga*, ki je rastla pri 15 % in 25 % NaCl, smo opazili na slikah, pridobljenih s transmisijsko elektronsko

mikroskopijo. Stene sept so pri nižji slanosti prav tako tanjše. Pri 15 % NaCl je zunanji sloj celične stene prekrit s širokim, dobro-definiranim fibrilarnim slojem ekstracelularnih polimerov. Pri obeh slanostih se pojavljajo nepravilne invaginacije plazemske membrane (Slika 12).



Slika 12: Vpliv koncentracije NaCl na debelino celične stene pri glivi *Wallemia ichthyophaga* 15 % NaCl (A), 25 % NaCl (B); presečna elektronska mikrofografija.

Pri obeh slanostih smo opazili jasno strukturiranost debele celične stene. Sestavljena je iz tanjšega, elektronsko gostega zunanjšega sloja ter debelejšega, elektronsko prosojnega notranjšega sloja (Slika 13).



A

B

Slika 13: Strukturirana celična stena glive *Wallemia ichthyophaga* 25 % NaCl (A,B); presečna elektronska mikrofografija.

Morfološke lastnosti celic vrst *Wallemia sebi*, *Wallemia muriae* in *Wallemia ichthyophaga*, analizirane z elektronsko mikroskopijo, so prikazane v spodnji preglednici (Preglednica 9).

Preglednica 9: Morfološke lastnosti kolonij vrst *Wallemia sebi*, *Wallemia muriae*, *Wallemia ichthyophaga*, gojenih v tekočem YNB gojišču.

	<i>Wallemia sebi</i>		<i>Wallemia muriae</i>		<i>Wallemia ichthyophaga</i>	
	5 % NaCl	20 % NaCl	5 % NaCl	20 % NaCl	15 % NaCl	25 % NaCl
Celični tip	Hife	Hife	Hife	Hife	Večcelični skupki	Večcelični skupki
Invaginacije plazemske membrane	-	+	-	+	+	+
Ekstracelularni polimeri	+	+	+	+	++	+

4.2 MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI IN ULTRASTRUKTURA CELIČNE STENE GLIVE *HORTAEA WERNECKII*

Glivo *Hortaea werneckii* smo gojili na trdnem ter v tekočem YNB gojišču z 10 % in 20 % NaCl.

4.2.1 Makroskopski opis kulture

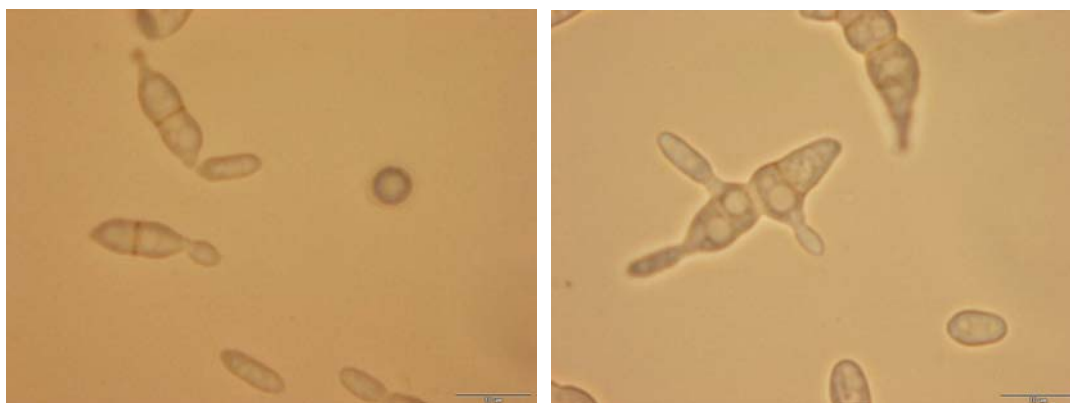
Po desetih dnevih so na trdnem YNB gojišču z 10 % NaCl vidne olivno zelene kolonije z difuznim robom, prekrte s tankimi, belimi zračnimi hifami. Centralni del kolonij je rahlo dvignjen. Reverz je črn. Po 14 dneh so kvasne celice pretežno prekrte z gostejšimi belimi zračnimi hifami.

Rast glive *Hortaea werneckii* na YNB gojišču z 20 % NaCl je počasnejša, saj je premer kolonije po 14 dneh manjši kot pri rasti pri nižji slanosti. Kvasne celice so svetlejšje in popolnoma preraščene z belimi zračnimi hifami.

4.2.2 Morfologija in ultrastruktura celične stene pri vrsti *Hortaea werneckii*

Morfologijo in ultrastrukturo celične stene glive *Hortaea werneckii* smo opazovali s presevnim in vrstičnim elektronskim mikroskopom.

V gojišču z 10 % NaCl gliva *Hortaea werneckii* raste v kvasni obliki in tvori eno- in dvocelične konidije, medtem ko pri visoki koncentraciji NaCl gliva raste v obliki večceličnih skupkov in tvori večcelične konidije (Slika 14). Konidiji so pri obeh slanostih svetlo rjavi, elipsoidni z eno ali več sept.

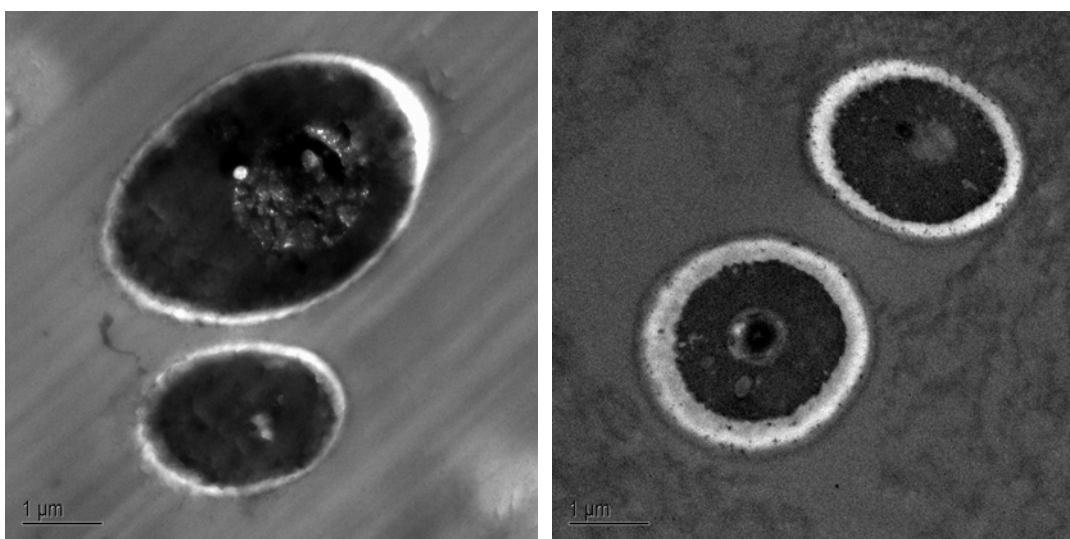


A

B

Slika 14: Gliva *Hortaea werneckii* v gojišču z 10 % NaCl (A) in 20 % NaCl (B).

Celično steno glive *Hortaea werneckii* smo opazovali s transmisijskim elektronskim mikroskopom. Debelina celične stene se pri 20 % NaCl rahlo poveča (Slika 15).



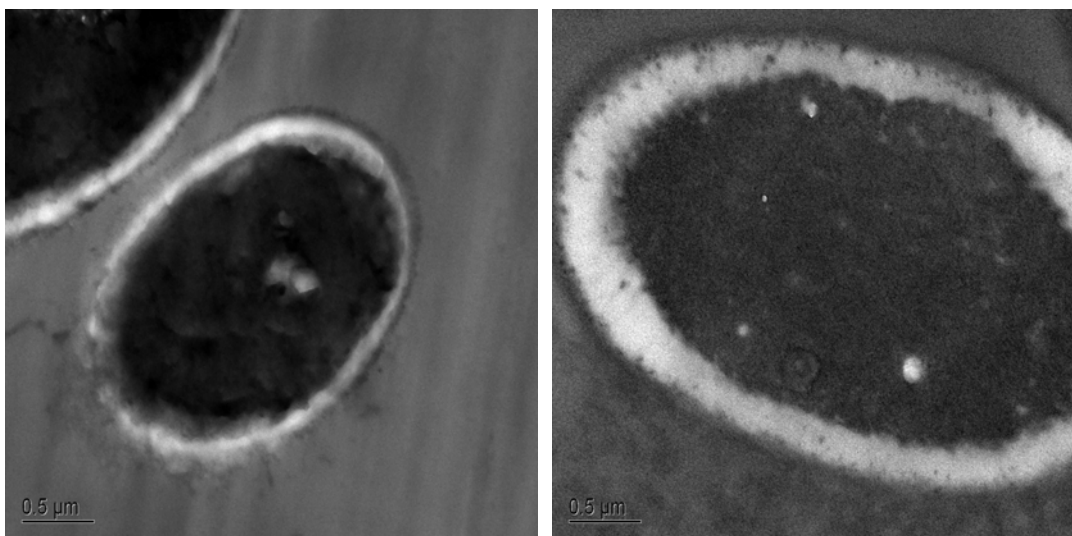
A

B

Slika 15: Debelina celične stene glive *Hortaea werneckii*, pri 10 % NaCl (A) in 20 % NaCl (B); presečna elektronska mikrofotografija.

