

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Monika NOVAK

**POMIVALNI IN PRALNI STROJI: UMETNO
OKOLJE ZA BOGATITEV GLIVNIH
OPORTUNISTIČNIH PATOGENOV ČLOVEKA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Monika NOVAK

**POMIVALNI IN PRALNI STROJI: UMETNO OKOLJE ZA
BOGATITEV GLIVNIH OPORTUNISTIČNIH PATOGENOV
ČLOVEKA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DISHWASHERS AND WASHING MACHINES: MAN-MADE
ENRICHMENT MACHINERY FOR FUNGAL OPPORTUNISTIC
HUMAN PATHOGENS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Posnetki z vrstičnim elektronskim mikroskopom JSM - 6500F so bili narejeni na Inštitutu za kovinske materiale in tehnologije v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je dne 17. 12. 2010 za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Nino Gunde-Cimerman, za somentorico doc. dr. Polono Zalar, za recenzentko prof. dr. Ano Plemenitaš ter za predsednico komisije prof. dr. Ines Mandić Mulec.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ines Mandić Mulec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

Član: doc. dr. Polona Zalar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Datum zagovora:

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Monika Novak

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.24 + 579.26 : 582.28 : 648.06 (043) = 163.6
KG	patogeni mikroorganizmi/oportunistični patogeni/glive/fiziologija gliv/rod <i>Exophiala</i> /gospodinjski stroji/pomivalni stroj/pralni stroj
AV	NOVAK, Monika
SA	GUNDE-CIMERMAN, Nina (mentorica) / ZALAR, Polona (somentorica) / PLEMENITAŠ, Ana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2011
IN	POMIVALNI IN PRALNI STROJI: UMETNO OKOLJE ZA BOGATITEV GLIVNIH OPORUNISTIČNIH PATOGENOV ČLOVEKA
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XI, 72 str., 17 pregl., 8 sl., 96 vir.
IJ	SL
JI	sl/en
AI	Glive so znane naseljevalke vlažnih habitatov, med katere lahko uvrščamo tudi naša gospodinjstva. Kot nove niše za rast ljudem patogenih gliv so nedavno opisali savne, kopalnice in kuhinje. Tudi gospodinjski aparati lahko gostijo neobičajne mikroorganizme, ki sicer uspevajo v posebnih naravnih ekoloških nišah. Proces pranja v pralnih in pomivalnih strojih potekajo pri visokih temperaturah in pH vrednostih, slednje zaradi dodatka detergentov. Vse pogostejša je uporaba ekoloških programov z nižjimi temperaturami in manjšo porabo vode pa tudi uporaba biorazgradljivih detergentov. Zaradi teh dejavnikov, ki niso več omejujoči za rast mikrobov, stroji predstavljajo bogatitveno okolje za njihovo rast. O glivah v pomivalnih in pralnih strojih je malo znanega. V diplomskem delu smo želeli ugotoviti sestavo glivne flore v pralnih in pomivalnih strojih vzorčenih po Sloveniji in po svetu. Preverjali smo, ali so med njimi oportunistični patogeni ter ugotavljali toleranco izbranih gliv <i>in vitro</i> na visoke temperature in pH vrednosti. Z morfološko in molekularnogenetsko analizo smo ugotovili, da se glivna flora znotraj pomivalnih in pralnih strojev razlikuje. Na to vplivajo razlike v temperaturi, v trdoti in pretoku vode, ter količini hranil. Pomivalne in pralne stroje naseljujejo različne vrste oportunističnih patogenov človeka iz rodov <i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Exophiala</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Magnusiomyces</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Pichia</i> in <i>Rhodotorula</i> . Presenetljiva je bila ugotovitev, da kar tretjino vzorčenih pomivalnih strojev naseljujejo patogene črne kvasovke rodu <i>Exophiala</i> . Rastejo pri temperaturi do 47 °C, pri pH vrednostih med 2,5 in 12,5 ter na gojišču s 17 % NaCl, na osnovi česar smo jih uvrstili med poliekstremotolerantne mikroorganizme.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 579.24 + 579.26 : 582.28 : 648.06 (043) = 163.6

CX pathogens/opportunistic pathogens/fungi/physiology of fungi/genus
Exophiala/household machinery/dishwasher/washing machine

AU NOVAK, Monika

AA GUNDE-CIMERMAN, Nina (supervisor) / ZALAR, Polona (co-advisor) /
PLEMENITAŠ, Ana (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology

PY 2011

TI DISHWASHERS AND WASHING MACHINES: MAN-MADE
ENRICHMENT MACHINERY FOR FUNGAL OPPORTUNISTIC HUMAN
PATHOGENS

DT Graduation thesis (University studies)

NO XI, 72 p., 17 tab., 8 fig., 96 ref.

LA SL

AL sl/en

AB Fungi are known colonizers of damp habitats, which may also include our households. Pathogenic fungi were described inhabiting saunas, bathrooms and kitchens. Even household appliances may harbor microorganisms that thrive in nature in special ecological niches. The washing processes in washing machines and dishwashers reach high temperatures and due to the addition of detergents also different pH values. Use of ecological programs with lower temperatures, less water and use of biodegradable detergents is becoming more common. Due to these factors, machines can represent enrichment environments for microorganisms. In the thesis we determine at the composition of fungal flora in the washing machines and dishwashers sampled all over Slovenia and abroad. We tried to investigate the potential presence of pathogenic fungal flora. We also observed tolerance of selected fungi to high temperatures and pH values *in vitro*. The morphological and molecular genetic analysis showed that the fungal flora inside machines is different. It is affected by differences in temperature, the water hardness, the flow of water, and the amount of nutrients. Dishwashers and washing machines are inhabited by species of opportunistic human pathogens from the genera *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Exophiala*, *Fusarium*, *Magnusiomyces*, *Penicillium*, *Pichia* and *Rhodotorula*. One-third of the sampled dishwashers were colonized with pathogenic black yeast from the genus *Exophiala*. They grow above 47 ° C, at pH values between 2.5 and 12.5 and in medium containing 17 % NaCl, therefore we classified them as poliextremotolerant microorganisms.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
SLOVARČEK	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJI IN HIPOTEZE DIPLOMSKEGA DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 GLIVE	3
2.1.1 Patogene in oportunistično patogene glive	4
2.1.2 Življenjska okolja, rastni pogoji in fiziologija patogenih in oportunistično patogenih gliv	5
2.1.3 Najpogostejši rodovi in vrste gliv iz naravnih in umetnih habitatov	7
2.2 POMIVALNI IN PRALNI STROJI KOT HABITAT	13
2.2.1 Kemična sestava detergentov in soli za mehčanje vode	14
2.2.2 Glive, izolirane iz pomivalnih in pralnih strojev	16
3 MATERIAL IN METODE	17
3.1 MATERIAL	17
3.1.1 Laboratorijski pribor	17
3.1.2 Laboratorijske naprave	18
3.1.3 Kemikalije in reagenti	20
3.1.4 Raztopine in pufri	22
3.1.5 Gojišča	25
3.1.6 Programska oprema	28
3.2 METODE	28

3.2.1	Izolacija in shranjevanje sevov	28
3.2.2	DNA ekstrakcija	30
3.2.3	Molekularna analiza in identifikacija sevov	31
3.2.4	Fiziologija	32
3.2.5	Parjenje in fingerprint M13	33
3.2.6	Priprava preparatov za vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM)	34
4	REZULTATI	36
4.1	IZOLIRANI IN IDENTIFICIRANI SEVI IZ POMIVALNIH IN PRALNIH STROJEV	36
4.1.1	Izolirane in identificirane glive iz pomivalnih strojev	36
4.1.2	Izolirani in identificirani sevi iz pralnih strojev	39
4.2	REZULTATI FILTRACIJE VODE	41
4.3	FIZIOLOGIJA SEVOV VRST <i>EXOPHIALA DERMATITIDIS</i> IN <i>EXOPHIALA PHAEOMURIFORMIS</i>	42
4.3.1	Rast in morfologija pri različnih pH vrednostih	43
4.3.2	Rast pri različnih temperaturah	46
4.3.3	Rast pri različnih koncentracijah NaCl	47
4.3.4	Vpliv trdote vode na pojav vrst <i>E. dermatitidis</i> in <i>E. phaeomuriformis</i> v pomivalnih strojih	49
4.5	REZULTATI PARJENJA IN FINGERPRINTA M13	50
4.6	REZULTATI SEM	51
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	52
5.1	RAZPRAVA	52
5.2	SKLEPI	58
6	POVZETEK (SUMMARY)	59
6.1	POVZETEK	59
6.2	SUMMARY	62
7	VIRI	65

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Laboratorijski pribor, uporabljen pri raziskovalnem delu	17
Preglednica 2: Laboratorijske naprave s proizvajalcem in državo porekla	18
Preglednica 3: Seznam uporabljenih kemikalij s proizvajalcem in državo porekla	20
Preglednica 4: Oligonukleotidni začetniki in njihova uporaba	24
Preglednica 5: Ustrezna količina NaCl glede na zeleno slanost gojišča	26
Preglednica 6: Programi za pomnoževanje različnih odsekov DNA	31
Preglednica 7: Program za DNA prstni odtis z oligonukleotidnim začetnikom M13	34
Preglednica 8: Seznam izoliranih in identificiranih sevov iz pomivalnih strojev – tesnilna guma	36
Preglednica 9: Seznam izoliranih in identificiranih sevov iz pomivalnih strojev - notranjost	39
Preglednica 10: Seznam izoliranih in identificiranih sevov iz pralnih strojev – predal za mehčalec	40
Preglednica 11: Seznam izoliranih in identificiranih sevov iz pralnih strojev – predal za pralni prašek	40
Preglednica 12: Seznam izoliranih in identificiranih sevov iz pralnih strojev – tesnilna guma	40
Preglednica 13: Filtracija vode in izolacija gliv iz različnih vodnih virov	41
Preglednica 14: Rast pri različnih pH vrednostih	43
Preglednica 15: Rast vrst <i>Exophiala dermatitidis</i> in <i>Exophiala phaeomuriformis</i> pri različnih temperaturnih vrednostih	46
Preglednica 16: Rast vrst <i>Exophiala dermatitidis</i> in <i>Exophiala phaeomuriformis</i> pri različnih koncentracijah NaCl	48
Preglednica 17: Število pozitivnih in negativnih vzorcev na območjih s trdo, srednje trdo in mehko vodo v Sloveniji	49

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Filter papirji z glivnimi kolonijami po filtraciji vode iz pomivalnega stroja (A-E) in vodovoda (F)	42
Slika 2: Morfologija vrste <i>Exophiala dermatitidis</i> pri različnih pH vrednostih v tekočih gojiščih	44
Slika 3: Morfologija vrste <i>Exophiala phaeomuriformis</i> pri različnih pH vrednostih	45
Slika 4: Rast vrst <i>Exophiala dermatitidis</i> in <i>Exophiala phaeomuriformis</i> pri različnih temperaturnih vrednostih	47
Slika 5: Rast vrst <i>Exophiala dermatitidis</i> in <i>Exophiala phaeomuriformis</i> pri različnih koncentracijah NaCl	48
Slika 6: Grafični prikaz odstotkov pozitivnih in negativnih vzorcev glede na trdoto vode v Sloveniji	49
Slika 7: MSP-PCR fingerprinti (Zalar in sod., 2011)	50
Slika 8: Površina gume pomivalnega stroja	51

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

°C	stopinja Celzija
µg	mikrogram (10^{-6} grama)
µL	mikroliter (10^{-6} litra)
µm	mikrometer (10^{-6} metra)
ACT	del gena, ki kodira aktin
AUS	mednarodni simbol za Avstralijo
AUT	mednarodni simbol za Avstrijo
BEL	mednarodni simbol za Belgijo
BLAST	ang. B asic L ocal A lignment S earch T ool
bp	bazni pari
BRA	mednarodni simbol za Brazilijo
BTB	del gena, ki kodira β-tubulin
CAN	mednarodni simbol za Kanado
CTAB	cetiltrimetilamonijev bromid
DDK	mednarodni simbol za Dansko
DE	mednarodni simbol za Nemčijo
dH ₂ O	destilirana voda
dL	deciliter (10^{-1} litra)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. d eoxiribonucleic a cid)
EDTA	etilendiamintetraacetat
EPS	izvencelični polimeri (ang. e xtracellular p olymeric s ubstances)
EXF	zbirka glivnih kultur na Oddelku za biologijo, Biotehniška fakulteta (ang. Culture collection of e xtr e mophilic f ungi)
FRA	mednarodni simbol za Francijo
g	gram
GBR	mednarodni simbol za Veliko Britanijo
HRV	mednarodni simbol za Hrvaško
ISR	mednarodni simbol za Izrael
ITA	mednarodni simbol za Italijo

ITS	regija notranjega distančnika (ang. internal transcribed spacer) v rDNA
JPN	mednarodni simbol za Japonsko
kW	kilovolt (10^3 volta)
L	liter
LSU	velika podenota (ang. large subunit) v rDNA
M	molarna koncentracija
m/V	razmerje med maso in prostornino
mg	miligram (10^{-3} grama)
MiliQ	bidestilirana destilirana voda
min	minuta
mL	mililiter (10^{-3} litra)
mM	milimol (10^{-3} mola)
nm	nanometer (10^{-9} metra)
pmol	pikomol (10^{-12} mola)
rDNA	ribosomska deoksiribonukleinska kislina
RNA	ribonukleinska kislina (ang. ribonucleic acid)
rpm	število obratov v minuti (ang. revolutions per minute)
SEM	vrstični elektronski mikroskop (ang. scanning electron microscope)
SLO	mednarodni simbol za Slovenijo
SSU	mala podenota (ang. smal subunit) v rDNA
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
USA	mednarodni simbol za Združene države Amerike
ZAF	mednarodni simbol za Južnoafriško republiko

SLOVARČEK

- mol** Količina snovi sistema, ki vsebuje toliko elementarnih delcev, kolikor je atomov v 0,012 kg ogljikovega izotopa 12 (definicija iz leta 1971).
- pH** Merilo za koncentracijo oksonijevih ionov (H^3O^+) v raztopini in s tem posledično merilo za kislost ali alkalnost raztopine.
- U/ μL** 1 enota (ang. **unit**) je opredeljena kot količina encima, potrebnega za popolno razgradnjo 1 μL DNA v 10 minutah pri 37 °C.