Pri nižji slanosti je vidna strukturiranost celične stene, ki je sestavljena iz dveh slojev: notranjega elektronsko gostega ter zunanega elektronsko prosojnega. Pri 20 % NaCl slojevitost celične stene glive *Hortaea werneckii* ni več opazna in je iz enega, elektronsko prosojnega sloja.

Na mikrografijah presevne mikroskopije smo ob povišani slanosti opazili spremembe v pigmentaciji celične stene glive *Hortaea werneckii*. Pri obeh slanostih so melaninska zrna vidna, kot elektronsko goste granule. Pri rasti v gojišču z 10 % NaCl jih najdemo predvsem na površini celične stene in ne tvorijo enotnega melaninskega sloja. Pri višji slanosti so melaninska zrna posamična, manjša in se pomaknejo predvsem v zunanji sloj celične stene (Slika 16). EPS se nahaja na zunanji strani celične stene glive *Hortaea werneckii* v obliki kratkih fibril in je viden pri obeh slanostih.

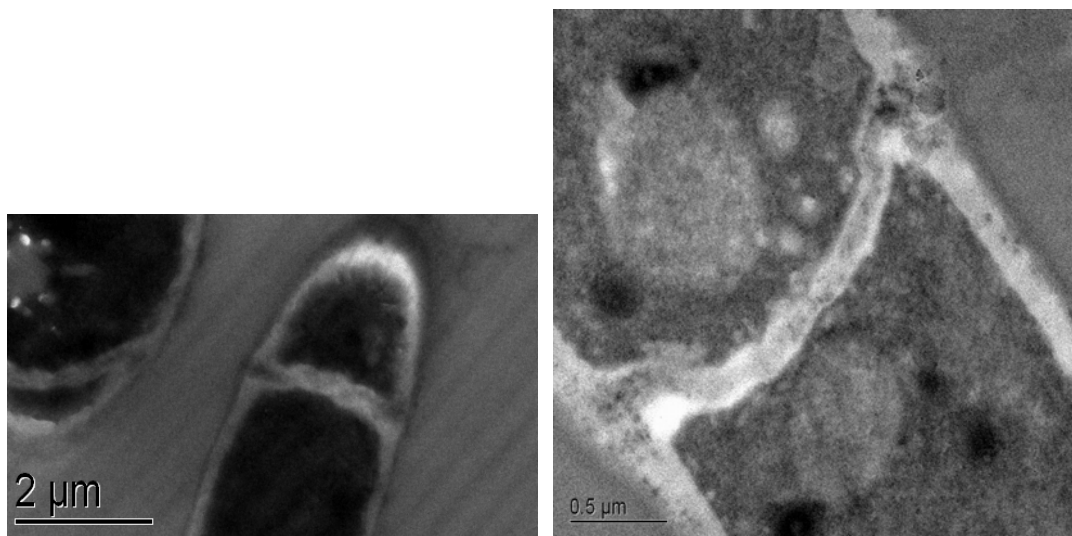


A

B

Slika 16: Organiziranost melaninskih granul in EPS v celični steni glive *Hortaea werneckii* pri 10 % NaCl (A) in 20 % NaCl (B); presevna elektronska mikrografija.

Septe so vzdolžne, prečne in nepravilne. Pri obeh slanostih v septih najdemo posamična melaninska zrna (Slika 17).

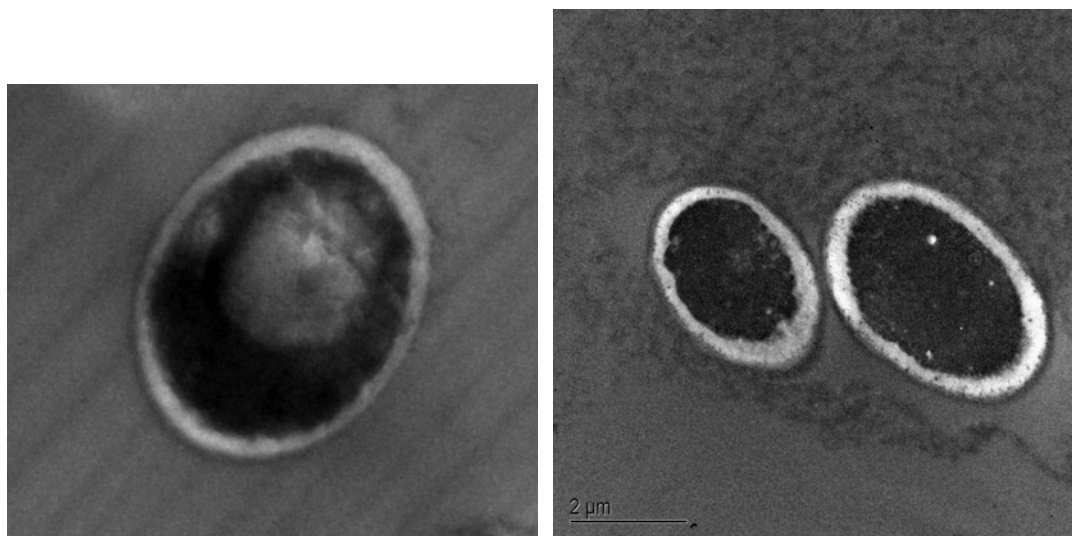


A

B

Slika 17: Prečni septum pri glivi *Hortaeta werneckii* pri 10 % NaCl (a) in 20 % NaCl (b); presevna elektronska mikrofografija.

Nagubanost celične stene glive *Hortaeta werneckii* je opažena pri obeh slanostih, izrazitejša pa je pri visokih slanostih (Slika 18).

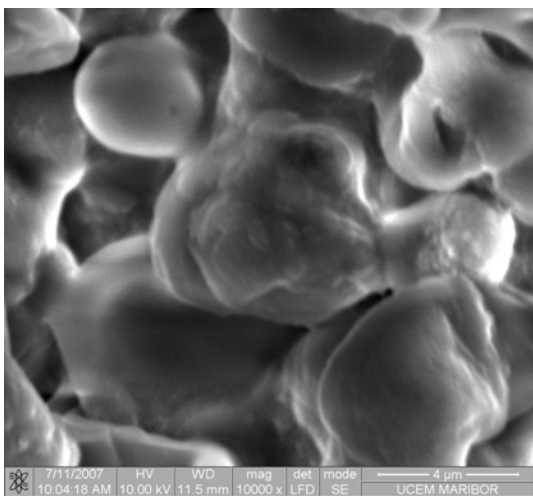


A

B

Slika 18: Invaginacije plazemske membrane glive *Hortaeta werneckii* pri 10 % NaCl (a) in 20 % NaCl (b); presevna elektronska mikrofografija.

Z vrstično elektronsko mikroskopijo smo opazovali površino glive *Hortaeta werneckii*, ki je rastle v tekočem gojišču brez soli. Površina celic je nagubana in viden je EPS (Slika 19).