1 UVOD

Pomivalni in pralni stroji so postali del našega vsakdana. Po statističnih podatkih o opremljenosti stanovanj z gospodinjskimi električnimi napravami leta 1998 je bilo v Sloveniji 96,4 % stanovanj opremljenih s pralnimi stroji. Za pomivalne stroje ni podatka. Pri strojih je mogoča uporaba različnih programov pranja, glede na umazanost perila / posode. V okviru posameznega pralnega programa se spreminjajo nivo, temperatura, pH, trdota vode in prisotnost detergentov. V zadnjih letih veliko skrbi posvečamo čistemu okolju in manjši porabi energije. To pomeni pranje pri nižjih temperaturah in z manjšo količino vode (Malovrh in sod., 1999). Pralna sredstva morajo biti zaradi čiščenja odpadnih voda biološko razgradljiva (Poročilo komisije..., 2009). Zaradi naštetih dejavnikov gospodinjski stroji lahko predstavljajo okolje za namnožitev mikroorganizmov. Pri organizaciji National Sanitation Foundation (NSF) International so razvili NSF / ANSI Standard 184, ki zagotavlja, da pomivalni stroji dobro očistijo posodo. Proizvodi certificirani po tem standardu, po uporabi programa pranja zmanjšajo prisotnost bakterij za 99,9 % (NSF International, 2008).

Pralni in pomivalni stroji se z vodo napajajo iz vodovodnega omrežja. V površinski vodi in podtalnici, ki jo uporabljamo v vodovodnih sistemih, so Göttlich s sodelavci (2002), Hageskal s sodelavci (2006), Kärkkäinen s sodelavci (2009) in Pereira s sodelavci (2010), odkrili mnogo filamentoznih in kvasnih glivnih vrst. Nekatere izmed njih spadajo med oportunistične patogene človeka (Göttlich in sod., 2002; Hageskal in sod., 2006; Kärkkäinen in sod., 2009; Pereira in sod., 2010). Prav tako so bili opisani in izolirani oportunistični patogeni iz savn, kopalnic in okolij z visoko zračno vlago (Matos in sod., 2002; Zalar in sod., 2007; Sudhadham in sod., 2009). Pogoji omenjenih naravnih in umetnih okolij so podobni pogojem znotraj pomivalnih in pralnih strojev (Zalar in sod., 2011). O glivni flori v notranjosti pomivalnih in pralnih strojev je malo znanega. Ugotovljeno je bilo, da se pojavljajo plesni v okolici in notranjosti obeh tipov gospodinjskih aparatov, vendar glivna flora ni podrobno raziskana. Pojav plesni povezujejo z zračno vlago v prostorih s temi gospodinjskimi aparati (Whitmyre in Pandian, 2004). O okužbah ljudi z glivnimi oportunističnimi patogeni rodu *Candida* poročajo Bennett (1998) in Nedret Koc s sodelavci (2002). Okuženi ljudje so bili v stiku s pomivalnimi stroji ali posodo, oprano v stroju (Bennett, 1998; Nedret Koc in sod., 2002).

1.1 CILJI IN HIPOTEZE DIPLOMSKEGA DELA

Naš cilj je bil ugotoviti, ali glive naseljujejo pomivalne in pralne stroje, ter nadalje raziskati tovrstno glivno floro. Z morfološko in molekularno identifikacijo smo želeli ugotoviti, ali izolirani sevi gliv pripadajo oportunističnim patogenom človeka. Prav tako smo želeli ugotoviti toleranco oportunistov na pogoje znotraj strojev, kot so visoka temperatura in alkalen pH. Pri raziskavi smo predpostavili, da lahko umetna okolja, kot so pomivalni in pralni stroji, s svojimi pogoji predstavljajo habitat za glivne vrste, ki spadajo med oportunistične patogene človeka. Predvidevali smo, da je glivna flora znotraj teh habitatov prilagojena na nihanja v temperaturi, pH, količini soli in vlažnosti ter, da trdota vode lahko vpliva na morfologijo nekaterih gliv in na njihov pojav v obliki biofilmov. Predpostavili smo tudi, da je znotraj umetnih habitatov zaradi specifičnih pogojev mogoča mikroevolucija glivnih vrst, ki bi sicer v naravnem okolju potekala drugače.

2 PREGLED OBJAV

2.1 GLIVE

Glive so evkariontski organizmi, ki jih uvrščamo v samostojno kraljestvo Fungi. Kraljestvo gliv delimo na štiri debla po načinu produkcije spolnih spor: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota. Glive iz debla Chytridiomycota producirajo gibljive spolne in nespolne spore s posteriornimi bički, v Zygomycota uvrščamo glive, ki tvorijo debelostenske počivajoče zigospore. Pri glivah iz debla Ascomycota spolne spore nastajajo znotraj vrečke, imenovane askus, pri Basidiomycota pa spolne spore nastajajo eksogeno na bazidijih (Zalar in Gunde-Cimerman, 2008). Glive so večinoma heterotrofni organizmi. V naravi jih najdemo kot prostoživeče saprofite, kot zajedalce ali kot simbionte. Prisotne so skoraj v vseh ekoloških nišah, najbolje uspevajo v vlažnem okolju, pri temperaturah od 15 °C do 35 °C. Poznamo tudi ekstremotolerantne glive, ki naseljujejo habitate z nizkimi ali visokimi temperaturami (od - 40 °C do + 80 °C), visoko slanostjo oz. nizko vodno aktivnostjo. Glivne celice imajo celično steno, zgrajeno iz hitina in β -glukanov. Kot zaloge energije skladiščijo glikogen, kar kaže na evlucijsko sorodnost z živalmi (Boedijn, 1978). Membrana glivnih celic vsebuje ergosterol, ki ima podobno vlogo kot holesterol v živalskih celicah. Razvojni krog glive je lahko sestavljen iz dveh stadijev; telomorfnega (oblika glive s spolnim razmnoževanjem) in anamorfnega stadija (oblika glive z nespolnim razmnoževanjem). Pri nekaterih glivah spolna oblika ni znana.

Pri kroženju snovi so glive pomembne kot razkrojevalci odmrlih organskih snovi. Sposobne so razgraditi dolgoverižne ogljikove spojine kot so celuloza, lignin in komponente nafte. Nekatere vrste gliv proizvajajo antibiotike, ki zavirajo ali preprečujejo rast bakterij. Lahko proizvajajo tudi druge sekundarne metabolite (toksine), ki so strupeni ali karcinogeni. Glive lahko povzročajo tudi številna težko ozdravljiva obolenja (mikoze) pri rastlinah, živalih in ljudeh. V živilski industriji se glive uporabljajo pri procesiranju hrane (v pekarstvu, pivovarstvu, pri pridelavi sirov), uživamo pa jih tudi kot samostojne jedi (Podobnik in Devetak, 2000). Nekatere vrste gliv se uporabljajo kot modelni organizmi za preučevanje osnovnih procesov v fiziologiji, biokemiji, biotehnologiji, genetiki in molekularni biologiji (Taylor in sod., 1993).

Glive različni avtorji delijo v različne skupine. Ena od delitev loči med pravimi glivami, plesnimi in kvasovkami. Prave glive so tiste glive, ki oblikujejo plodišča (t.i. gobo). Te glive rastejo večino časa v obliki micelija pod površjem. Ob ugodnih okoljskih razmerah razvijejo nadzemna plodišča, ki proizvajajo spolne spore. Prave glive najdemo tako v deblu Ascomycota kot tudi v deblu Basidiomycota (Madigan in Martinko, 2006).

Plesni so zelo razširjene filamentozne glive. Tvorijo filamente ali hife, ki so lahko neseptirane ali septirane. Hife se povezujejo v skupke ali micelije, iz katerih izraščajo zračne hife. Na le-teh nastajajo konidiji kot produkt nespolnega razmnoževanja. Konidiji so pogosto pigmentirani in odporni na izsuševanje. Pri nekaterih plesnih so znani tudi spolni stadiji, kjer po zlitju gametangijev nastanejo spolne spore. Le-te so odporne na izsuševanje, nizke in visoke temperature in na nekatere kemične snovi. Spolne in nespolne spore gliv ob ugodnih pogojih kalijo in se razvijejo v nove hife in nov micelij (Madigan in Martinko, 2006).

Kvasovke so enocelične glive. So polifiletskega nastanka in jih najdemo v deblih Asco- in Basidiomycota, kot dimorfni stadij pa tudi v deblu Zygomycota. Razmnožujejo se nespolno, običajno z brstenjem, redkeje s cepitvijo. Čeprav se večina kvasovk razmnožuje v obliki posameznih celic, lahko nekatere kvasovke tvorijo tudi psevdo- ali prave filamente (dimorfne glive). Pri kvasovkah poznamo tudi spolno razmnoževanje, pri čemer se dve celici zlijeta v zigoto, iz katere nastajajo bodisi asko- ali bazidiospore. Najbolj poznana je kvasovka *Saccharomyces cerevisiae*, ki se uporablja tudi kot modelni organizem (Madigan in Martinko, 2006).

2.1.1 Patogene in oportunistično patogene glive

Večina gliv za človeka ni škodljiva, približno 300 vrst pa lahko povzročajo okužbe pri ljudeh. Večino pravih in oportunističnih patogenih gliv uvrščamo v deblo Ascomycota, nekatere oportunistično patogene glive pa v deblo Zygomycota in Basidiomycota (Madigan in Martinko, 2006). Znotraj debla Ascomycota je 15 razredov (Kirk in sod., 2008). Nekatero patogene uvrščamo v rodove kot so *Candida*, *Pichia*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* in *Exophiala*. Za le-te je znano, da lahko povzročajo bolezni pri imunsko oslabljenih ljudeh, ali proizvajajo mikotoksine. Znotraj debla Zygomycota

uvrščamo rod *Mucor*, znan patogen rastlin, tudi oportunistični patogen živali in človeka (*Mucor circinelloides*), ki povzroča zigomikoze (de Hoog in sod., 2000).

Glive povzročajo različne bolezni, kot so akutne infekcije dihal, lezije povrhnjice, vnetje možganskih ovojnic. Bolezni povzročajo specifični glivni antigeni, kot so kapsule, EPS in specifični sladkorji na površini glive. Le ti aktivirajo različne poti imunskega sistema gostitelja. Ob ponovni izpostavljenosti človeka tem antigenom se imunski sistem pretirano odzove, nastane alergična reakcija (Romani, 2011). Glive lahko proizvajajo glivne eksotoksine oz. mikotoksine, ki povzročajo mikotoksikoze, ali pa kolonizirajo različne dele telesa in povzročajo mikoze (Madigan in Martinko, 2006; Novak, 2009).

Mikoze so lahko kožne, podkožne ali sistemske. Pri sistemskih mikozah gliva raste v notranjih organih gostitelja in so najtežje ozdravljive. Okužba z glivo je lahko primarna ali sekundarna. Pri primarni okužbi je patogena gliva prisotna v zdravem posamezniku. Pri sekundarni okužbi je gliva prisotna pri posameznikih z oslabljenim imunskim sistemom, ki je posledica predhodne bolezni. Glive, ki povzročajo sekundarne okužbe, imenujemo oportunistični patogeni, saj povzročajo bolezni le pri posameznikih z oslabljenim imunskim sistemom, zdravih posameznikov pa ne ogrožajo. Ogroženi so bolniki z rakavimi obolenji, AIDS-om, sladkorno boleznijo in boleznimi dihal (npr. cistično fibrozo) (Madigan in Martinko, 2006; Novak 2009).

2.1.2 Življenjska okolja, rastni pogoji in fiziologija patogenih in oportunistično patogenih gliv

V **naravnih okoljih**, kot so zrak, tla, termalna, sladka in morska voda ter okolja z visokimi temperaturami in visoko zračno vlažnostjo (tropski gozdovi), so poznane številne glivne vrste. Nekatere izmed njih lahko prištevamo med patogene ali oportunistično patogene vrste rastlin, živali ali človeka. V **umetno ustvarjenih okoljih**, kot so kopalnice, kuhinje, savne, bazeni, klimatske naprave in vodovodni sistemi, so pogoji za rast gliv včasih lahko podobni pogojem v naravnih habitatih. Za našeta okolja je značilna visoka zračna vlaga, visoke temperature in dostopnost hranil (Matos in sod., 2002; Zalar in sod., 2007).

Glive, katerih naravni habitat so tla, se s sporami lahko razširjajo po **zraku** in se pogosto pojavijo tudi v **vodi**. V naravnih in umetnih vodnih okoljih, kot so površinske vode,

izvirna voda, podtalnica, bazeni in vodovodni sistemi, so prisotne glive, ki se prenašajo z vodo. Voda vsebuje veliko anorganskih in organskih molekul, tako naravnega kot tudi antropogenega izvora, ki jih glive lahko koristijo kot vire hranil in ionov (Hageskal in sod., 2006). Voda iz različnih okolij ima različno pH vrednost in trdoto, kar lahko vpliva na pojav določenih vrst gliv. Trdota vode je odvisna od vsebnosti kalcijevih in magnezijevih ionov, izraža se v enoti mg CaCO₃ / L H₂O. Vsebnost karbonatov vpliva tudi na pH vode (Gallagher, 1992).

V **po površinskih vodah** so odkrili filamentozne glive iz rodov *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, ter kvasovke rodov *Cryptococcus* in *Rhodotorula*. V **izvirski vodi** so našli rodove *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Scopulariopsis* ter kvasovke iz rodov *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*. Iz **podtalnice** so izolirali glive iz rodov *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* ter kvasovke rodov *Candida*, *Kloeckera*, *Rhodotorula* (Pereira in sod., 2010). V **vodovodni vodi** v norveški raziskavi so našli 94 različnih vrst, ki pripadajo 30 rodovom (Hageskal in sod., 2006), vključujoč različne vrste črnih kvasovk rodu *Phialophora*. Göttlich s sodelavci (2002) je opazila več različnih vrst rodu *Phialophora* (danes rod *Cadophora*; de Hoog in sod. neobjavljeni podatki) v hladni vodovodni vodi. Podobne glive so našli v finski vodovodni vodi, iz katere so izolirali tudi vrste rodu *Exophiala*, *Aureobasidium* in *Mucor* (Kärkkäinen in sod., 2009).

Okolja z **visoko zračno vlažnostjo** in temperaturami med 20 °C in 40 °C predstavljajo optimalne razmere za rast številnih gliv. Taka okolja najdemo v naravi (tropski deževni gozdovi), nekatera pa so ustvarjena umetno (kopalnice, kuhinje, savne) (Zalar in sod., 2011). V tropskih gozdovih so tako odkrili prisotnost rodu *Exophiala* na sadežih ter v iztrebkih ljudi in živali (Sudhadham in sod., 2008). V kopalnicah, kuhinjah in savnah so prav tako potrdili prisotnost nekaterih črnih kvasovk, kot so predstavniki rodov *Exophiala*, *Cladophialophora* in *Aureobasidium* (Matos in sod., 2002; Sudhadham, 2009, Lian in de Hoog, 2010). V antropogenih okoljih so bile odkrite tudi bele kvasovke (rodov *Candida* in *Pichia*) ter glive rodov *Acremonium*, *Fusarium* in *Cladosporium* (Anaissie in sod., 2001; Göttlich in sod., 2002; Zalar in sod., 2007).

2.1.3 Najpogostejši rodovi in vrste gliv iz naravnih in umetnih habitatov

Rod *Acronium* (Ascomycota, Hypocreales) predstavlja svetovno razširjene filamentozne glive, ki dobro rastejo pri temperaturi 25 °C. Kolonije so bele, sive ali rahlo rožnate, rast je počasna. Njihova spolna oblika je slabo raziskana. Vrste *A. falciforme*, *A. kiliense*, *A. recifei*, *A. alabamensis*, *A. potroni*, *A. roseo-griseum* in *A. strictum* lahko povzročajo infekcije pri imunsko oslabljenih ljudeh (Kwon-Chung in Bennett, 1992).

Rod *Alternaria* (Ascomycota, Pleosporales) je znan po močni razširjenosti v zraku in vodi. Glive tvorijo temen pigment melanin, ki jih ščiti pred UV-sevanjem in izsuševanjem. Kolonije so temne barve in hitro rastoče. Te glive so pogosto kontaminante hrane, saj so razširjene v zraku tudi znotraj prostorov. Pri imunsko občutljivih ljudeh lahko povzročajo astmo, sinusitis ali hujše infekcije dihal. (Collier in sod., 1998)

Rod *Aspergillus* (Ascomycota, Eurotiales) je eden izmed najpogosteje izoliranih rodov gliv iz vode (Pereira in sod., 2010). Znotraj rodu *Aspergillus* najdemo vrsti *A. niger* in *A. fumigatus*, ki sta potencialna patogena in nista gostiteljsko specifična (Debeaupuis in sod., 1997). *A. fumigatus* je termofilna gliva, uspeva lahko do temperature 55 °C, spore pa preživijo tudi do temperature 70 °C. Konidiji so lahko različno pigmentirani (Raper in Fennell, 1965). Ta gliva je eden najpogostejših povzročiteljev oportunističnih in bolnišničnih okužb, predvsem pri osebah z oslabljenim imunskim sistemom (Dixon in sod., 1996). Ker se razširja s konidiji po zraku, lahko le-ti zaidejo v pljučne alveole in povzročajo pljučna obolenja. Lahko proizvaja mikotoksine (aflatoksini) (Rementeria in sod., 2005). Pri invazivni aspergilozi je smrtnost več kot 50-odstotna (Lalgé, 1999).

Vrste rodu *Aureobasidium* (Ascomycota, Dothideales) pogosto najdemo v tleh, v površinskih vodah, na površini rastlin, na človeški koži. Izolirali so jih tudi iz antropogenih okolij, kot so kuhinje, kopalnice in vodovodi (Hageskal in sod., 2006). Mlade kolonije so rožnate barve, gladke in svetleče, medtem ko starejše tvorijo melanin in velike količine ekstracelularnih polisaharidov (EPS). Dobro rastejo pri temperaturi 25 °C. Lahko povzročajo alergije, podatki o okužbah pa so redki. Pri ljudeh z oslabljenim imunskim sistemom povzročajo kožne in pljučne mikoze, meningitis (Collier in sod., 1998).

Vrste rodu *Cadophora* so klinično nepomembne črne kvasovke, saj jih nikoli niso povezovali z okužbami ljudi ali živali (povzeto po Zalar in sod., 2011). Našli so jih v vodovodni, morski vodi in na lesu (Göttlich in sod., 2002).

Kvasovke rodu *Candida* (Ascomycota, Saccharomycetales) so razširjene po vsem svetu. Predstavnike tega rodu najdemo v tleh, vodi in na površini rastlin (Bodey in sod., 1992). Pogosto naseljujejo površino človeške kože in sluznic in tam predstavljajo normalno floro. *C. albicans*, *C. parapsilosis* in nekatere druge vrste so med najpogostejšimi kliničnimi izolati, ki povzročajo kandidaze. Čeprav so kandidaze običajno posledica prevelike namnožitve kandid znotraj gostitelja, pa se kandidate lahko prenesejo tudi s katetrov na paciente, z matere na otroka ali pa med partnerji (Band in sod., 1979). Vežejo se na tkivo gostitelja, proizvajajo proteaze in fosfolipaze. So dimorfne glive, rastejo v hifni ali kvasni obliki. Celice tvorijo kapsule, kolonije so rumenkasto bele barve in hitro rastoče. Rastni optimum je med 20 °C in 37 °C (Bodey in sod., 1992).

Rod *Cladosporium* (Ascomycota, Capnodiales) je eden izmed najbolj razširjenih glivnih rodov po svetu. Vrste tega rodu so bile najdene v zraku, tleh, v subtropskih in tropskih območjih (de Hoog, Queiroz-Telles in sod., 2000) ter v izjemno slanih okoljih in kopalnicah (Zalar in sod., 2007). Najpogostejše vrste so *C. elatum*, *C. herbarum*, *C. sphaerospermum* in *C. cladosporioides* (Collier in sod., 1998). Tvorijo zelene ali temno pigmentirane hife in konidije, dobro rastejo pri temperaturi 25 °C, nad 35 °C pa večina vrst ne raste. Celični pigment je melanin. Pri imunsko oslabljenih ljudeh lahko povzročajo kožne infekcije, keratitis, sinusitis ali pljučne infekcije (Collier in sod., 1998).

Znotraj debla Basidiomycota uvrščamo kvasni rod *Cryptococcus*, in sicer v več redov (Tremellales, Filobasidiales, Sporidiobolales. To so kvasovke s kapsulo, najdemo jih na površini rastlin, v tleh, vodi, izolirane so bile tudi iz okuženih živali (Baro in sod., 1999). Izmed 37 vrst sta patogeni le dve vrsti: *C. neoformans* in *C. gatii* (de Hoog s sod., 2000), ki povzročata kronični meningoencefalitis (Barber in sod., 1995). Pri imunsko oslabljenih ljudeh pa tudi vrsti *C. laurentii* in *C. albidus* povzročata infekcije urinarnega trakta. Kolonije kriptokokov so hitro rastoče, rumenkasto bele barve. Dobro rastejo pri temperaturah med 25 °C in 37 °C, pri 40 °C se rast upočasni (Collier in sod., 1998).

Značilnost rodu je, da ne fermentirajo sladkorjev, producirajo fenolno oksidazo in DOPA melanin (Larone, 1995).

Rod *Exophiala* (Ascomycota, Chaetothyriales) združuje dimorfne črne kvasovke. Kolonije teh gliv so rjave ali črne barve, gladke ali puhaste, odvisno od vrste in starosti. Od 23 znanih vrst črnih kvasovk iz rodu *Exophiala* je 17 vrst takih, ki lahko kolonizirajo živali in ljudi ter povzročajo bolezni (Anaissie in sod., 2009). Povzročajo kromoblastomikozo, okužbe živčnega sistema, okužbe dihal. Prizadeti so pacienti s cistično fibrozo, transplantacijami, rakom ali AIDS-om (Taj-Aldeen in sod., 2006, Haase in sod., 1991). Bolniki s cistično fibrozo imajo genetsko napako, zaradi katere imajo v pljučih, na koži in v prebavilih višjo stopnjo slanosti. Predvidevajo, da je *E. dermatitidis* kot stalni naseljevalec pljuč teh bolnikov, halotolerantna vrsta (Haase in sod., 1991). *E. dermatitidis* lahko okuži tudi zdrave posameznike in povzroča fatalne možganske infekcije (Chang in sod., 2000). Smrtnost pri okužbi možganov z *E. dermatitidis* je zelo visoka (Anaissie in sod., 2009). Poleg *E. dermatitidis*, so iz kliničnih vzorcev pogosto izolirane še *E. castellanii*, *E. jeanselmei*, *E. moniliae*, *E. pisciphila*, *E. salmonis*, *E. spinifera*, *E. phaeomuriformis*. Izolirali so jih iz tal, rastlin in vode. *E. dermatitidis* so izolirali iz tropskih in subtropskih gozdov, iz ptic, netopirjev ter iz savn. Tropski gozdovi bi lahko bili izvor te vrste (Sudhadham in sod., 2008). Našli so jo na mestih, onesnaženih z ogljikovodiki (nafta in derivati), na lesu, obdelanem s kreozotom in v ostalih umetnih okoljih (de Hoog in sod., 2000, Matos in sod., 2002). *E. dermatitidis* lahko razgrajuje alkilbenzene, ki so strukturno podobni nevrottransmitterjem. Ta lastnost bi lahko bila eden izmed virulentnih dejavnikov te glive. Sposobna je tudi asimilacije toksičnih monoaromatskih spojin kot edinega vira ogljika (Prenafeta-Boldú in sod., 2006). Je oligotrofna in lahko raste v pufru, kot je negativna kontrola ID32C sistema, ki se uporablja za identifikacijo kvasovk. To pojasnjuje tudi njeno zmožnost rasti v farmacevtskih pripravkih (MMWR, 2002). *E. dermatitidis* dobro raste pri različnih pH vrednostih, visokih temperaturah (do 42 °C) in visoki zračni vlažnosti. Proizvaja melanin, eksopolisaharide in kapsulo (Matos in sod., 2002). Ima pleomorfen življenjski krog, preklaplja med celično, muriformno obliko in psevdo hifno obliko. Muriformne celice so okrogle oblike, z zelo debelo celično steno. So melanizirane in imajo septo, ki jih deli na pol. Pogosto so jih našli v kliničnem materialu. Muriformna oblika rasti je oblika med

hifno in kvasno morfologijo (McGinnis, 1983). Koncentracija in razpoložljivost kalcijevih ionov je pomemben dejavnik za regulacijo oblike rasti *E. dermatitidis* in posledično za njeno virulenco. Pri nizkih koncentracijah kalcijevih ionov je njihova rast nepolarna, muriformna in virulentna. Pri višjih koncentracijah je favorizirana polarna rast v obliki brstenja celic ali psevdo hif (Karuppaiyil in Szaniszló, 1997). Na obliko rasti vpliva tudi pH. Pri nižjem pH je rast kvasna, pri nevtralnem ali alkalnem pH pa gliva tvori psevdo hife (Wang in Szaniszló, 2009). Znotraj vrste *E. dermatitidis* ločimo 3 genotipe; **genotip A**, **genotip B** in **genotip C** (Matos s sod., 2003). Razlikujemo jih na podlagi ITS rDNA zaporedja. Genotip B so pretežno izolirali iz okoljskih virov, medtem ko so genotip A večinoma izolirali iz kliničnega materiala. To je lahko posledica razlik v virulenci (Matos in sod., 2003). Spolna oblika te glive ni definirana (de Hoog in sod., 2000). Za razliko od *E. dermatitidis*, *E. phaeomuriformis* in ostale vrste iz rodu *Exophiala* rastejo pri nižjih temperaturah. *E. phaeomuriformis* nima kapsule, pogosto jo najdejo v kliničnem materialu, opisali pa so jo tudi kot kolonizatorja kopalnic (de Hoog in sod., 2000, Matos in sod., 2002).

Glive rodu *Fusarium* (Ascomycota, Hypocreales) dobro rastejo pri temperaturi med 25 °C in 35 °C in pri pH med 5 in 7. Tvorijo belo rožnate, puhaste kolonije (de Hoog in sod., 2000). Povzročajo bolezn rastlin, lahko se prenašajo z vodo (Hageskal in sod., 2006). Vrste *F. solani* in *F. dimerum* so identificirali kot oportunistična patogena, ki povzročata sistemske ali lokalne okužbe pri ljudeh z oslabljenim imunskim sistemom. Povzročajo kožne infekcije in infekcije preko katetrov, tvorijo pa tudi mikotoksine (Austen in sod., 2001; Bigley in sod., 2004; Kremery in sod., 1997; Letscher-Bru in sod., 2002). Vodovodni sistemi so se izkazali kot možen vir *F. dimerum* (Schroers in sod., 2009), oportunistični patogeni rodu *Fusarium* pa naj bi v splošnem povzročali bolnišnične okužbe (Zhang in sod., 2006). Tovrstne okužbe je težko odpraviti, saj so nekatere vrste odporne na večino antimikotikov (Arikan in sod., 1999).