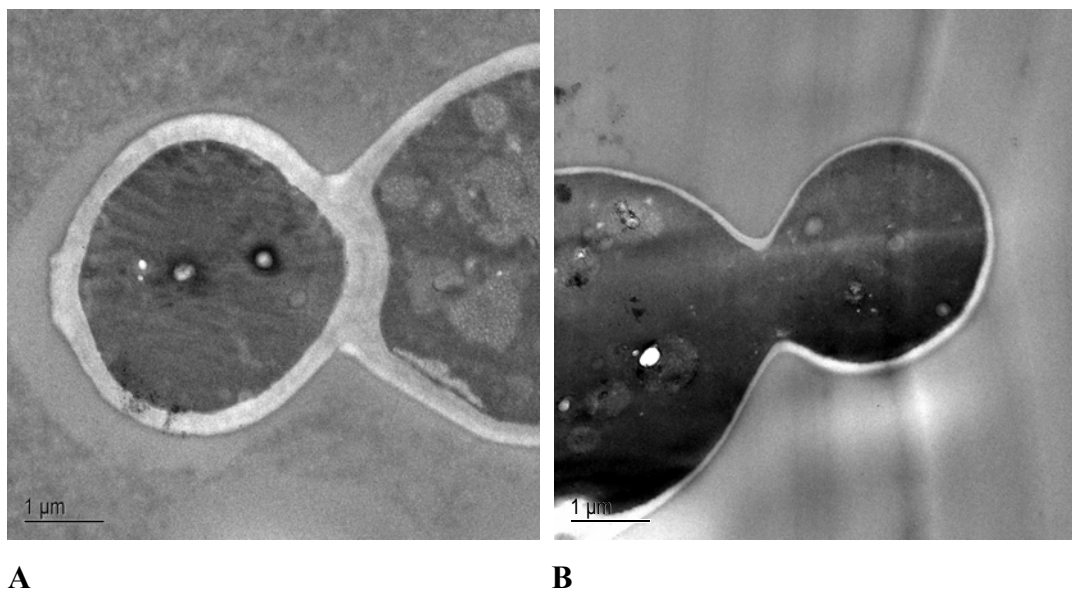


Slika 19: Površina glive *Hortaea werneckii*, ki je rasla na gojišču brez soli; vrstična elektronska mikrofografija.

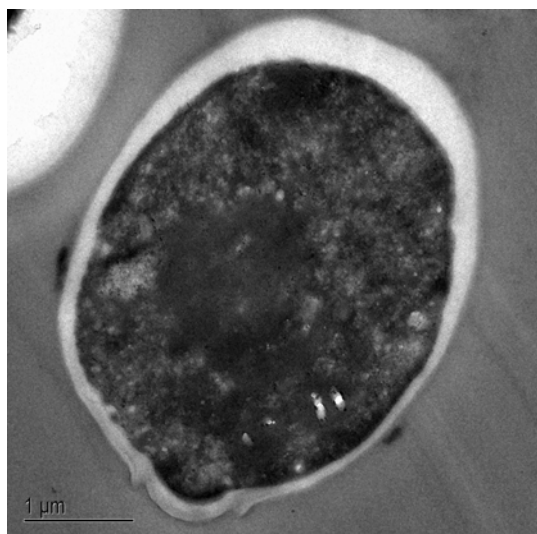
4.3 MORFOLOGIJA IN ULTRASTRUKTURA CELIČNE STENE PIVSKE KVASOVKE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Saccharomyces cerevisiae smo gojili v tekočem YNB gojišču brez dodatka soli ter pri 5 % NaCl.

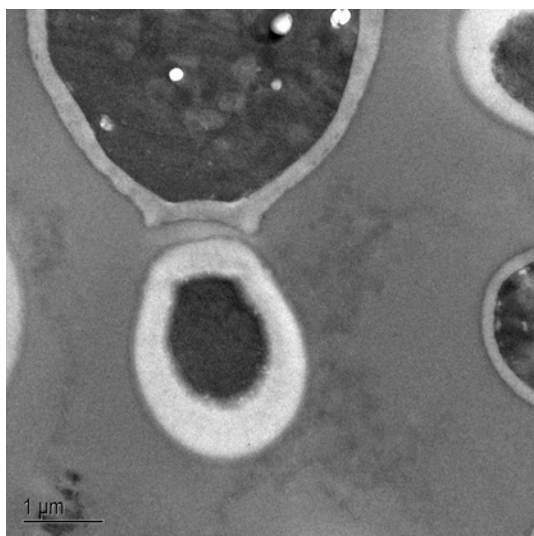
Celična stena kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* je iz elektronsko prosojnega notranjega ter elektronsko gostega zunanjega sloja. Ob rasti v gojišču s 5 % NaCl se debelina celične stene kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* znatno zmanjša (Slika 20) in opazne so globoke invaginacije plazemske membranene (Slika 21). Po končanem brstenju na površini celične stene ostanejo za kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* značilne brazde brstov, bogate s hitinom (Slika 22).



Slika 20: Debelina celične stene kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* pri 0 % NaCl (A) in 5 % NaCl (B); presevna elektronska mikrofografija.

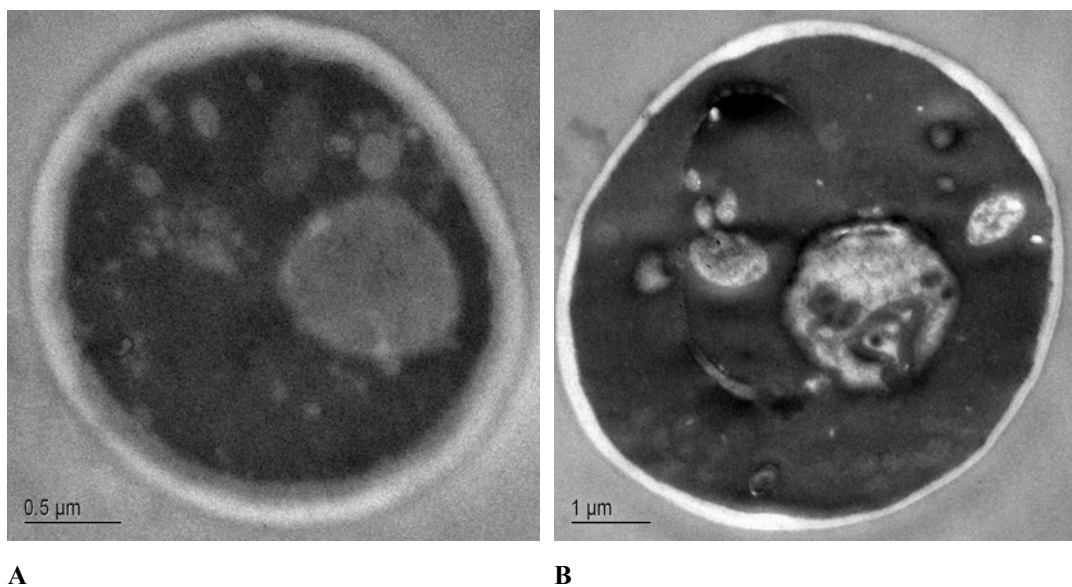


Slika 21: Globoke invaginacije plazemske membrane so vidne pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* v gojišču s 5 % NaCl; presevna elektronska mikrofografija.



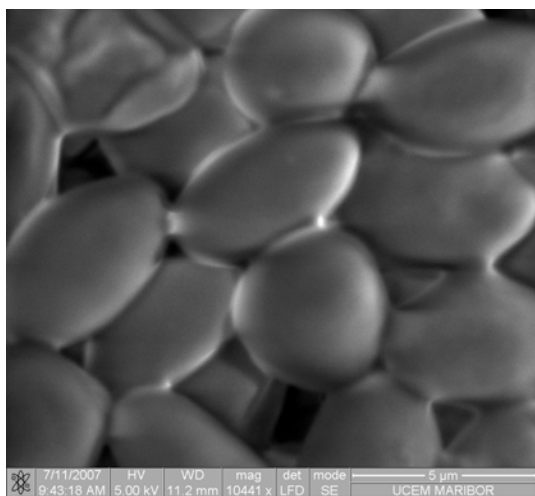
Slika 22: Brazgotina, ki ostane na površini celične stene kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* v gojišču brez soli po končanem brstenju; presevna elektronska mikrofografija.

S presevnim elektronskim mikroskopom smo vakuole kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* opazili pri rasti v gojišču brez soli ter pri rasti v gojišču s 5 % NaCl (Slika 23).



Slika 23: Vakuole kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* v gojišču brez soli (A) in pri 5 % NaCl (B); presevna elektronska mikrofografija.

Vrstična elektronska mikroskopija je pokazala, da je površina kvasnih celic *Saccharomyces cerevisiae* pri 0 % NaCl gladka in ekstracelularni polimeri niso vidni (Slika 24).



Slika 24: Gladka površina kvasnih celic *Saccharomyces cerevisiae* pri 0 % NaCl; vrstična elektronska mikrofografija.

5. RAZPRAVA IN SKLEPI

RAZPRAVA

Ob upoštevanju pomembnosti vloge, ki jo ima celična stena pri zaščiti v spremenljivih fizikalno-kemijskih pogojih slanih okolij, smo se odločili za študijo o vplivu visoke koncentracije NaCl na morfologijo celične stene gliv. Vpliv slanosti na morfološke spremembe gliv rodov *Wallemia*, *Hortaea* in *Saccharomyces* smo opazovali s svetlobnim, transmisijskim in vrstičnim elektronskim mikroskopom. S pomočjo presevnega in vrstičnega mikroskopa smo med seboj primerjali morfološke spremembe ob osmotskemu stresu pri glivah iz rodu *Wallemia*.