Vrste rodu *Mucor* (Zygomycota, Mucorales) so filamentozne, v naravi zelo razširjene glive. Rastejo v obliki puhastih kolonij, sive barve. Tvorijo zračni micelij, z značilno obliko pigmentiranih sporangiospor. Večina vrst dobro raste med 25 °C in 30 °C, pri temperaturah, višjih od 37 °C je rast šibka oz. ne rastejo. Nekatere vrste (*M. circinelloides*,

M. racemosus) lahko rastejo tudi pri visoki slanosti in so bile izolirane iz solinske vode (Abdel-Fattah in sod., 1977). Sevi, ki povzročajo okužbe ljudi in živali spadajo med redke termotolerantne vrste. Pri imunsko oslabljenih ljudeh in pri ljudeh z diabetesom lahko povzročajo zigomikoze. Najpogostejše so okužbe z *M. circinelloides*, *M. indicus* in *M. racemosus*, ki povzročajo kožne infekcije (de Hoog in sod., 2000). Patogena živali *Mucor pusillus* in *Mucor miehei* rastejo pri 37 °C, tvorita sporangiospore. Rast in tvorba spor je optimalna pri pH 5,0 in 6,0. Vrste lahko razgrajujeta karboksimetil celulozo, škrob in dekstrin (Ogundero, 1981).

Naravni habitat gliv rodu *Neurospora* (Ascomycota, Sordariales) je rastje v tropskih in subtropskih območjih pa tudi v hladnejših in vlažnih območjih Amerike in Evrope. Lahko se širijo po zraku in vodi (Jacobson in sod., 2006). So tesno sorodne nekaterim rastlinskim in živalskim patogenom. Vrste tega rodu niso patogene za človeka, uporabne so v genetiki. Rast je filamentozna, rastejo pri temperaturah med 10 °C in 33 °C, preživijo tudi pri temperaturi 4 °C (Dunlap in sod., 2007).

Rod *Paecilomyces* (Ascomycota, Eurotiales) združuje glive, podobne rodu *Penicillium*, vendar drugače pigmentirane. Najpogostejši vrsti sta *P. lilacinus* in *P. variotii*. *P. variotii* je termofilna vrsta, dobro raste pri temperaturah do 60 °C. Omenjene vrste so izolirane iz tal, vode, razpadajočega rastlinskega materiala. Lahko povzročajo okužbe pri žuželkah, redko pa poročajo o infekcijah pri ljudeh. Pri imunsko oslabljenih pacientih povzročajo sinusitis, alergije, kožne in pljučne infekcije, pa tudi infekcije preko katetrov (de Hoog in sod., 2000).

Podobno kot glive iz rodu *Aspergillus*, so tudi glive iz rodu *Penicillium* (Ascomycota, Eurotiales) zelo pogosto izolirane iz vode. S konidiji se razširjajo po zraku in predstavljajo alergen za človeka. Vrste tega rodu so filamentozne, dobro rastejo pri 25 °C in 37 °C. Številne so kserofilne, iz zraka privzemajo vlago, če je vlažnost vsaj 60 %. Konidiji so lahko različno pigmentirani. V rodu *Penicillium* najdemo vrsto *P. chrysogenum*, iz katere pridobivajo antibiotik penicilin. Vrste *P. verrucosum* in *P. marneffeii* sta pomembna oportunistična patogena (de Hoog, 2000). *P. verrucosum* proizvaja mikotoksin okratoksin A, ki je nevrotropičen in karcinogen (Pitt, 1987). *P. marneffeii* je invazivna gliva, ki se

pojavlja kot tretji najpogostejši oportunistični patogen pri bolnikih v Jugovzhodni Aziji, okuženih z virusom HIV. Je dimorfna gliva, raste v hifni ali kvasni obliki ter povzroča penicilozo z vstopom preko dihalnega sistema. Če se bolezen ne zdravi, se običajno konča s smrtjo bolnika (Skoulidis in sod., 2004).

Glive rodu *Phoma* (Ascomycota, Pleosporales) so glive s konidiogenimi celicami v plodiščih, izolirali so jih iz tal, rastlinskega materiala, sladke in slane vode. Kolonije so hitro rastoče, zrnate in olivno zelene barve. Dobro rastejo pri 25 °C, pri 37 °C se rast upočasni. Nekatere vrste proizvajajo sekundarne metabolite. Povzročajo bolezni rastlin, redko tudi bolezni človeka. Okuži ljudi z oslabljenim imunskim sistemom, običajno preko poškodb kože. Povzroča kožne in redko sistemske infekcije (de Hoog in sod., 2000).

Rod *Pichia* uvrščamo med kvasovke (Ascomycota, Saccharomycetales), so telomorfi in producirajo askospore. Anamorf so nekatere vrste rodu *Candida*. Najbolj znane vrste so *P. anomala*, *P. guilliermondii*, *P. norvegensis* in *P. ohmeri*. Izolirali so jih iz rastlin, vode, živali (Manfredini in sod., 1995). Kolonije so bele, rahlo rožnate, pH optimum je med 4 in 5,5 dobro rastejo in fermentirajo sladkorje pri temperaturi 30 °C do 36 °C (Du Preez in sod., 1986). Redko se pojavljajo kot oportunistični patogeni človeka. Ponavadi se infekcije pojavijo pri bolnikih, ki so dalj časa v bolnišnici, pri otrocih, nedonošenčkih in novorojenčkih z nizko porodno težo (Manfredini in sod., 1995).

Znotraj debla Basidiomycota je uvrščen rod *Rhodotorula* (Sporidiobolales). Vrste tega rodu so kvasovke z rdečim, oranžnim ali rumenim pigmentom. Kolonije so hitro rastoče, gladke, mehke in svetleče. Ne fermentirajo ogljikovih hidratov (de Hoog in sod., 2000). Poznanih je približno 100 vrst, najpogostejše so *R. glutinis*, *R. minuta* in *R. mucilaginosa*. Razširjene so v zraku, sladki in slani vodi, v prsti, mlečnih izdelkih. Lahko kolonizirajo rastline, ljudi in druge sesalce (Rose in Kurup, 1977). *R. mucilaginosa* je edina vrsta, ki povzroča infekcije ljudi. Dobro raste pri temperaturi 25 °C, ne raste pri temperaturi 40 °C ali na cikloheksimidu (Kurtzman in Fell, 1998). Ogroženi so imunsko oslabljeni pacienti, bolniki z AIDS-om in akutno levkemijo. Infekcije so večkrat povezane z uporabo katetrov (Neofytos in sod., 2007).

Rod *Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales) vsebuje 89 vrst, najpogostejše so *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. pseudokoningii*, *T. viride*, *T. asperelum* in *T. citrinoviride*. So filamentozne glive, razširjene v zraku, vodi, prsti, razpadajočem rastlinskem materialu. Kolonije so pri 25 °C hitro rastoče. Konidiji so modrozeleno ali rumenozeleno pigmentirani (de Hoog in sod., 2000). O okužbah so redko poročali in sicer pri imunsko oslabljenih bolnikih po transplantacijah, s kronično odpovedjo ledvic ali kroničnimi pljučnimi boleznimi (Bren, 1998).

2.2 POMIVALNI IN PRALNI STROJI KOT HABITAT

Prvi **pomivalni stroj** je bil izumljen v Ameriki leta 1850 - Joel Houghton je patentiral lesen stroj s kolesom na ročni pogon. Kolo je škropilo vodo na posodo. Leta 1886 je Josephine Cochrane izumila prvi mehanski pomivalni stroj na ročni pogon (Gizmo Highway, 2005). Danes pomivalni stroj deluje tako, da po vklopu programskega stikala prične v stroj dotekati voda. V prvem delu pomivalnega cikla se vodi doda tudi detergent za pranje. Voda se ogreje na želeno temperaturo, curki vode pa enakomerno oblivajo vse dele posode. V drugem delu pomivalnega ciklusa čista voda splakuje detergent in umazano vodo. Poleg detergenta se na vratih nahaja tudi posoda za mehčalec vode, ki se doda zadnji vodi za izpiranje. Grelec na koncu ogreje in posuši vsebino stroja (Puncer in Vaš, 2000).

Za čiščenje posode ločimo več različnih programov, glede na umazanost posode. Najintenzivnejši program občasno dosega temperature med 50 °C in 75 °C. Najpogosteje uporabljen, standardni program pa dosega temperature med 46 °C in 66 °C.

Pri podjetju Miele so razvili pomivalni stroj, ki pri zadnjem izpiranju doseže temperaturo 85 °C. Kontaktni čas je med 1 in 10 minutami. S tem zmanjšajo raven bakterij in dosežajo višje higienske standarde (UBM Canon, 2010). Organizacija NSF International testira pomivalne stroje po standardu NSF/ANSI Standard 184. Ta standard so razvili za zagotavljanje, da pomivalni stroji dobro očistijo posodo in s tem prispevajo k preprečevanju okužb v gospodinjstvih. Proizvodi certificirani po tem standardu, po uporabi cikla dosežejo 99,9 % bakterijsko redukcijo. Pri testiranju na posode nanesejo hrano in znano število bakterij, po izvedenem pranju pa ugotavljajo, kako uspešno je bilo čiščenje

posode in kolikšen je odstotek preživelih bakterij (NSF International, 2008).

Prvi **pralni stroj** je bil izumljen leta 1851 in je tedaj deloval na ročni pogon. Leta 1910 so patentirali pralni stroj s pocinkanim bobnom in električnim motorjem (Bellis, 2011). V Sloveniji so se pralni stroji začeli uporabljati v 60. letih 20. stoletja. Po statističnih podatkih o opremljenosti stanovanj z gospodinjskimi električnimi napravami je bilo leta 1998 96,4 % stanovanj opremljenih s pralnimi stroji (največ med vsemi gospodinjskimi stroji) (Malovrh in sod., 1999).

Postopek pranja perila poteka v bobnu stroja po programu, ki si ga izberemo glede na vrsto in umazanost perila. Na učinek pranja vpliva več dejavnikov: voda, kemična sredstva, pralna sredstva, sredstva za mehčanje, temperatura, mehanika (vrtenje bobna) in čas. Ti dejavniki so z različnimi programi pranja prilagojeni posameznim vrstam perila. Pri programu za neobčutljivo perilo doseže centrifuga tudi do 1600 vrtljajev na minuto, temperatura vode pri pranju pa je 40 °C, 60 °C ali 95 °C. Pri programih za občutljivo perilo in volno je najvišja temperatura pranja med 30 °C in 40 °C (Malovrh in sod., 1999). Med posameznimi cikli znotraj pralnega programa se tako spreminjajo nivo, temperatura, pH, trdota vode in prisotnost detergentov.

Med izpopolnitvami v zadnjih dvajsetih letih se pri razvoju novih gospodinjskih aparatov posveča pozornost prihrankom pri rabi energije. Skrb za čistejše okolje in za zmanjšanje porabe energije vodi k tehnološkim izboljšavam na področju energijske učinkovitosti. To pomeni čim boljši pralni učinek ob čim manjši porabi električne energije (pranje pri nizkih temperaturah), vode in pralnih sredstev (Malovrh in sod., 1999).

2.2.1 Kemična sestava detergentov in soli za mehčanje vode

V sredstvih, uporabljenih pri pranju posode in oblačil se pogosto nahajajo sledeče spojine: alkoholi (maščobni alkoholi, terpeneol, polimeri etilen glikola, sorbitol, benzotriazol), barvila, belila (TAED, fluorescentna belila), derivati surove nafte (PVP (polivinilpirolidon) kopolimeri), dišave (limonen, citral), encimi (amilaze, proteaze, lipaze), fosfati (natrijev trifosfat, kalijev trifosfat), fosfonati, karbonati, silikati (natrijev karbonat, kalcijev karbonat, natrijev silikat), kisline, maščobne kisline (poliakrilna, natrijeva akrilna, očetna,

citronska, cinkov acetat), konzervansi (metilzotiazolinon, metilkloroizotiazolinon), minerali (kaolin), olja (hidrogenirano rastlinsko olje), sladkorji (saharoza, rižev in koruzni škrob, celuloza, karboksimetil celuloza, dekstrin), soli (soli EDTA), sulfati (natrijev sulfat, natrijev tiosulfat) in voda (ZPS, 2009).

Alkoholi delujejo kot napolarna topila v katerih se topijo maščobe. Barvila in dišave dajejo izdelku barvo in vonj. Konzervansi preprečujejo, da bi se izdelek pod vplivom mikroorganizmov pokvaril. Oksidanti oz., belila na osnovi klora in kisika med procesom pranja reagirajo v vodikov peroksid in karbonate, kar imenujemo proces beljenja. Fosfonati tvorijo stabilne spojine z ioni, iz vode izločajo ione kovin. Karbonati, silikati, citrati, polikarboksilati in fosfati se uporabljajo za zmanjševanje trdote vode, vežejo kalcijeve in magnezijeve ione. Zvišajo pH, uporabni so tudi kot sredstva proti koroziji. Zaviralce zabarvanja (polivinilpirolidon oz. PVP) uporabljajo za preprečevanje izločanja barve oblačil (A.I.S.E. / Cefic, 2009).