Hiperslani habitati mikroorganizmov so okolja, kjer je dostopnost vode omejena zaradi visoke koncentracije soli (največkrat NaCl). Dostopnost vode strokovno definiramo s terminom vodna aktivnost (a_w), ki zaradi pojava osmoze pomembno vpliva na rast in življenje mikroorganizmov. Organizme, ki so sposobni rasti pri vodni aktivnosti 0,85 (17 % NaCl) in manj, imenujemo kserofili (Gunde-Cimerman in sod., 2005a).

V našem raziskovalnem delu smo glive iz rodu *Wallemia* gojili na trdnih YNB gojiščih ter submerzno v tekočem YNB gojišču pri izbranih slanostih. Na podlagi objav o ekologiji in območju slanosti gliv iz rodu *Wallemia* spp. smo za rast izbrali dve različni koncentraciji (optimalno in visoko) NaCl za vsako vrsto. Bazidiomicetni glivi vrst *Wallemia sebi* in *Wallemia muriae* smo gojili submerzno, in sicer v bogatem, kemijsko definiranim tekočem gojišču YNB s 5 % in z 20 % NaCl. Ker je optimalna vodna aktivnost za rast glive *Wallemia ichthyophaga* nižja ($a_w = 0,90$), smo jo gojili pri 15 % in 25 % NaCl. Pri vseh treh vrstah smo opazili dobro rast pri obeh slanostih, zato lahko potrdimo ugotovitve raziskav (Zalar in sod., 2005a), da so glive iz rodu *Wallemia* kserofilne ali kserotolerantne. Ker je največ študij osmoadaptacije bilo narejenih na mezofilni askomicetni kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*, pri kateri je najnižja a_w , ki še dovoljuje rast 0,96 (7 % NaCl), smo jo v naši študiji o vplivu hiperosmotskega stresa na morfologijo celične stene izbrali za referenčni mikroorganizem.

Ker kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* najbolje raste brez soli, smo v eksperimentu za optimalno rastno slanost izbrali 0 % NaCl, za slanost hiperosmotskega stresa pa 5 % NaCl.

Askomicetno črno kvasovko *Hortaea werneckii* smo gojili v gojišču s 15 % in 25 % NaCl. Po definiciji, ki so jo vpeljali Gunde-Cimermanova in sodelavci (2005), je *Hortaea werneckii* pravi halofil, saj je bila izolirana iz okolja s 17 %-32 % NaCl (Sečoveljske soline, Slovenija) ter je *in vitro* sposobna rasti na 17 % NaCl. Zalar in sodelavci (1999) so glivo *Hortaea werneckii* označili za fakultativni halofil, ki je sposoben rasti v širokem območju slanosti (0 %-30 % NaCl) ter ima v slanih okoljih kompetitivne prednosti pred halotolerantnimi mikroorganizmi. Po omenjenem selektivnem kriteriju uvrščamo med prave halofile vse tri vrste iz rodu *Wallemia* (Zalar in sod., 2005a). Mikroorganizmi so definirani kot halotolerantni v primeru, da so izolirani iz vod z nizko slanostjo in so *in vitro* sposobni rasti do 17 % NaCl. Ker je za *Saccharomyces cerevisiae* rast nad 7 % NaCl toksična, jo opredelimo za na slanost občutljivo kvasovko. *Hortaea werneckii* in *Wallemia Ichthyophaga* sta edini od preučevanih vrst, ki lahko raste pri nasičenih koncentracijah NaCl ($a_w = 0.77$) (Zalar in sod., 2005a; Gunde-Cimerman in sod., 2000), zato ju imenujemo tudi ekstremofila.

Številne študije opisujejo vplive, ki jih povzroči hiperslano okolje na ekspresijo genov ter na metabolno aktivnost gliv, medtem ko je nas zanimal predvsem vpliv koncentracije NaCl na morfologijo celične stene. Filogenetsko med seboj najbolj sorodni vrsti *W. sebi* in *W. muriae*, gojeni submerzno, sta pri obeh koncentracijah soli rastli v obiki filamentoznih hif, ki se med seboj prepletajo v micelijske pelete. Pri nizki stopnji slanosti so hife zaščitene v urejenih, kompaktnih peletih, medtem ko so pri visoki slanosti hife krajše, bolj razvejene in peleti postanejo svetlejši, ohlapni in nepravilnih oblik. Podoben pojav spremembe v morfologiji peletov so opisali Kelavkar in sodelavci (1993) pri halotolerantni glivi *Aspergillus repens*. Razloge za spremembe v morfologiji peletov pri visokih slanostih bi lahko iskali tudi v zmanjšani topnosti kisika v hiperslanih okoljih (Grant, 2004) ter večji potrebi po nutrientih, saj sinteza osmolitov za vzdrževanje turgorskega pritiska zahteva višje energetske vnose (Brown, 1976). Razvejene hife v ohlapnih peletih povečajo površino, ki je v neposrednem kontaktu z okoljem, kjer so razpoložljivi nutrienti in kisik. Posvetlitev peletov pri visokih slanostih bi lahko bila na račun zmanjšane sinteze pigmentov. Čeravno celična pigmentacija nudi celici zaščito pred negativnimi vplivi iz okolja (Kogej in sod., 2007), bi sinteza pigmentov (energetsko izredno drag proces) lahko

bila zreducirana zaradi povečane porabe energije za druge procese osmoadaptacije (Oren, 1999).

W. ichthyophaga - za razliko od ostalih dveh vrst iz rodu *Wallemia* - raste v obliki večceličnih skupkov oziroma, kot jih poimenuje Zalar in sodelavci (2005a), v sarcinam podobnih strukturah. Večcelični skupki so v hiperslanem okolju neprimerno večji. Rast v večceličnih skupkih smo zasledili tudi pri filogenetsko oddaljeni askomicetni črni kvasovki *Hortaea werneckii*. Prednosti, ki jih v naravnem okolju prinaša rast v večceličnih skupkih, je po mnenju Palkove in Vachove (2006) veliko, saj so celice v notranjosti skupka zaščitene pred škodljivimi vplivi iz okolja. Rast v večceličnih skupkih celicam omogoča lažjo kolonizacijo in tako poveča možnost preživetja v stresnem okolju. Na primeru *W. ichthyophaga* iz objavljenega lahko predpostavimo, da se v hiperslanem okolju celice zunanje plasti večceličnega skupka »žrtvujejo« na račun notranje biomase, ki je tako zaščitena pred osmotskim stresom. Primere tovrstne zaščite znotraj skupnosti so pri kvasovki že odkrili in opisali (Scherz in sod., 2001; Engelberg in sod., 1998).

Hipotezo, da visoka slanost vpliva na spremembe v ultrastrukturi celične stene halofilnih gliv iz rodu *Wallemia*, smo preverjali s pomočjo preseвне in vrstične mikroskopije. Rezultati so pokazali, da se zadebelitev celične stene pri visoki slanosti pojavi pri vseh treh vrstah iz rodu *Wallemia*. Z razliko od *W. muriae* in *W. sebi*, kjer se debelina celične stene hif le malenkostno poveča, se pri *W. ichthyophaga* debelina celične stene skupka poveča signifikantno. Zadebelitve celične stene, kot odziv na povišano slanost, so predhodno že opisali Kogej in sodelavci (2006a) pri halofilnih črnih kvasovkah rodu *Trimmatostroma*. Razlika v debelini celične stene je verjetno povezana s spremenjeno molekulsko sestavo in stopnjo razvejenosti polisaharidov v celični steni ob povišani slanosti (Lesage in sod., 2006; Smits in sod., 2001).

Halofilni črni kvasovki se ob rasti pri povišani slanosti celična stena prav tako zadebeli. Opisano je, da se debelina in melanizacija celične stene pri črni kvasovki *Hortaea werneckii* spreminja glede na življenski cikel (de Hoog in sod., 1992) ter pri rasti v hiperslanem okolju (30 % NaCl) (Zalar in sod., 1999). Zadebelitev celične stene je tudi po mnenju Clipsona in sod. (1989) eden od mehanizmov, ki glivi omogoča rast v slanah okoljih.