Večina teh spojin je biološkega izvora in so biološko razgradljive. Razgradijo se v procesu aerobne in delno anaerobne razgradnje v čistilnih napravah. Med biološko lahko razgradljive spojine spadajo alkoholi, kisline, encimi, olja in nekateri sladkorji. Med biološko težko razgradljive spojine spadajo zaviralci zabarvanja (PVP), nekatera belila in kompleksni sladkorji (karboksimetil celuloza). Sem spadajo tudi fosfonati, nekateri konzervansi ter EDTA in njene soli. Nekatere od teh snovi so toksične za človeka in okolje (Poročilo komisije..., 2009).

2.2.2 Glive, izolirane iz pomivalnih in pralnih strojev

O glivni flori v pomivalnih in pralnih strojih je malo znanega. Ugotovljeno je bilo, da se pojavljajo plesni v okolici in notranjosti obeh gospodinjskih aparatov, vendar glivna flora ni podrobno raziskana. Menili so, da je pojav plesni povezan z zračno vlago v prostorih s temi gospodinjskimi aparati (Whitmyre in Pandian, 2004).

S pomivalnimi stroji so povezane okužbe z glivami rodu *Candida*. Poročali so o okužbi nohtov z glivo vrste *Candida albicans* pri ljudeh, ki so pogosto v stiku z vodo ali pomivalnimi stroji (Bennett, 1998). Bolnišnično okužbo otrok z vrsto *Candida glabrata* so povezali z uporabo stekleničk za mleko. Le te so bile oprane v pomivalnem stroju, ki pred tem dva meseca ni bil v uporabi (Nedret Koc in sod., 2002).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Laboratorijski pribor

Preglednica 1: Laboratorijski pribor, uporabljen pri raziskovalnem delu

Laboratorijski pribor	Proizvajalec in poreklo
Avtomatska pipeta e5000 BIOHIT	KEMOMED, Kranj, Slovenija
Avtomatska pipeta Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Cepilne zanke	
Infuzijske steklenice	
Injekcijske brizge	
Kovinske kroglice za homogenizacijo	Retsch, Haan, Nemčija
Krioviale	Microbank, ZDA
Laboratorijska steklovina (čase, merilni valji, palčke, erlenmajerice, petrijevke, sistem za filtracijo, epruvete...)	
Laboratorijske rokavice (nepudrane lateks in nitrilne)	
Mikrocentrifugirke (1,5 mL, 2 mL)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Mikrotitrne plošče z 96 luknjicami	Biokit, Finska
Nastavki za Multipette Plus (Combitips Plus 0,5 mL)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Nastavki za polavtomatske pipete	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Nitrocelulozni filtri s porami 0,45 µm	Millipore Co., Billerica, ZDA
Nosilci iz aluminija	Agar Scientific, ZDA
Objektna in krovna stekelca	
Ogljikovi diski	Agar Scientific, ZDA
Papirnate brisače	
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, ZDA
Pincete	

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Preglednica 1: Laboratorijski pribor, uporabljen pri raziskovalnem delu

Laboratorijski pribor	Proizvajalec in poreklo
Plastične petrijevke premera 70 mm	Golias, Slovenija
Plastične vrečke	
Polavtomatske pipete	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Slamice	
Spatule	
Škarje	
Vata	
Vatenke	
Viale	Microbank, ZDA
Zaščitna maska z elastiko	Bastos Viegas s.a., Penafiel, Portugalska

3.1.2 Laboratorijske naprave

Preglednica 2: Laboratorijske naprave s proizvajalcem in državo porekla

Laboratorijske naprave	Proizvajalec in poreklo
Aparat PCR Mastercycler	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Aparature za elektroforezo	Natalia, Belgija
Avtoklav A-63C	Kambič, Semič, Slovenija
Centrifuga 5418	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Centrifuga 5810R	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Digestorij Variolab W90	Waldner Laboratory, Wangen, Nemčija
Ekonom lonec	Clatronic, Kempen, Nemčija
Hladilnik Comfort NoFrost	Liebherr, Nemčija
Hladilnik Electrolux	Švedska
Hladilnik Premium NoFrost	Liebherr, Nemčija
Homogenizator MM301	Retsch, Haan, Nemčija
Inkubator	Sutjeska, Bosna in Hercegovina
Inkubator I-105 CK	Kambič, Semič, Slovenija

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Preglednica 2: Laboratorijske naprave s proizvajalcem in državo porekla

Laboratorijske naprave	Proizvajalec in poreklo
Inkubator Mini Incubator	Labnet International Inc., New York, ZDA
Komora za slikanje gelov G:BOX	Syngene, Cambridge, Velika Britanija
Laminarij IBK 1 V2	Iskra, Slovenija
Laminarij SC8-R	Labcaire, Velika Britanija
Ledomat ATS 40	Angelantoni Scientifica, Italija
Magnetno mešalo Rotamix 550MMH	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Mikrovalovna pečica	Gorenje, Slovenija
pH meter Metrohm 713	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Stereomikroskop	Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, Nemčija
Svetlobni fazno-kontrastni mikroskop BX 51	Olympus, Tokyo, Japonska
Tehtnica EXACTA 310EB	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Vibracijski mešalnik IKA MS3 Basic	IKA Works, Wilmington, ZDA
Vibracijski mešalnik Vortex-Genie2	MO BIO Laboratories Inc., ZDA
Vodna kopel WNE 22	Memmert, Velika Britanija
Vrstični elektronski mikroskop JEOL JSM - 6500F	Jeol, Japonska

3.1.3 Kemikalije in reagenti

Preglednica 3: Seznam uporabljenih kemikalij s proizvajalcem in državo porekla

Kemikalija	Proizvajalec in poreklo
Aceton	Merck, Darmstadt, Nemčija
Agar Kobe I	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemčija
Agaroz	Sigma Aldrich Co., St. Louis, ZDA
Amonijev molibdat hidrat ((NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4H ₂ O)	Laphoma, Skopje, Makedonija
Bakrov sulfat (CuSO ₄ * 5H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Nemčija
Cinkov sulfat (ZnSO ₄ * 7H ₂ O)	Sigma Aldrich Co., St. Louis, ZDA
Celit	Merck, Darmstadt, Nemčija
CTAB	Merck, Darmstadt, Nemčija
dNTP Mix (10mM)	Applied Biosystems, ZDA
EDTA	Merck, Darmstadt, Nemčija
Etanol	Riedel – de Haën, Seelze, Nemčija
Fenol	Fluka, Švica
Gelsko barvilo SYBR Safe	Invitrogen, Carlsbad, ZDA
Glicerol	Kemika, Zagreb, Hrvaška
Glukoza	Kemika, Zagreb, Hrvaška
Glutaraldehyd	SPI-Chem, SPI Supplies, West Chester, ZDA
HMDS (1,1,1,3,3,3 - heksametildisilazan)	Merck, Hohenbrunn, Nemčija
Kalcijev klorid (CaCl ₂ * 2H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Nemčija
Kalijev dihidrogen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Kemika, Zagreb, Hrvaška
Kalijev klorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Nemčija
Kalijev nitrat (KNO ₃)	HEMOFARM, Šabac, Srbija
Kilobazna lestvica (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus)	Fermentas, Kanada
Kloramfenikol (Ch)	Sigma Aldrich Co., St. Louis, ZDA
Kloroform	Kemika, Zagreb, Hrvaška
Klorovodikova kislina (HCl)	Merck, Darmstadt, Nemčija

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Preglednica 3: Seznam uporabljenih kemikalij s proizvajalcem in državo porekla

Kemikalija	Proizvajalec in poreklo
Kobalt (II) klorid ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt, Nemčija
Kvasni ekstrakt	Biolife, Milano, Italija
Magnezijev klorid ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt, Nemčija
Magnezijev klorid 25 mM	Fermentas, Kanada
Magnezijev sulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Acros Organics, New Jersey, ZDA
Manganov (II) klorid ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt, Nemčija
Na-EDTA	Merck, Darmstadt, Nemčija
Nanašalni pufer Gel Pilot Loading Dye 5 X	QIAGEN, Nizozemska
Nanašalni pufer Orange G	BioLabs Inc., ZDA
Natrijev hidroksid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Nemčija
Natrijev klorid (NaCl)	Carlo Erba Reactifs, Francija
Natrijev nitrat (NaNO_3)	Merck, Darmstadt, Nemčija
Ocetna kislina	Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija
Osmijev tetraoksid (OsO_4)	SPI-Chem, SPI Supplies, West Chester, ZDA
Paraformaldehid	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
Pepton	Merck, Darmstadt, Nemčija
Platina / zlato	
Polimeraza Dream Taq DNA Polymerase 5 U/ μL	Fermentas, Kanada
Polimerazni pufer Dream Taq Buffer 10 X	Fermentas, Kanada
PrepMan Ultra	Applied Biosystems, ZDA
Saharoza	Acros Organics, New Jersey, ZDA
Silikagel	Merck, Darmstadt, Nemčija
Sladni ekstrakt (MEA)	Biolife, Milano, Italija
Tris	Merck, Darmstadt, Nemčija
Tris-HCl	Merck, Darmstadt, Nemčija
Tween 80	ICI Americas, Inc., Wilmington, ZDA
Železov sulfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Sigma Aldrich Co., St. Louis, ZDA

3.1.4 Raztopine in pufri

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

Založni raztopini:

I: 0,2 M dibazični natrijev fosfat: 7,122 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, destilirana voda do 200 mL

II: 0,2 M dibazični natrijev fosfat: 3,131 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, destilirana voda do 200 mL

0,1 M natrijev fosfatni pufer:

založna raztopina I:	36 mL
založna raztopina II:	14 mL
destilirana voda	do 100 mL

Agarozni gel za elektroforezo:

1 % agarozni gel:

Agaroz	25 mg
1X TAE pufer	25 mL

Agarozni dodamo 1X TAE pufer, raztopimo v mikrovalovni pečici.

CTAB pufer:

Tris	2,42 g
NaCl	8,2 g
Na-EDTA	0,74 g
CTAB	2g
Ultra čista destilirana voda (MiliQ)	do 80 mL

Raztopini uravnamo pH na 7,5 z 1 N HCl, nato z destilirano vodo dopolnimo do volumna 100 mL. Pripravljen pufer avtoklaviramo pri 121 °C, 15 minut. Hranimo pri sobni temperaturi.

Fiksativ:

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

2,5 % glutaraldehid	1 mL
4 % paraformaldehid	5 mL
0,2 M natrijev fosfatni pufer	4 mL

Fiziološka raztopina:

NaCl	9 g
destilirana voda	do 1000 mL

Kilobazna lestvica:

Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus (0,5 µg/µL):

DNA Ladder	100 µL
6 X DNA Loading Dye	100 µL
ultra čista destilirana voda	300 µL

Mešanica silikagela:

silikagel	30 g
celit	15 g

80 – 100 mg odmerimo v 2 mL mikrocentrifugirke z oglatim dnom. Avtoklaviramo pri 121 °C, 15 minut. Hranimo pri sobni temperaturi.

Nanašalni pufr:

10 X nanašalni pufer Orange G:

saharoza	20 g
Orange G	100 mg
destilirana voda	do 50 mL

Saharozo raztopimo v 40 mL destilirane vode. V pripravljeno raztopino dodamo Orange G in z destilirano vodo dopolnimo do volumna 50 mL.

Oligonukleotidni začetniki:

Preglednica 4: Oligonukleotidni začetniki in njihova uporaba

Gen ali regija v genomu	Začetni oligonukleotid in sekvenca	Povratni oligonukleotid in sekvenca	Referenca
Aktin	ACT-512F 5'-ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC-3'	ACT-783R 5'-TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT-3'	Carbone in Kohn, 1999
β-tubulin	Bt2a 5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3'	Bt2b 5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3'	Glass in Donaldson, 1995
ITS regija	ITS 5 5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'	ITS 4 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	White in sod., 1990
LSU regija	NL 1 5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3'	NL 4 5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'	Boekhout in Kurtzman, 1996
Fingerprint	M13 5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3'	/	Andrighetto in sod., 2000

Oligonukleotidni začetniki so v založnih koncentracijah 100 pmol/μL. V reakciji je uporabljena koncentracija 10 pmol/μL. Oligonukleotidni začetnik M13 je bil uporabljen v koncentraciji 5 pmol/μL.

Postfiksativ:

1 % OsO₄ v destilirani vodi:

4 % OsO ₄	4 mL
destilirana voda	16 mL

Pred uporabo ohladimo na 4 °C.

Raztopina za suspendiranje spor (SSS):

Tween 80	0,5 g
Agar	0,5 g
destilirana voda	do 1000 mL

Avtoklaviramo pri 121 °C, 15 minut. Hranimo na 4 °C.

TE pufer:

Tris	2,42 g
Na-EDTA	0,04 g
destilirana voda	do 80 mL

Raztopini uravnamo pH na 8,0 z 1 N HCl, nato z destilirano vodo dopolnimo do volumna 100 mL. Pripravljen pufer avtoklaviramo pri 121 °C, 15 minut. Hranimo pri sobni temperaturi.

Tris acetatni pufer (TAE):

50 X TAE:

Tris	242 g
Ocetna kislina	51,1 mL
0,5 M EDTA (pH 8)	100 mL
destilirana voda	do 1000 mL

Pripravljen pufer avtoklaviramo pri 121 °C, 15 minut.

3.1.5 Gojišča

Gojišča s sladnim ekstraktom (MEA):

Osnovno trdno gojišče MEA:

sladni ekstrakt	20 g
pepton	1 g
glukoza	20 g

agar	20 g
destilirana voda	do 1000 mL

V destilirani vodi raztopimo vse sestavine, razen agarja. Umerimo pH med 5,0 in 5,5. Dodamo agar. Po avtoklaviranju razlijemo v petrijevke.

Poševno trdno gojišče MEA: sestavine raztopimo v mikrovalovni pečici, razpipetiramo po 7,2 mL v epruvete in zamašimo z zamaški iz vate. Po avtoklaviranju položimo v poševno lego.