Obratne rezultate smo dobili pri študiji elektronskih mikrografij kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*. Celična stena se je pri rasti na 5 % NaCl stanjšala. Podobno zmanjšanje debeline celične stene sta Kogej in Gunde-Cimerman (neobjavljeno) opazili pri halotolerantni črni kvasovki *Aureobasidium pullulans* ob povišani slanosti (17 % NaCl). Jiang in sodelavci (1995) so dokazali, da komponente HOG signalne poti vplivajo na ekspresijo genov, ki kodirajo encime potrebne za preoblikovanje celične stene ob osmotskem stresu. Iz napisanega lahko predvidevamo, da je povečanje debeline celične stene ob osmotskem stresu lastno le halofilnim mikroorganizmom, ki so že visoko adaptirani na življenje v hiperslanih okoljih. Kateri molekularni in fiziološki procesi sodelujejo pri zadebelitvi celične stene pri kserofilni glivi *W. ichthyophaga*, ostaja predmet nadaljnjih raziskav. Nekateri raziskovalci predpostavljajo, da lahko vzroke za zadebelitve celične stene pripišemo novo vstavljenim proteinom (Smits in sod., 2001), povečanemu hitinskemu sloju (Klis in sod., 2002; Kapteyn in sod., 1999), ali pa dodatni zaščiti s strani pigmentov (Kogej in sod., 2007). Povečana debelina celične stene poveča odpornost pred β 1,3- glukanazno razgradnjo (Klis in sod., 2002) in tako bolje zaščiti notranji solj celične stene in plazemsko membrano.

Poleg zadebelitve celične stene je pri črni kvasovki *Hortea werneckii* izrazita morfološka sprememba ob hiperosmotsekm stresu tudi prerazporeditev pigmenta. Pigmentacija celične stene glive *Hortaea werneckii* je bila opažena pri obeh slanostih. Melaninska zrna so na mikrografijah presevalne mikroskopije vidna kot elektronsko-goste granule, ki so prisotne v zunanjem sloju celične stene ter na zunanji površini sept. Ob rasti pri povišani slanosti smo opazili spremembe v prerazporeditvi pigmenta v celični steni. Pri obeh slanostih so melaninska zrna vidna kot elektronsko goste granule. Pri rasti v gojišču z 10 % NaCl jih najdemo predvsem na površini celične stene in ne tvorijo enotnega melaninskega sloja. Pri višji slanosti so melaninska zrna posamična, manjša in se pomaknejo predvsem v zunanji sloj celične stene. Kogej in sodelavci (2007) so na osnovi svojih raziskav postavili hipotezo, da melanizacija celične stene glive *Hortaea werneckii* zmanjša prepustnost za najpomembnejši kompatibilni topljenec glicerol. Melanizacija je eden od pomembnih mehanizmov, ki glivi omogoča rast v širokem razponu koncentracij NaCl. Obarvanost hif gliv iz rodu *Wallemia* spp. je pri 5 % NaCl intenzivnejša kot pri 20 % NaCl. Granul

pigmenta, ki so značilne za melanizirane črne kvasovke, tukaj nismo opazili in objav o morebitnem pigmentu nisem zasledila.

Presevna elektronska mikroskopija je razkrila strukturiranost celične stene črne kvasovke *Hortaea werneckii* ter celične stene *Wallemia* spp. Notranji elektronsko gostejši ter zunanji elektronsko prosojen sloj je pri glivi *Hortaea werneckii* opazen le pri nižji slanosti (10 % NaCl). Ob povečani slanosti je celična stena iz enotnega elektronsko prosojnega sloja. Notranji sloj celične stene askomicetnih gliv celicam daje mehansko trdnost ter je vezavno mesto proteinov zunanjega sloja. Pri *Wallemia* spp. in *Saccharomyces cerevisiae* je - za razliko od črne kvasovke - strukturiranost celične stene vidna tako pri nizki, kot pri visoki slanosti. Elektronsko prosojen notranji sloj celične stene vsebuje predvsem mikrofibrilarno mrežo polisaharidov, medtem ko je zunanji elektronsko-gost sloj iz manoproteinov, ki so kovalentno vezani na polisaharide celične stene (Klis in sod., 2002; De Groot in sod., 2005).

Površino celic ter prisotnost ekstracelularnih polimerov (EPS) smo opazovali s pomočjo vrstične elektronske mikroskopije. Površina hif micelijskih peletov gliv *Wallemia sebi* in *Wallemia muriae* je bila pri obeh slanostih gladka in prekrita z EPS. Gladka je bila tudi površina kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, le da EPS nismo opazili. Obstajajo zapisi (Kuthan in sod., 2003) o filamentoznem ekstracelularnem matriksu, ki prekriva celice divjega tipa kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* in je po strukturi analogen bakterijskim eksopolisaharidom. Vloga eksopolisaharidov v naravnih okoljih, kjer prihaja do stratifikacije nutrientov ter kisika, je ključna za medcelične interakcije znotraj večceličnih združb (Palkova in Vachova, 2006).

Površina filogenetsko nekoliko oddaljene *W. ichthyophaga* se je pričakovano razlikovala od ostalih dveh vrst rodu *Wallemia*. Večceličnih skupki *W. ichthyophaga* so pri 15 % NaCl močno prekriti z ekstracelularnimi polimeri, ki zapolnijo prostore med celicami v večceličnih skupkih. Pri rasti na 25 % NaCl je površina celične stene skupkov bolj nagubana kot pri nižji slanosti. Eksopolisaharidi so v velikih količinah vidni tudi na površini črne kvasovke *Hortaea werneckii*, ko raste v gojišču brez soli. Produkcija EPS je morfološka značilnost črnih gliv skal iz puščavske Antarktike in ima pomembno vlogo pri

zaščiti celic pred izsušitvijo in zamrznitvijo (Selbmann in sod., 2005). Zaščitna funkcija EPS je bila opisana tudi pri drugih evkariontih, in sicer pri algi *Dunaliella salina*, kjer je produkcija EPS naraščala sorazmerno s povečanjem koncentracije soli v mediju.

Izgleda, da ima EPS pri halotolerantnih in halofilnih glivah pomembno zaščitno vlogo v neugodnih rastnih pogojih. Kralj-Kunčič in sod. (2008) je na podlagi dejstev, da je EPS pri halofilni glivi *W. ichthyophaga* v večjih količinah prisoten pri nizki slanosti (15 % NaCl) ter da vrsta ni sposobna rasti na nižji koncentraciji soli kot je 9 % NaCl, izpostavila, da so za halofilno glivo *W. ichthyophaga* pogoji za rast pri 15 % NaCl neugodni.

Hiperosmotski stres inducira spremembe v organizaciji celične stene, ki je viden tudi kot prerazporeditev periplazmatskega matriksa in matriksa celične stene v invaginacije plazemske membrane. Invaginacije plazemske membrane smo opazili pri *Wallemia* spp., in sicer pri obeh slanostih, s to razliko, da so le pri vrsti *W. ichthyophaga* invaginacije izrazitejše pri nizki slanosti (15 % NaCl). Pri črni kvasovki *Hortaea werneckii* smo pri visokih slanostih opazili nagubanost celične stene (20 % NaCl). Pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*, ki je bila izpostavljena osmotskemu stresu (5 % NaCl), smo s pomočjo preseвне elektronske mikroskopije prav tako opazili globoke invaginacije plazemske membrane. Membranske invaginacije naj bi predstavljale površinsko rezervo, saj se večajo glede na trenutni turgorski tlak. Globoke invaginacije plazemske membrane, ki se tvorijo ob hiperosmotskem stresu, so komplementarne izboklinam na notranji strani celične stene (Slaninova in sod., 2000). Tovrstne invaginacije so opazili tudi pri drugih mikroorganizmih, ki so bili izpostavljeni povečani slanosti (Javor, 1989).

Povečano vakuolizacijo citoplazme smo opazili pri *W. sebi*, *W. murie* in *Saccharomyces cerevisiae* ob rasti pri povišani slanosti. V svoji študiji sta Latterich in Watson (1993) dokazala, da vakuole kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* sodelujejo v takojšnjem odzivu na osmotski stres, in sicer celici omogočijo preživetje, vse dokler osmoadaptacijska akumulacija glicerola kvasovki ne omogoči rasti v osmotsko neugodnih pogojih.

Sestava celične stene je dinamičen proces, ki se prilagaja na spremenljive razmere okolja tako, da spreminja organizacijo komponent celične stene (Klis in sod., 2002).

4.4 SKLEPI

Glive vrste *W. sebi* in *W. muriae*, gojene submerzno, rastejo v obiki filamentoznih hif, ki se med seboj prepletajo v micelijske pelete. Pri visokih slanostih so hife krajše, bolj razvejene, peleti pa postanejo svetlejši, ohlapni in nepravilnih oblik, da se poveča površina hif, ki je v neposrednem stiku z okoljem.

Glive vrste *W. ichthyophaga* rastejo v obliki večceličnih skupkov, tako imenovanim sarcinam podobne strukture. Velikost večceličnih skupkov se z visoko slanostjo poveča zaradi zaščite celic v notranjosti skupka pred osmotskim stresom.

Debelina celične se pri glivah vrste *W. sebi* in *W. muriae* ob povečani slanosti le malenkostno poveča.

Debelina celične stene večceličnih skupkov se pri glivah vrste *W. ichthyophaga* ob hiperosmotskem stresu signifikantno poveča.