Trdno gojišče MEA s kloramfenikolom (Ch): osnovnemu gojišču dodamo 0,05 g kloramfenikola. Po avtoklaviranju razlijemo v petrijevke.

Trdno gojišče MEA z natrijevim kloridom (NaCl): osnovnemu gojišču se glede na željeno slanost doda ustrezna količina natrijevega klorida.

Preglednica 5: Ustrezna količina NaCl glede na željeno slanost gojišča

Odstotek NaCl v gojišču MEA (m/V): Ustrezna količina NaCl v 1000 mL gojišča:

5 %	50 g
10 %	100 g
17 %	170 g

Tekoče gojišče MEA: uporabimo vse sestavine razen agarja. Umerimo pH na željeno vrednost (od 2,0 do 13,8). Vrednosti od pH 2 do pH 12,5 avtoklaviramo. Vrednosti višjih od 12,5 ne avtoklaviramo.

Tekoče minimalno gojišče (MM) s kloramfenikolom (Ch) in fenolom:

NaNO ₃	6 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,5 g
EDTA	10,0 g

ZnSO ₄ * 7H ₂ O	4,4 g
MnCl ₂ * 4H ₂ O	1,01 g
CoCl ₂ * 6H ₂ O	0,32 g
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,315 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4H ₂ O	0,22 g
CaCl ₂ * 2H ₂ O	1,47 g
FeSO ₄ * 7H ₂ O	1,0 g
kvasni ekstrakt	0,1 g
destilirana voda	do 1000 mL
kloramfenikol	0,05 g
fenol (1 mM):	
fenol (50 mM)	2 mL
destilirana voda	do 100 mL

Vse sestavine, razen kvasnega ekstrakta, kloramfenikola in fenola raztopimo v destilirani vodi. pH uravnamo na 4,0. Dodamo kvasni ekstrakt. pH uravnamo na 5,5. Gojišče smo 10-krat redčili, mu dodali kloramfenikol in po avtoklaviranju še želen volumen fenola (v 245 mL gojišča smo dodali 5 mL fenola, v 240 mL gojišča pa 10 mL fenola).

Trdno in tekoče gojišče s sintetičnim hranilnim agarjem (SNA):

KH ₂ PO ₄	1 g
KNO ₃	6 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
Glukoza	0,2 g
Saharoza	0,2 g
Agar	20 g
destilirana voda	do 1000 mL

V destilirani vodi raztopimo sestavine. Tekočemu gojišču SNA ne dodamo agarja.

Vsa gojišča so bila avtoklavirana pri 121 °C, 15 min in shranjena pri 4 °C.

3.1.6 Programska oprema

Programska oprema, uporabljena v raziskavi:

- algoritem BLAST na uradni strani NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Altschul in sod., 1990)
- ClustalX 1.81 (Jeanmougin in sod., 1998)
- Digisar (Digisar d.o.o.)
- MEGA4 (Tamura in sod., 2007)
- programski paket GeneTools (Syngene, Cambridge, Velika Britanija)

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija in shranjevanje sevov

Izolacija sevov:

Vzorci iz pomivalnih strojev smo odvzeli z jemanjem brisov s površine in notranjosti gumijastega tesnila na vratih pomivalnih strojev. Vzorci iz pralnih strojev smo odvzeli z jemanjem brisov predalov za pralni prašek ali mehčalec ter gumijastega tesnila, ki se nahaja na vratih pralnega stroja. Vzorci smo odvzeli z uporabo sterilnih vatenk, ki smo jih predhodno namočili v sterilno fiziološko raztopino. Vatenke smo nato odložili v sterilne epruvete in v plastične vrečke. Vatenke so bile v nadaljnjem procesu uporabljene takoj, ali pa shranjene pri 4 °C in uporabljene v roku 2 tednov.

V nadaljevanju smo vzorce z vatenk nanesti na površino agarnih plošč s sladnim ekstraktom (MEA) in z dodanim kloramfenikolom (Ch), ki preprečuje rast bakterij. Plošče, inokulirane z vzorci iz pomivalnih strojev so bile inkubirane pri 25 oz. 37 °C 7 dni, plošče, inokulirane z vzorci iz pralnih strojev pa pri 25 °C 7 dni. Po končani inkubaciji smo izolirali glive v čistih kulturah na gojiščih s sladnim ekstraktom (MEA). V primeru gliv, ki so sporulirale, smo uporabili raztopino za suspendiranje spor (SSS). Inokulirane MEA plošče smo ustrezno označili in ponovno inkubirali pri zgoraj omenjenih pogojih. Ta postopek smo ponavljali, dokler nismo pridobili čistih kultur gliv.

Filtracija vode:

Pri filtraciji vode smo uporabili steklen sistem za filtracijo (zgornji nastavek, filter, nuča) in nitrocelulozne filtre proizvajalca Millipore z velikostjo por 0,45 µm. Filter smo sterilno vzeli iz ovoja in ga vklopili v sistem za filtracijo. Preko filtrov smo filtrirali različne volumne (od 1 dL do 50 L) pitne vode iz vodovodnega sistema v glivnem laboratoriju Oddelka za biologijo, vodo iz bazena (Šmarješke toplice), jezersko vodo (Fuku, Japonska), rečno vodo (Ščavnica - Ljutomer, Mura - Veržej in Drava - Ormož) in vodo odvzeto med pranjem v pomivalnem stroju (6 let, pogosta uporaba, Ljubljana). Po končani filtraciji smo filtre sterilno položili na gojišče s sladnim ekstraktom (MEA) z dodanim kloramfenikolom (Ch). Gojišča smo inkubirali pri 37 °C do vidne rasti gliv, čemur je sledilo cepljenje na gojiščih MEA do posameznih kolonij. Inokulirane MEA plošče smo zalepili s parafilmom in ponovno inkubirali pri 37 °C. Ta postopek smo ponavljali, da smo pridobili glive v čistih kulturah.

Filtre, preko katerih smo filtrirali vodovodno vodo iz glivnega laboratorija, smo prenesli v 250 mL 10 X redčenih minimalnih gojišč (MM) z dodanim kloramfenikolom (Ch) in različnimi volumni fenola (5 ml, 10 ml). Gojišča smo inkubirali pri 37 °C, 14 dni, brez stresa. Po inkubaciji smo gojišča ponovno filtrirali. Nadaljnji postopek je enak kot pri filtraciji jezerske, rečne vode, vode iz bazena in vode iz pomivalnega stroja.

Shranjevanje sevov:

Shranjevanje na poševnih gojiščih: Z uporabo cepilnih zank smo glivne kulture nacepili na poševna gojišča s sladnim ekstraktom (MEA). Poševna gojišča smo inkubirali pri 25 °C ali 37 °C 3 do 5 dni. Po končani inkubaciji smo jih shranili v EX zbirki mikrobnih kultur v hladilniku pri 4 °C.

Shranjevanje pri – 80 °C: Zanko kvasnih celic smo vnesli v kriovialo z zaščitno tekočino in kroglicami (Microbank, ZDA), vsebino dobro premešali, sterilno odstranili vso tekočino. Kriovialo smo dobro zaprli, jo ustrezno označili (EXF številka, datum in položaj shranjevanja). Tako pripravljene krioviale s kvasovkami smo shranili v zamrzovalni skrini pri – 80 °C.

Shranjevanje v tekočem dušiku: zaščitno tekočino (10 % glicerol) smo sterilno prelili v poševno gojišče z micelijem. S cepilno zanko smo v zaščitno tekočino sprostil glivni micelij oz. spore. Suspenzijo smo prelili v epruvete s pokrovom in s sterilno injekcijsko brizgo odvzeli 1 mL tekočine ter z njo napolnili sterilne, na eni strani zataljene slamice. Po 5 zataljenih in nepropustnih slamic smo zložili v vialo, ki smo jo ustrezno označili (EXF številka, datum in položaj shranjevanja). Tako pripravljene vialo smo shranili v posodo s tekočim dušikom pri $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2 DNA ekstrakcija

DNA ekstrakcija iz kvasovk: 100 μL PrepMan Ultra reagenta (Applied Biosystems) smo odpipetirali v 2 mL mikrocentrifugirke, vanje vnesli polno zanko kvasovk, jih 30 sekund stresali na vibracijskem mešalu ter inkubirali v vodni kopeli pri $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 minut. Po inkubaciji smo mikrocentrifugirke ohladili na sobno temperaturo ter centrifugirali 2 minuti pri 14000 rpm. V 1,5 mL mikrocentrifugirke smo sterilno prenesli 50 μL supernatanta. Izolirano DNA smo shranili v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

DNA ekstrakcija iz filamentoznih gliv: DNA smo ekstrahirali po protokolu Gerrits van den Ende in de Hooga (1999). V 2 mL mikrocentrifugirke z mešanico silikagela in celita (1:1) ter kovinsko kroglico smo odpipetirali 500 μL CTAB pufra ter vanj prenesli 1 cm^2 glivnega micelija. Mikrocentrifugirke smo vklopili v homogenizator in material homogenizirali 1 minuto in 30 sekund pri 30 obratih na sekundo. Homogen material smo premešali na vibracijskem mešalu ter inkubirali v vodni kopeli pri temperaturi $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 uro. V digestoriju smo po inkubaciji dodali 500 μL kloroforma, ponovno premešali na vibracijskem mešalu ter mešanico centrifugirali 5 min pri 14000 rpm. V sterilne 1,5 mL mikrocentrifugirke smo odpipetirali vodno fazo. Postopek s kloroformom smo ponovili 1-2 krat, odvisno od čistosti vodne faze. V preostali material smo dodali 2 volumna vodne faze (800 μL) 96 % etanola, raztopino ročno premešali in mikrocentrifugirke inkubirali pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ preko noči (precipitacija DNA). Po precipitaciji smo raztopino centrifugirali 5 min pri 14000 rpm, odstranili supernatant in preostali pelet sprali s 500 μL 70 % etanola. Ponovno smo centrifugirali 5 min pri 14000 rpm in odpipetirali ves etanol. Pelet smo osušili na zraku do suhega (15 min pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) ter ga resuspendirali v 50 μL TE pufra.

Mikrocentrifugirke smo inkubirali 30 min pri 37 °C. Izolirano DNA smo shranili v zamrzovalniku pri – 20 °C.

3.2.3 Molekularna analiza in identifikacija sevov

Izolirano DNA sevov smo uporabili v nadaljnji molekularni analizi. Fragmente DNA smo pomnožili z uporabo PCR aparature. V 1,5 mL mikrocentrifugirki smo si pripravili mešanico reagentov za vzorce in negativno kontrolo. Volumen mešanice za en vzorec je 34 µL, mešanica vsebuje 26,32 µL MiliQ, 0,5 µL 25 mM MgCl₂, 3,5 µL 10 X polimeraznega pufra (Fermentas, Kanada), 0,7 µL 10mM dNTP (GeneAmp, Warrington, ZDA), 1,4 µL 10 pmol/µl vsakega oligonukleotidnega začetnika in 0,18 µL 5 U/µl polimeraze Dream Taq (Fermentas, Kanada). 34 µL mešanice smo odpipetirali v 0,5 mL mikrocentrifugirke, kjer smo ji nato dodali po 1 µL DNA vzorca. Pri negativni kontroli DNA nismo dodali. Mikrocentrifugirke smo položili v aparat za PCR in nastavili želen program.

Preglednica 6: Programi za pomnoževanje različnih odsekov DNA

Postopek	PROGRAM			
	Pomnoževanje ITS	Pomnoževanje LSU	Pomnoževanje gena za ACT	Pomnoževanje gena za BTB
Začetna denaturacija	94 °C, 1 min	95 °C, 2 min	94 °C, 3 min	95 °C, 2 min
Število ciklov:	30 x:	30 x:	7 x:	30 x:
(denaturacija, naleganje oligonukleotidnih začetnikov, elongacija):	94 °C, 35 s	95 °C, 45 s	94 °C, 30 s	95 °C, 45 s
	55 °C, 53 s	54 °C, 30 s	72 °C, 45 s	60 °C, 45 s
	72 °C, 30 s	72 °C, 2 min	25 ciklov: 94 °C, 30 s	72 °C, 1 min 30 s
			53 °C, 30 s	
			72 °C, 45 s	
Končna elongacija	72 °C, 10 min	72 °C, 4 min	72 °C, 5 min	72 °C, 4 min

Za identifikacijo sevov rodu *Exophiala*, *Fusarium*, *Magnusiomyces*, *Aspergillus* in *Penicillium* smo pomnožili in določili nukleotidna zaporedja fragmenta rDNA, vključujoč ITS regijo 1, 5,8S rDNA in ITS 2. V primeru identifikacije rodov *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*, smo identifikacijo izvedli na osnovi nukleotidnih zaporedij LSU rDNA regije (domeni D1/D2). V primeru identifikacije rodu *Cladosporium* pa je bil pomnožen del gena za aktin (*ACT*). Pomnožene DNA fragmente smo ločili z elektroforezo na 1 % agaroznem gelu v 1 X TAE pufri. Za vizualizacijo v gelu smo uporabili 2,5 mL DNA barvila SYBR Safe (Invitrogen). Produkate smo poslali na sekveniranje v podjetje Macrogen (Južna Koreja). Dobljena nukleotidna zaporedja smo uredili in jih avtomatsko poravnali s programsko opremo ClustalX 1.81 (Jeanmougin in sod., 1998), poravnave pa nato ročno uredili v programu MEGA4 (Tamura in sod., 2007). Za identifikacijo sevov na podlagi nukleotidnih zaporedij smo uporabili algoritem BLAST (Altschul in sod., 1990). Posamezne genotipe znotraj vrste *Exophiala dermatitidis* smo določili na podlagi objave Matos in sodelavcev (2003).

3.2.4 Fiziologija

Testiranje rasti pri različnih pH vrednostih:

Toleranca izbranih glivnih sevov na različne pH vrednosti gojišča je bila testirana v mikrotitrskih ploščah z 96 luknjicami, v katere smo odpipetirali 300 μ L tekočega gojišča MEA s pH vrednostmi, pred avtoklaviranjem umerjenimi med 2,0 in 14,0. Vrednosti smo umerili z dodajanjem določenega volumna 0,1 M HCl ali 0,1 M NaOH. V območju med 2,0 in 3,0 ter 11,0 in 12,5 smo pH vrednosti testirali v korakih po 0,1, v pH območju od 3,0 do 11,0 pa smo testirali cele enote. Pri pH vrednostih nad 12,5 gojišč nismo avtoklavirali. V gojišča v mikrotitrskih ploščah smo dodali 10 μ L inokuluma izbranih sevov *E. dermatitidis* ali *E. phaeomuriformis*. Inokulume sevov smo pripravili z resuspendiranjem zanke celic v 1 mL fiziološke raztopine. Mikrotitrške plošče s sevi *E. dermatitidis* smo inkubirali pri 37 °C, mikrotitrške plošče s sevi *E. phaeomuriformis* pa pri 30 °C. Rezultate smo v obeh primerih odčitali po 7 in 14 dneh.

Testiranje rasti pri različnih temperaturnih vrednostih:

Temperaturne teste smo izvedli z uporabo trdnih gojišč MEA, na katere smo nanegli inokulum v obliki kapljic volumna 10 μ L. Suspenzijo celic smo pripravili enako kot v

primeru testiranja pH. Testirali smo izbrane seve *E. dermatitidis* in *E. phaeomuriformis*. Inokulirane plošče smo inkubirali pri različnih temperaturah: 5, 10, 25, 30, 37, 40, 45, 47, 50 in 52 °C. Inkubacija je potekala 2 tedna, rast pa smo preverjali na 7 dni.

Testiranje halotolerance:

Rast sevov gliv pri različnih volumskih deležih natrijevega klorida v gojišču smo preverjali na trdnih gojiščih MEA, ki so vsebovala natrijev klorid (NaCl) različnih koncentracij: 5, 10 in 17 % m/V. Testirali smo izbrane seve *E. dermatitidis* in *E. phaeomuriformis*. Na gojišča smo nanegli inokulume v obliki kapljic, volumna 10 µL. Suspenzijo celic smo pripravili enako kot v primeru testiranja rasti pri različnih pH vrednostih in temperaturah. Inokulirana gojišča smo inkubirali pri 37 °C, 2 tedna. Rast smo preverjali enkrat tedensko.

3.2.5 Parjenje in fingerprint M13

Za parjenje smo uporabili trdna SNA gojišča, na katera smo nanegli 100 µL inokuluma sevov *E. dermatitidis*, za katere smo predhodno ugotovili, da pripadajo različnim genotipom: A (EXF-5718), B (EXF-5653) in C (EXF-5586). Naredili smo suspenzije zanke celic genotipov A x B, A x C in B x C v 1 mL fiziološke raztopine. Kot negativno kontrolo smo uporabili trdna SNA gojišča, na katera smo nanegli po 100 µL inokuluma posameznega genotipa. Inokulirana SNA gojišča smo inkubirali 1 mesec pri 37 °C. Po inkubaciji smo seve na ploščah MEA z dodanim kloramfenikolom cepili do posameznih kolonij. Inkubirali smo jih 7 dni pri 37 °C, nato pa 14 dni pri 5 °C. Po 5 kolonij vsake negativne kontrole in po 10 kolonij, izoliranih iz vsake mešanice genotipov, smo precepili na MEA gojišča. Po 6 dnevni inkubaciji pri 37 °C smo z uporabo reagenta PrepMan Ultra (Applied Biosystems) izolirali DNA in izvedli postopek DNA prstnega odtisa z uporabo M13 mikrosatelitnega oligonukleotidnega začetnika. Volumen mešanice za en vzorec je bil 24 µL, mešanica pa je vsebovala: 14,55 µL bidestilirane vode, 0,25 µL 25 mM MgCl₂, 2,5 µL 10 X polimeraznega pufra, 2,5 µL 10mM dNTP (GeneAmp, Warrington, ZDA), 4 µL 5 pmol/µl M13 in 0,2 µL 5 U/µl polimeraze Dream Taq (Fermentas, Kanada). 24 µL mešanice smo odpipetirali v 0,5 mL mikrocentrifugirke in dodali 1 µL DNA vzorca. Pri negativni kontroli smo namesto DNA dodali vodo. Za DNA prstni odtis smo uporabili program prikazan v Preglednici 7.

Preglednica 7: Program za DNA prstni odtis z oligonukleotidnim začetnikom M13

Postopek	Fingerprint z M13
Začetna denaturacija	94 °C, 5 min
Št. ciklov	40 :
	94 °C, 1 min
	50 °C, 1 min
	72 °C, 2 min
Končna elongacija	72 °C, 6 min

Pomnožene DNA fragmente smo ločili z elektroforezo na 1 % agaroznem gelu, v 0,5 X TAE pufu. Gelu smo dodali DNA barvilo SYBR Safe. DNA prstne odtise oz. velikost posameznih fragmentov smo določili z uporabo programskega paketa Gene Tools (Syngene).

3.2.6 Priprava preparatov za vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM)

Kot vzorce za vrstično elektronsko mikroskopijo smo uporabili 0,25 cm² velike koščke gumijastih tesnil 6 let starega, pogosto uporabljanega pomivalnega stroja. Pripravili smo tudi sterilne vzorce gume (rezervni del), ki smo jih namerno inokulirali s sevi posameznih genotipov: A, B in C vrste *E. dermatitidis*. Negativno kontrolo je predstavljala sterilna guma.

Inokulacija gume pomivalnega stroja:

Štiri kose neuporabljane gume smo položili v 100 mL serumske steklenice, jih avtoklavirali in jim sterilno dodali 50 mL tekočega SNA gojišča. V tri serumske steklenice smo nato dodali 20 µL inokuluma posameznega genotipa A (EXF-5718), B (EXF-5653) ali C (EXF-5586) vrste *E. dermatitidis*. V četrto serumsko steklenico inokuluma nismo dodali (negativna kontrola). Tako pripravljene vzorce smo inkubirali pri temperaturi 37 °C, 1 mesec.

Priprava preparatov za SEM:

Vzorci gume, inokulirane z genotipi A, B ali C vrste *E. dermatitidis*, negativne kontrole in vzorce gume iz uporabljane pomivalnega stroja smo sterilno razrezali v kose velikosti 0,25 cm². Kose smo položili v serumske stekleničke, dodali 2 mL fiksativa in inkubirali 24 ur pri 23 °C. Po 24 urah smo odstranili fiksativ in vzorce 3 krat po 30 minut spirali v 2 mL 0,1 M natrijevega fosfatnega pufr. Vzorce smo postfiksirali z 1 % osmijem (OsO₄) v destilirani vodi, 22 ur pri 4 °C. Nato smo izvedli dehidracijo v destilirani vodi in naraščajoči alkoholni vrsti:

- dH₂O, 3 x 15 minut,
- 30 % EtOH, 2 x 15 minut,
- 50 % EtOH, 2 x 15 minut,
- 70 % EtOH, 2 x 15 minut,
- 80 % EtOH, 2 x 15 minut,
- 90 % EtOH, 2 x 15 minut,
- 100 % EtOH, 2 x 15 minut
- 100 % EtOH in aceton v razmerju 1:1, 2 x 15 minut,
- Aceton, 2 x 15 minut.

Aceton smo nadomestili z 2 mL raztopine aceton : HMDS (razmerje 1:1). Sledilo je sušenje, in sicer 2 x 30 minut. Posušene vzorce smo inkubirali 15 minut v HMDS. HMDS smo zamenjali s svežim in inkubirali še 24 ur. Po inkubaciji smo odstranili ves HMDS in vzorce posušili na zraku. Z uporabo ogljikovih diskov smo jih pritrdili na aluminijeve nosilce. Naprašili smo jih z mešanico platine in zlata v debelini 5 ali 7 nm. Naprašene vzorce smo mikroskopirali z uporabo vrstičnega elektronskega mikroskopa Jeol JSM - 6500F na Inštitutu za kovinske materiale in tehnologije v Ljubljani.

4 REZULTATI

4.1 IZOLIRANI IN IDENTIFICIRANI SEVI IZ POMIVALNIH IN PRALNIH STROJEV

4.1.1 Izolirane in identificirane glive iz pomivalnih strojev

Vzorčili smo 189 pomivalnih strojev na 101 lokaciji po vsem svetu, od tega 102 pomivalna stroja v Sloveniji, 42 iz drugih držav Evrope, 13 iz Severne in 3 iz Južne Amerike, 5 iz Izraela, 10 iz Južnoafriške Republike, 7 iz vzhodne Azije in 7 iz Avstralije. Pri večini strojev smo vzorčili gumijasto tesnilo na vratih pomivalnih strojev, iz katerih smo osamili 158 sevov gliv, 152 od teh smo izolirali pri temperaturi 37 °C, 6 pa pri temperaturi 25 °C. Sevi pripadajo naslednjim rodovom: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Cladosporium*, *Exophiala*, *Fusarium*, *Magnusiomyces*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phaeosphaeria*, *Pichia*, *Prototheca*, *Rhodotorula* in *Sporopachydermia* ter 23 različnim vrstam (Preglednica 8).

Preglednica 8: Seznam izoliranih in identificiranih sevov iz pomivalnih strojev – tesnilna guma

Identifikacija	Št. sevov	Država; EXF številka seva ter GenBank NCBI (JF) številka nukleotidnega zaporedja
<i>Acremonium strictum</i>	1	CAN; EXF-6129 (JF766680)
<i>Aspergillus niger</i>	1	CAN; EXF-6083 (JF766673)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	3	SLO; EXF-5628 (JF766676), EXF-5629, 5590
<i>Candida inconspicua</i>	1	SLO; EXF-5648 (JF766626)
<i>Candida parapsilosis</i>	16	AUT; EXF-6088 (JF766621), BEL; EXF-5728; (JF766622), ZAF; EXF-6120, 6112 (JF766625), CAN; EXF-6126 (JF766623), DE; EXF-5717 (JF766624), SLO; EXF-5540 (JF766620), EXF-5545, 5547, 5639, 5659, 6078, 5722, 5723, 5726, 6102)
<i>Cladosporium cladosporioides</i> *	1	SLO; EXF-6076
<i>Cladosporium</i> sp.*	2	SLO; EXF-5627, 5634
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> *	3	SLO; EXF-5630, 5635, 5638

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Preglednica 8: Seznam izoliranih in identificiranih sevov iz pomivalnih strojev – tesnilna guma

Identifikacija	Št. sevov	Država; EXF številka seva ter GenBank NCBI (JF) številka nukleotidnega zaporedja
<i>Exophiala dermatitidis</i> , genotip A	58	AUS ; EXF-6099, 6100 (JF766648), EXF-5764, 6101, 6103, 5759, AUT ; EXF-5767 (JF766649), BEL ; EXF-5727 (JF766650), BRA ; EXF-6276 (JF766651), ISR ; EXF-5827 (JF766653), JPN ; EXF-5772, 5774, 5773, 5769 (JF766654), ZAF ; EXF-6109, 6113, 6119, 6110 (JF766655), EXF-6118 (JF766656), DE ; EXF-5718, 5719, 5720, 5716 (JF766652), SLO ; EXF-5588, 5589, 5574, 5576, 5577, 5568, 5579, 5581, 5582, 5583, 5584, 5585, 5587, 5651, 5724, 5762, 6091, 6097, 6104, 6107, 6123, 6124, 5573 (JF766640), EXF-5578 (JF766641), EXF-5580 (JF766639), EXF-5711 (JF766637), EXF-5649 (JF766644), EXF-5713 (JF766642), EXF-5721 (JF766645), EXF-5763 (JF766638), EXF-6096 (JF766646), EXF-5771 (JF766647), EXF-6106 (JF766643), USA ; EXF-5657, 5652 (JF766657), EXF-5656 (JF766658)
<i>Exophiala dermatitidis</i> , genotip A2	5	AUS ; EXF-5758 (JF766661), AUT ; EXF-5766 (JF766662), ITA ; EXF-5770 (JF766663), SLO ; EXF-5761 (JF766659), EXF-5768 (JF766660)
<i>Exophiala dermatitidis</i> , genotip A3	3	SLO ; EXF-5647 (JF766664), USA ; EXF-5655, 5654 (JF766665)
<i>Exophiala dermatitidis</i> , genotip B	11	BRA ; EXF-6275 (JF766670), ZAF ; EXF-6115, 6116, 6117, 6114 (JF766669), SLO ; EXF-5646, 5765, 5645 (JF766667), EXF-5760 (JF766668), USA ; EXF-5712, 5653 (JF766666)
<i>Exophiala dermatitidis</i> , genotip C	2	SLO ; EXF-5567 (JF766671), EXF-5586 (JF766672)

Se nadaljuje

Nadaljevanje

Preglednica 8: Seznam izoliranih in identificiranih sevov iz pomivalnih strojev – tesnilna guma

Identifikacija	Št. sevov	Država; EXF številka seva ter GenBank NCBI (JF) številka nukleotidnega zaporedja
<i>Exophiala phaeomuriformis</i> , genotip 1	14	CAN; EXF-6128, DE; EXF-5826 (JF766618), SLO; (EXF-5571, 5572, 5568, 5575, 5642, 5824, 5570 (JF766611), EXF-5640 (JF766615), EXF-5644 (JF766612), EXF-6108 (JF766614), EXF-6121 (JF766616), EXF-6122 (JF766617)
<i>Exophiala phaeomuriformis</i> , genotip 2	2	DDK; EXF-5825, 5715 (JF766619)
<i>Fusarium dimerum</i>	4	DDK; EXF-6079 (JF766678), SLO; EXF-5671, 5636 (JF766677), USA; EXF-5658 (JF766679)
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	SLO; EXF-5637
<i>Magnusiomyces capitatus</i>	11	AUT; EXF-6087 (JF766682), ISR; EXF-6084 (JF766681), SLO; EXF-5631, 5632, 5641, 5643, 6080, 6090, 6093, 6105, 5633 (JF766627 (LSU), JF766683 (ITS))
<i>Paecilomyces variotii</i>	1	CAN; EXF-6125 (JF766675)
<i>Penicillium</i> sp.	1	HRV; EXF-6098 (JF766674)
<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	1	ISR; EXF-6085
<i>Pichia guilliermondii</i>	8	ISR; EXF-6086, ZAF; EXF-6111 (JF766630), CAN; EXF-6127 (JF766631), SLO; EXF-5542, 5714, 5725, 6095, GBR; EXF-6089 (JF766629)
<i>Pichia</i> sp.	1	SLO; EXF-5650 (JF766632)
<i>Prototheca wickerhamii</i>	1	SLO; EXF-5544 (JF766633)
<i>Rhodotorula calyptogenae</i>	1	FRA; EXF-6094 (JF766634)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	4	SLO; EXF-5546, 5548, 5549, 5543 (JF766635)
<i>Sporopachydermia cereana</i>	1	BEL; EXF-5729 (JF766636)

Legenda: * sevi, izolirani pri 25 °C.