Med osmotskim stresom (5 % NaCl) se celična stena kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* stanjša in pojavijo se globoke invaginacije plazemske membrane.

Najizrazitejša morfološka sprememba na povišano slanost glive *Hortaea werneckii* je prerazporeditev pigmenta. Melanin je pri 10 % NaCl predvsem na površini celične stene, medtem ko so pri višji slanosti melaninska zrna posamična, manjša in se pomaknejo predvsem v zunanji sloj celične stene.

Površina hif micelijskih peletov gliv vrst *Wallemia sebi* in *Wallemia muriae* je tako pri nizki, kot pri visoki koncentraciji NaCl gladka in prekrita z EPS.

Večceličnih skupki gliv vrste *W. ichthyophaga* so pri 15 % NaCl močno prekriti z ekstracelularnimi polimeri, ki zapolnijo prostore med celicami. Pri rasti na 25 % NaCl je površina celične stene skupkov bolj nagubana kot pri nižji slanosti. Sklepamo, da so za halofilno glivo *W. ichthyophaga* pogoji za rast pri 15 % NaCl neugodni.

5 POVZETEK

Hiperslana vodna telesa vsebujejo sol v koncentracijah, ki so višje od tiste v morski vodi. Primeri takih okolij so slana kopenska jezera (Great Salt Lake, Utah; Mrtvo morje, Izrael), plitve slane lagune, pri katerih izparevanje vode povzroči zvečanje gostote soli. Naravna hiperslana okolja najdemo tudi pod zemeljsko površino (rudniki soli), določena pa je ustavril človek sam (bazeni solin) (Gunde-Cimerman in sod., 2005b). Vsem izjemno slanim okoljem so skupne ekstremne fizikalno-kemijske lastnosti. Visoke koncentracije soli, nizka topnost kisika ter nizka vodna aktivnost so ekstremni pogoji, v katerih je preživetje mogoče le s prilagoditvijo na specifične razmere. Mišljenje, da so hiperslane vode s slanostjo med 15 % in 30 % preveč ekstremna okolja za rast gliv, se je izkazalo za napačno, saj so habitat številnih gliv (Gunde-Cimerman in sod., 1997). Za vzdrževanje turgorskega pritiska so mikroorganizmi razvili različne adaptivne mehanizme na osmotski stres. Mehanizmi za premagovanje osmotskega stresa pri glivah so: spremembe v kompoziciji in lastnostih plazemske membrane (Turk in sod., 2004), sinteza kompatibilnih topljencev ter akumulacija ionov (Petrovič in sod., 2002), spremembe v signalnih poteh ter genski ekspresiji (Petrovič in sod., 2002) ter morfološke spremembe na nivoju celične stene. Slednja prilagoditev je bila tudi predmet naše študije.

Primerjali smo, kako se debelina celične stene spreminja glede na koncentracijo NaCl v mediju pri glivah iz rodu *Wallemia* spp., vrsti *Hortaea werneckii* ter kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*. Nedavno je veljalo, da je celična stena gliv le inertna struktura, ki protoplast ščiti pred vplivi okolja ter mu daje ustrezno trdnost. Danes velja, da je stena esencialni celični organ, saj je vpleten v številne fiziološke procese celice. Celična stena je dinamična struktura, katere komponente se drastično spreminjajo v odvisnosti od razvojnega stadija življenjskega cikla ter vplivov iz okolja (Ross, 2001).

Kozmopolitski, bazidiomicetni rod *Wallemia* obsega tri vrste: *W. sebi*, *W. muriae* in *W. ichthyophaga*. Glive vseh treh vrst so kserofili, saj rastejo pri izjemno nizki vodni aktivnosti in halofili, saj *in vitro* rastejo nad 17 % NaCl. Filogenetske analize so pokazale, da je *Wallemiomycetes* starodaven takson znotraj debla *Basidiomycota* ter da sta vrsti *W.*

sebi in *W. muriae* filogenetsko nekoliko oddaljeni od ekstremno halofilne glive *W. ichthyophaga* (Zalar in sod., 2005a). Iz objav je znano, da se glive iz rodu *Wallemia* na povišano slanost prilagodijo s kopičenjem kompatibilnih topljencev, vzdrževanjem nizke znotrajcelične koncentracije kationov ter diferenčnim izražanjem proteinov, ki so vključeni v metabolizem sladkorjev in celično morfogenezo (Zajc, 2009). Kako hiperosmotski stres vpliva na morfologijo celične stene gliv iz rodu *Wallemia*, smo poskusili opisati v naši študiji.

Vpliv spremembe slanosti na morfologijo in debelino celične stene smo opazovali s presevnim mikroskopom, kjer smo opazovali znotrajcelične strukture ter vrstičnim mikroskopom, ki nam je dal informacije o površini opazovanih celic. Opazovane glive smo gojili submerzno v tekočem kemično definiranem gojišču YNB, na rotacijskem stresalniku. Preparate za elektronsko mikroskopijo smo pripravili iz celic, ko so dosegle eksponentno fazo rasti, in sicer v gojiščih z optimalno ter maksimalno slanostjo. Slanosti smo izbrali glede na rastni optimum posamezne glive ter na dosedanje objave o ekologiji izbranih gliv.

Rezultati so pokazali, da se debelina celične stene pri vseh treh vrstah iz rodu *Wallemia* pri povišani slanosti poveča. Celične stene hif gliv *W. sebi* in *W. muriae* se pri 20 % NaCl zadebelijo le malenkostno, medtem ko se pri *W. ichthyophaga*, 25 % NaCl celična stena večceličnih skupkov znatno zadebeli. Morfološke spremembe celic, ki smo jih opazili pri visokih slanostih, so bile tudi invaginacije plazemske membrane ter povečana vakuolizacija celic. S slanostjo se je spreminjala tudi količina ekstracelularnih polimerov, ki se je na površini večceličnih skupkov pri *W. ichthyophaga* ob rasti pri 25 % NaCl zmanjšala.

Morfološke spremembe halofilnih gliv iz rodu *Wallemia* smo primerjali s halofilno vrsto *Hortaea werneckii*, ki ima že opisano celično ultrastrukturo ob povišani slanosti (Kogej, 2002). Limitna slanost za rast črne kvasovke *Hortaea werneckii* je 30 % NaCl, ki je že skoraj nasičena raztopina (Gunde-Cimerman in sod., 1997). Ob rasti pri visokih slanostih (20 % NaCl) smo pri črni kvasovki smo opazili, da se debelina celične stene kvasnih celic rahlo poveča. Za glivo *Hortaea werneckii* je značilno, da se z maturacijo poveča melanizacija ter debelina celične stene (de Hoog, 1992). Bolj izstopajoča je bila

sprememba v prerazporeditvi in organizaciji pigmenta celične stene. Melaninska zrna so pri višji slanosti bila manjša, iz površine so se premaknila v zunanji sloj celične stene ter niso tvorila enotnega sloja pigmenta, temveč so bila posamična. Osmoadaptacija glive *H. werneckii* obsega učinkovito kombinacijo akumulacije kompatibilnih topljencev - poliolorov ter melanizirane celične stene, ki osmolite zadržuje v celici. Zaradi osmoadaptacije gliva *H. werneckii* lahko raste v širokem območju slanosti (Plemenitaš in Gunde-Cimerman, 2005).

Pri osmoadaptaciji na slanost občutljive kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* je bila slika nekoliko drugačna. Celice *Saccharomyces cerevisiae* se odzovejo na povečano zunajcelično osmolarnost s specifičnim in splošnim odzivom na stres. Poglavitni mehanizem za obvladovanje osmotskega stresa in posledično zmanjšanosti turgorja pri kvasovkah je akumulacija glicerola (Alonso-Monge in sod., 2001). Debelina celične stene kvasnih celic se je ob rasti pri 5 % NaCl zmanjšala in opažene so tipične globoke invaginacije plazemske membrane. Površina kvasnih celic je bila gladka, medtem ko ekstracelularnih polimerov nismo opazili.

Postavljeno hipotezo, da se debelina celične stene gliv iz rodu *Wallemia* ob osmotskem stresu poveča, smo v raziskavi potrdili. Na osnovi rezultatov bi lahko zaključili, da je zadebelitev celične stene ob osmotskem stresu lastna le halofilnim mikroorganizmom, ki so prilagojeni na rast pri visokih slanostih. Molekularni in fiziološki mehanizmi, ki so vpleteni v procese morfoloških sprememb celične stene, ostajajo predmet nadaljnjih raziskav.

6 VIRI

- Almagro A., Prista C., Benito B., Loureiro-Dias M. C., Ramos J. 2001. Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Bacteriology*, 183: 3251-3255
- Alonso-Monge R., Real E., Wojda I., Bebelman J. P., Mager W. H., Siderius M. 2001. Hyperosmotic stress response and regulation of cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae* share common functional aspects. *Molecular Microbiology*, 41, 3: 717-730
- Aguilar A. 1996. Extremophile research in the European Union: From fundamental aspects to industrial expectations. *FEMS Microbiology Reviews*, 18: 89-92
- Barreto-Bergter E., Gorin P. A. J. 1983. Structural chemistry of polysaccharides from fungi and lichens. V: *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. Vol.41. Tipson R.S., Horton D. (eds.). New York, Academic Press: 67-103
- Bloomberg A., Adler L. 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 33: 145-212
- Brauers G., Ebel R., Edrada R., Wray V., Berg A., Grafe U., Proksch P. 2001. Hortein, a new natural product from the fungus *Hortea werneckii* associated with the sponge *Aplysina aerophoba*. *Journal of Natural Products*, 64: 651-652
- Breierova E., Kracurakova M., Stratilova E. 1997a. The effects of high concentration of NaCl in the cultivation medium on changes in the composition of the extracellular yeast glycoproteins. *Systematic and Applied Microbiology*, 20: 348-355
- Breierova E., Stratilova E., Sajbidor J. 1997b. Salinity affects fatty acid and extracellular glycoprotein composition of *Dipodascus australiensis*. *Food Technology and Biotechnology*, 35: 237-241
- Brown A. D. 1976. Microbial water stress. *Bacteriological Reviews*, 40: 803-846
- Bulawa C. E. 1993. Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annual Review of Microbiology*, 47: 505-534
- Cabib E., Roberts R., Bowers B. 1982. Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 51: 763-793
- Cole G. T., Samson R. A. 1979. *Patterns of development in conidial fungi*. London, San Francisco, Melbourne, Pitman Publishing Company: 208 str.

- Clipson N. J. W., Jennings D. H., Smith J. L. 1989. The response to salinity at the microscopic level of the marine fungus *Dendryphiella salina* Nicot and Pugh as investigated stereologically. *New Phytologist*, 113: 21-27
- Crespo J. L., Daicho T., Ushimaru T., Hall M. N. 2001. The GATA transcription factors GLN3 and GAT1 link TOR to salt stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 37: 34441-34444
- de Hoog G. S. 1993. Evolution of black yeasts – possible adaptation of the human host. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 63, 2: 105-109
- de Hoog G. S., Gerrits van den Ende A. H. G. 1992. Nutritional pattern and eco-physiology of *Hortaea werneckii*, agent of human tinea nigra. *Antonie van Leeuwenhoek*, 62, 4: 321-329
- de Hoog G. S., Guarro J., Gené J., Figueras M. J. 2000. Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 1160 str.
- De Groot P. W., Ram A. F., Klis F. M. 2005. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genetics and Biology*, 42: 657-675
- Domsch K. H., Gams W., Andreson T. H. 1980. Compendium of soil fungi. London, New York, Academic Press: 700-702
- Engelberg D., Mimran A., Martinetto H., Otto J., Simchen G., Karin M., Fink G. R. 1998. Multicellular stalk-like structures in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 180, 15: 3992–3996
- Filtenborg, O. Frisvad, J. C., Samson, R. A. 2000. Specific association of fungi to foods and influence of physical environmental factors. V: Introduction to food and airborne fungi. Samson R. A., Hoekstra E. S., Frisvad J. C., Filtenborg O. (eds.). Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 306-320
- Frank J. M., Kingston E., Jeffrey J. C., Moss M. O., Murray M., Simpson T. J., Sutherland A. 1999. Walleminol and walleminone, novel caryophyllenes from the toxigenic fungus *Wallemia sebi*. *Tetraheadrom Letters*, 40, 1: 133-136

- Gash A. P., Spellman P. T., Kao C. M., Carmel-Harel O., Eisen M. B., Storz D., Botstein D., Brown O. P. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, 11, 12: 4241-4257
- Grün C. H. 2003. Structure and biosynthesis of fungal α -glucans. Ph.D. dissertation. Utrecht, University of Utrecht: 143 str.
- Grant W. D. 2004. Life at low water activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359, 1448: 1249-1267
- Gunde-Cimerman N., Butinar L., Sonjak S., Turk M., Uršič V., Zalar P., Plemenitaš A. 2005a. Halotolerant and halophilic fungi from coastal environments in the Arctic. V: *Adaptation to life at high salt concentrations in archaea, bacteria, and eukarya*. Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A., Oren A. (eds.). Dordrecht, Springer: 397-423
- Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitaš A. 2005b. Mikrosafari: čudoviti svet mikroorganizmov solin. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 159 str.
- Gunde-Cimerman N., Zalar P., Cimerman A. 1997. Diversity of fungal community in high salt marine environments. V: *Environmental biotechnology*. Verachtert H., Verstraete W. (eds.). Antwerpen, Technologish Instituut: 189-191
- 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, 3: 235-240
- Hamsi M. H., Morgan-Jones G. 1973. Conidium ontogeny in hyphomycetes. The meristem arthospores of *Wallemia sebi*. *Canadian Journal of Botany*, 51, 9: 1669-1671
- Herbert R. A. 1992. A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *Trends in Biotechnology*, 10, 11: 395-402
- Hernandez-Saavedra N. Y., Ochoa J. L., Vazquez-Duhalt R. 1995. Osmotic adjustment in marine yeast. *Journal of Plankton Research*, 17: 59-69
- Hocking A. D. 1993. Responses of xerophilic fungi to changes in water activity. V: *Stress tolerance of fungi*. Jennings D. H. (ed.). New York, Marcel Dekker Inc: 233-243
- Hochaka P. W., Somero G. N. 2002. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiology evolution. New York, Oxford University Press: 466 str.
- Javor B. 1989. Geology and chemistry, biology. V: *Hypersaline environments: microbiology and biogeochemistry*. Brock T. D. (ed.). Berlin, Springer: 328 str.

- Jiang B., Ram A. F., Sheraton J., Klis F. M., Bussey H. 1995. Regulation of cell wall beta-glucan assembly: *PTC1* negatively affects *PBS2* action in a pathway that includes modulation of *EXG1* transcription. *Molecular Genetics and Genomics*, 248: 260-269
- 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, 2: 373-383
- Kavanagh K. 2005. *Fungi: biology and application*. Chichester, John Wiley and Sons: 267 str.
- Kelavkar U., Rao K. S., Ghhatpar H. 1993. Sodium chloride stress induced morphological and ultrastructural changes in *Aspergillus repens*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 31, 6: 511-515
- Klis F. M., Caro L. H., Vossen J. H., Kapteyn J. C., Ram, A. F., Montijn R. C., Van Berkel M. A., Van den Ende H. 1997. Identification and characterization of a major building block in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Society Transactions*, 25, 3: 856-860
- Klis F. M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 3: 239-256
- Kogej T. 2002. Vpliv slanosti na melanizacijo iz solin izoliranih črnih kvasovk. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 124 str.
- Kogej T., Gorbushina A. A., Gunde-Cimerman N. 2006a. Hypersaline conditions induce changes in cell-wall melanization and colony structure in a halophilic and a xerophilic black yeast species of the genus *Trimmatostroma*. *Mycological Research*, 110, 6: 713-724
- Kogej T., Gostinčar C., Volkmann M., Gorbushina A., Gunde-Cimerman N. 2006b. Mycosporines in extremophilic fungi-Novel complementary osmolytes? *Environmental Chemistry*, 3, 2: 105-110
- Kogej T., Lanišnik-Rizner T., Gunde-Cimerman N. 2001. Black yeasts from the salterns: The effects of salt on melanization. V: *The halophiles 2001*. International Conference on halophilic microorganisms, September 23-27, 2001, Sevilla, Spain. Minerva, FEMS-Federation of European Microbiological Societies: 24-24

- Kogej T., Stein M., Volkmann M., Gorbushina A. A., Galinski E.A., Gunde-Cimerman N. 2007. Osmotic adaptation of halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization. *Microbiology*, 153: 4261-4273
- Kollár R., Reinholds B. B., Petrakova E., Yeh H. J., Ashwell G., Drgonova J., Kapteyn J. C., Klis F. M., Cabib E. 1997. Architecture of the yeast cell wall. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 28: 17762-17775
- Kralj Kunčič M., Drobne D., Gunde-Cimerman N. 2008. Prilagoditve gliv iz rodu *Wallemia* spp. na rast v ekstremno slanem in ekstremno sladkem okolju. V: Biodan 08. Biodan 08, Ljubljana, 11. februar 2008. Gunde-Cimerman N., Drobne D. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 21-21
- Kuthan M., Devaux F., Janderová B., Slaninová I., Jacq C., Palková Z. 2003. Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Molecular Microbiology*, 47, 3: 745-754
- 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
- Lages F., Silva-Graca M., Lucas C. 1999. Active glycerol uptake is mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 speices. *Microbiology*, 145: 2577-2585
- Latterich M., Watson M. D. 1993. Evidence for a dual osmoregulatory mechanism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 191, 3: 1111-1117
- Lesage G., Bussey H. 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 2: 317-343
- Madelin M. F., Dorabjee S. 1974. Conidium ontogeny in *Wallemia sebi*. *Transactions of the British Mycological Society*, 63: 121-130
- Matheny P. B., Gossmann J. A., Zalar P., Arun Kumar T. K., Hibbett D. S. 2006. Resolving the phylogenetic position of the Wallemiomycetes: an enigmatic major lineage of Basidiomycota. *Canadian Journal of Botany*, 84, 12: 1794-1805
- Mittag H. 1993. The fine structure of *Hortaea werneckii*. *Mycoses*, 36, 11-12: 343-350
- Oren A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 2: 334-348

- Oren A. 2002. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28, 1: 56-63
- Osumi M. 1998. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron: The International Research and Review Journal for Microscopy*, 29, 2-3: 207-233
- Palkova Z., Vachova L. 2006. Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 5: 806–824
- Petrovič U., Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A. 1999. Salt stress affects sterol biosynthesis in the halophilic black yeast *Hortea werneckii*. *FEMS Microbiology Letters*, 180: 325-330
- Petrovič U., Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A. 2002. Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortea werneckii*. *Molecular Microbiology*, 45, 3: 665-672
- Pitt J. I., Hocking A. D. 1985. The ecology of fungal food spoilage. V: *Fungi and food spoilage*. 1st ed. Schweigert B.S., Stewart G.F. (eds.). Sydney, Orlando, San Diego, New York, London, Toronto, Montreal, Tokyo, Academic Press: 412 str.
- Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2005. Cellular responses in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii* to high environmental salinity. V: *Adaptation to life at high salt concentrations in archaea, bacteria, and eukarya*. Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitaš A. (eds.). Dordrecht, Springer: 453-470
- Plemenitaš A., Vaupotič T., Lenassi M., Kogej T., Gunde-Cimerman N. 2008. Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity: a molecular perspective at a glance. *Studies in Mycology*, 61: 67-75
- Ross I. K. 2001. Fungal cell walls. Santa Barbara, University of California. (december 2001)
<http://www.els.net> (avgust 2009): 7 str.
- Roussel S., Reboux G., Dalphin J. C., Bardounet K., Millon L., Piarroux R. 2004. Microbiological evolution of hay and relapse in patients with farmer's lung. *Occupational and Environmental Medicine*, 61, 1: e3.
<http://www.occenvmed.com/cgi/content/full/61/1/e3> (september 2009): 6 str.
- Russel N. J. 1989. Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 21, 1: 93-113

- Samson R. A., Hoekstra E. S., Frisvad J. C. 2000. Introduction to food- and airborne fungi. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 389 str.
- Selbmann L., de Hoog G. S., Mazzaglia A., Friedmann E. I., Onofri S. 2005. Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from Antarctic desert. *Studies in Mycology*, 51: 1-32
- Severo L. C., Bassanesi M. C., Londero A.T. 1994. *Tinea nigra*: report of four cases observed in Rio Grande do Sul (Brazil) and a review of Brazilian literature. *Mycopathologia*, 126: 157–162
- Smits G. J., van den Ende H., Klis F. M. 2001. Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology*, 147: 781-794
- Slaninova I., Šestak S., Svoboda A., Farkaš V. 2000. Cell wall and cytoskeleton reorganization as the response to hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, 173, 4: 245–252
- Sterlfinger K., de Hoog G. S., Hasse G. 1999. Phylogeny and ecology of meristematic ascomycetes. *Studies in Mycology*, 43: 5-22
- Stiller M., Nissenabum A. 1999. Geochemical investigation of phosphorous and nitrogen in the hypersaline Dead Sea. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63: 3467-3475
- Stopar D. 2007. Priročnik iz mikrobne ekologije za študente mikrobiologije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 430 str.
- Scherz R., Shinder V., Engelberg D. 2001. Anatomical analysis of *Saccharomyces cerevisiae* stalk-like structures reveals spatial organization and cell specialization. *Journal of Bacteriology*, 183, 18: 5402–5413
- Takahashi T. 1997. Airborne fungal colony-forming units in outdoor and indoor environments in Yokohama, Japan. *Mycopathologia*, 139, 1: 23-33
- Tamas M. J., Hohmann S. 2003. The osmotic stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. V: Topics in current genetics. Vol.1. Hohmann S., Mager P. W. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 121-200

- Turk M., Mejanelle L., Šentjurc 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, 1: 53–61
- Uijthof J. M. 1996. Relationships within the black yeast genus *Exophiala* based on ITS1 sequences. *Mycological Research*, 100, 10: 1265-1271
- Vaupotič T., Plemenitaš A. 2007. Osmoadaptation-dependent activity of microsomal HMG-CoA reductase in the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* is regulated by ubiquitination. *FEBS Letters*, 581, 18: 3391-3395
- Ventosa A., Nieto J. J. 1995. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 1: 85-94
- Zalar P., de Hoog G. S., Gunde-Cimerman N. 1999. Ecology and halotolerant dothideaceous black yeasts. *Studies in Mycology*, 43: 38-48
- Zalar P., de Hoog G. S., Schroers H. J., Frank J. M., Gunde-Cimerman N. 2005a. Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (*Wallemiomycetes* and *Wallemiales*, cl. et ord. nov.). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87, 4: 311-328
- Zalar P., Kocuvan A., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2005b. Halophilic black yeasts colonize wood immersed in hypersaline water. *Botanica Marina*, 48, 4: 323-326
- Zalar P., Gunde-Cimerman N., de Hoog G. S. 2000. Salinity – An important factor in adhesion of halophilic black yeasts. V: The rising power of yeasts in science and industry: ISY 2000. Tenth international symposium on yeasts, 27 August – 1 September 2000, Papendal, Arnhem. The Netherlands-symposium book. Van Dijken J. O., Scheffers W. A. (eds.). Delft, Delft University Press: 143-143.
- Zajc J. 2009. Fiziološke prilagoditve kserofilnih gliv iz rodu *Wallemia* na rast pri slanih pogojih. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 101 str.
- 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, 12: 6619-6630

- Wessels J.G., Sietsma J.H. 1982. Fungal cell walls: a survey. V: Encyclopedia of plant physiology. Vol. 13B. Pirson A., Zimmermann M.H. (eds.). Berlin, Springer Verlag: 352-394
- Wood G. M., Mann P. J., Mann P. J., Lewis D. F., Reid W. J., Moss M. O. 1990. Studies on a toxic metabolite from the mould *Wallemia*. Food Additives and Contaminants, 7, 1: 69-77
- Yagi T. 1992. Regulation of intracellular osmotic pressure during initial stages of salt stress in a salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. Microbios, 70, 283: 93-102

ZAHVALA

"The cure for anything is salt water: sweat, tears or the sea."

By Karen Blixen

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Nini Gunde-Cimerman in somentorici prof. dr. Damjani Drobne za sprejeto mentorstvo ter vse strokovne nasvete, pomoč in čas, ki sta si ga vzeli zame, kljub njenemu obsežnemu urniku, da je lahko nastala ta diplomska naloga.

Za potrpežljivost in pomoč pri laboratorijskem delu se zahvaljujem Marjetki Kralj- Kunčič, Živi Pipan, Barbari Kastelic-Bokal ter vsem zaposlenim iz laboratorija Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov ter Katedre za zoologijo.

Najlepša hvala dr. Tini Kogej, asist. dr. Martini Turk, asist. dr. Poloni Zalar za strokovno pomoč in vodenje pri izdelavi diplomske naloge.

Za recenzijo se zahvaljujem prof. dr. Kristini Sepčič.

Za predsedovanje študijski komisiji na zagovoru diplomskega dela se zahvaljujem prof. dr. Davidu Stoparju.

Zadnja, a nič manj pomembna zahvala gre mami Miri in očetu Jožetu, ki sta potrpežljivo čakala in dočkala zaključek mojega študija ter Andreju, ki je z mano v lepih in malo manj lepih trenutkih.

PRILOGE

Priloga A: Razmerje med aktivnostjo vode in koncentracijo soli (Stopar, 2007: 176)

Aktivnost vode a_w	NaCl (%,w/v)
0,995	0,9
0,99	1,7
0,98	3,5
0,96	7
0,94	10
0,92	13
0,90	16
0,88	19
0,86	22