Notranjost pomivalnih strojev smo vzorčili le sporadično, od tam smo izolirali 5 sevov gliv, od tega 2 pri temperaturi 37 °C (*Exophiala*, *Pichia*) in 3 pri temperaturi 25 °C (rod *Cladosporium*) (Preglednica 9).

Preglednica 9: Seznam izoliranih in identificiranih sevov iz pomivalnih strojev - notranjost

Identifikacija	Št. sevov	Država; EXF številka seva ter GenBank NCBI (JF) številka nukleotidnega zaporedja
<i>Cladosporium bruhnei</i> *	1	SLO; EXF-5626
<i>Cladosporium cladosporioides</i> *	2	SLO; EXF-5625
<i>Exophiala phaeomuriformis</i> , genotip 1	1	SLO; EXF-5569 (JF766613)
<i>Pichia guilliermondii</i>	1	SLO; EXF-5541 (JF766628)

Legenda: * sevi, izolirani pri 25 °C.

4.1.2 Izolirani in identificirani sevi iz pralnih strojev

Vzorčili smo 42 pralnih strojev, od tega 39 v Sloveniji, 1 na Japonskem, 1 na Danskem in 1 v Belgiji. Vzorce smo odvzeli iz predalčkov za pralni prašek ali mehčalec in iz tesnilne gume na vratih stroja. Skupno smo osamili 38 sevov gliv, od tega večino (17) iz predalčkov za pralni prašek (Preglednica 11), 13 sevov iz gumijastega tesnila (Preglednica 12), 8 sevov pa smo izolirali iz predalčkov za mehčalec (Preglednica 10). Vse seve smo izolirali pri temperaturi 25 °C. Sevi pripadajo 23 različnim vrstam in 13 različnim rodovom. V predalih za pralni prašek in mehčalec so prevladovali glive rodu *Fusarium*, posamično pa smo osamili tudi predstavnike rodov *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Exophiala*, *Gibberella*, *Mucor*, *Ochroconis*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis* in *Phoma*. Na gumi pralnih strojev prevladujejo glive rodu *Cladosporium*, izolirali pa smo tudi posamične rdeče (rod *Rhodotorula*) in bele (rod *Candida*) kvasovke.

Preglednica 10: Seznam izoliranih in identificiranih sevov iz pralnih strojev – predal za mehčalec

Identifikacija	Št. sevov	Država in EXF številka seva
<i>Cladosporium bruhnei</i>	1	SLO; EXF-5563
<i>Cladosporium halotolerans</i>	1	SLO; EXF-5564
<i>Exophiala equina</i>	1	SLO; EXF-5566
<i>Fusarium oxysporum</i>	3	SLO; EXF-5552, 5560, 5561
<i>Mucor racemosus</i>	1	SLO; EXF-5556
<i>Penicillium brevicompactum</i>	1	SLO; EXF-5558

Preglednica 11: Seznam izoliranih in identificiranih sevov iz pralnih strojev – predal za pralni prašek

Identifikacija	Št. sevov	Država in EXF številka seva
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	SLO; EXF-6298
<i>Cladosporium sp.</i>	1	SLO; EXF-5663
<i>Exophiala mesophila</i>	1	SLO; EXF-6138
<i>Exophiala pisciphila</i>	1	SLO; EXF-6140
<i>Fusarium oxysporum</i>	4	SLO; EXF-5661, 5662, 5562, 5559
<i>Fusarium solani</i>	2	SLO; EXF-5554, 5665
<i>Fusarium sp.</i>	1	SLO; EXF-6139
<i>Gibberella moniliformis</i>	1	SLO; EXF-5664
<i>Mucor circinelloides</i>	1	SLO; EXF-6296
<i>Ochroconis constricta</i>	1	SLO; EXF-5565
<i>Pestalotiopsis disseminata</i>	1	SLO; EXF-5553
<i>Phoma radicina</i>	1	SLO; EXF-6297
<i>Phoma sp.</i>	1	SLO; EXF-5551

Preglednica 12: Seznam izoliranih in identificiranih sevov iz pralnih strojev – tesnilna guma

Identifikacija	Št. sevov	Država in EXF številka seva
<i>Candida parapsilosis</i>	3	DDK; EXF-5730, 5731, SLO; EXF-5667
<i>Cladosporium bruhnei</i>	4	SLO; EXF-5660, 6141, 6142, 6143
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3	SLO; EXF-6294, 6295, 5669
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	2	SLO; EXF-5666, 5668
<i>Rhodotorula slooffiae</i>	1	SLO; EXF-5557

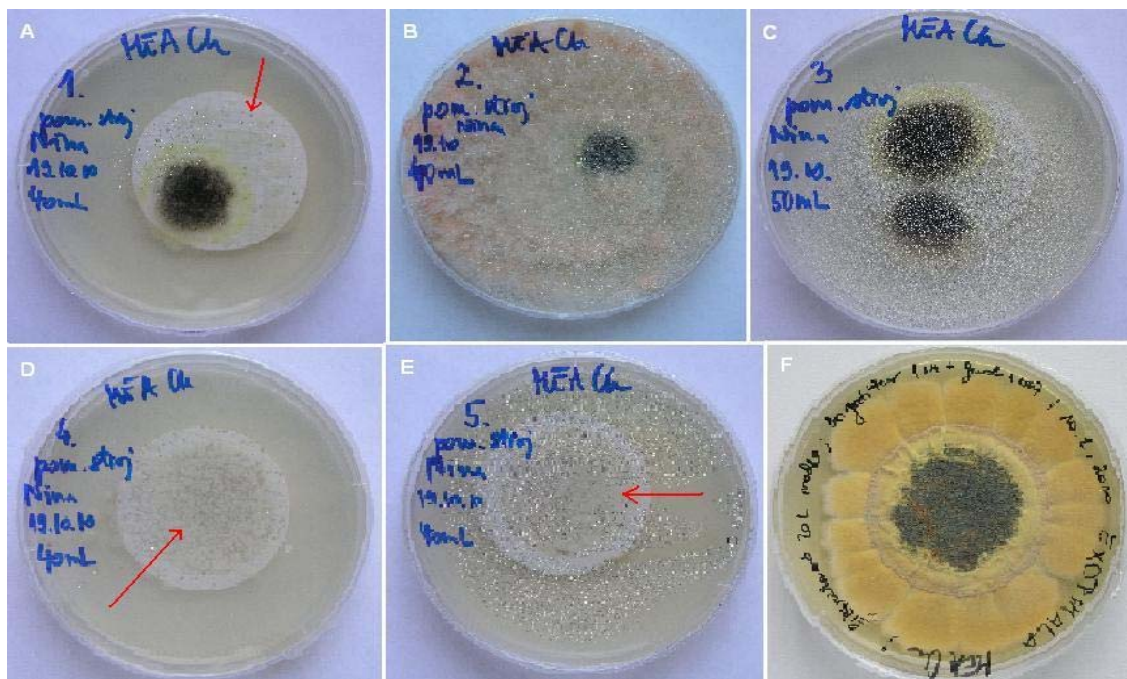
4.2 REZULTATI FILTRACIJE VODE

Filtrirali smo različne volumne (od 40 mL do 50 L) vode, zbrane iz različnih lokacij po Sloveniji in po svetu. Izbrali smo vodne vire s stoječo (jezera), tekočo (reke, izvir) in klorirano vodo (bazen, vodovodna voda). Kakovost oz. čistost vodnih vzorcev se je razlikovala. Vse vzorce smo inkubirali pri temperaturi 37 °C in po 1 tednu inkubacije so filtre prerastle različne glive rodov *Penicillium* in *Aspergillus* ter teleomorfi slednjega rodu (*Neurospora*, *Eurotium*). Štiri seve smo identificirali z molekularnogenetskimi metodami, 13 sevov pa smo na podlagi morfologije kolonij identificirali do rodu in jih nismo izolirali v čistih kulturah.

Preglednica 13: Filtracija vode in izolacija gliv iz različnih vodnih virov

	Izvor vode	Volumen	Izoliran rod in EXF številka
Reka	Drava	0,5 L	<i>Neurospora tetrasperma</i> ; EXF-6135
	Mura	0,5 L	<i>Penicillium</i> sp., <i>Neurospora</i> sp.
	Ščavnica	0,3 L	<i>Penicillium</i> sp., <i>Neurospora</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp.
Izvir	Makedonija	0,5 L	<i>Penicillium</i> sp.
	Yudanaka (Japonska)	Bris korita	<i>Ochroconis gallopava</i> ; EXF-6130, 6131
Jezero	Fuku (Japonska)	200 mL	<i>Penicillium</i> sp.
Bazen	Šmarješke toplice	0,5 L	<i>Trichoderma citrinoviride</i> ; EXF-6299
Vodovodna voda	Laboratorij (Ljubljana)	2, 20, 30, 50 L	<i>Penicillium</i> sp., <i>Eurotium</i> sp.
Pomivalni stroj	Ljubljana	5 x 40 mL	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Exophiala</i> sp., bele kvasovke, <i>Neurospora</i> sp.

Najpogosteje smo opazili rast gliv rodu *Penicillium* in *Neurospora*, ki se pojavljata tako v neklorirani kot tudi v klorirani vodi. Le v primeru filtracije vode, odvzete med cikli pranja pomivalnega stroja, smo opazili rast belih kvasovk in črnih kvasovk rodu *Exophiala* (Slika 1).



Slika 1: Filter papirji z glivnimi kolonijami po filtraciji vode iz pomivalnega stroja (A-E) in vodovoda (F)

Legenda: A–E: fotografije gojišč s filtratom iz pomivalnega stroja, odvzetim med cikli pranja. Z rdečimi puščicami so označene črne kvasovke (*Exophiala* sp.). F: plošča s filtratom iz vodovodne pipe v glivnem laboratoriju. Opazna rast vrste rodu *Eurotium* sp.

4.3 FIZIOLOGIJA SEVOV VRST *EXOPHIALA DERMATITIDIS* IN *EXOPHIALA PHAEOMURIFORMIS*

Teste rasti pri različnih pH, temperaturah in koncentracijah NaCl smo izvedli na naslednjih sevih: *E. dermatitidis*, genotip A (N=16): EXF-5573, EXF-5656, EXF-5767, EXF-5711, EXF-5718, EXF-5588, EXF-5576, EXF-5585, EXF-5649, EXF-5657, EXF-5713, EXF-5721, EXF-5724, EXF-5727, EXF-5827, EXF-5772, EXF-6110, *E. dermatitidis*, genotip A2 (N=5): EXF-5766, EXF-5761, EXF-5770, EXF-5768, EXF-5758. *E. dermatitidis*, genotip A3 (N=3): EXF-5647, EXF-5654, EXF-5655. *E. dermatitidis*, genotip B (N=9): EXF-5760, EXF-6114, EXF-6115, EXF-6116, EXF-5653, EXF-5645, EXF-5646, EXF-

5765, EXF-5712. *E. dermatitidis*, genotip C (N=2): EXF-5586, EXF-5567. *E. phaeomuriformis*, genotip 1 (N=10): EXF-5571, EXF-5644, EXF-6121, EXF-5575, EXF-5826, EXF-5569, EXF-5640, EXF-5642, EXF-6108, EXF-5570. *E. phaeomuriformis*, genotip 2 (N=2): EXF-5715, EXF-5825.

4.3.1 Rast in morfologija pri različnih pH vrednostih

Rast sevov rodu *Exophiala* smo spremljali v mikrotitrskih ploščicah, inkubiranih pri 37 °C, 2 tedna. Rast smo ocenjevali s prostim očesom (opazen micelij) in s svetlobnim mikroskopom. Ugotovili smo, da je pri vrsti *E. dermatitidis* le genotip C izkazoval aktivno rast pri pH 2,5. Vsi genotipi, z nekaterimi razlikami znotraj skupin, so sposobni rasti pri pH 12,5. Rastni spekter *E. phaeomuriformis* je bil še obsežnejši. Opazili smo rast vseh izolatov od pH 2,5 do 12,5 (Preglednica 14).

Preglednica 14: Rast pri različnih pH vrednostih

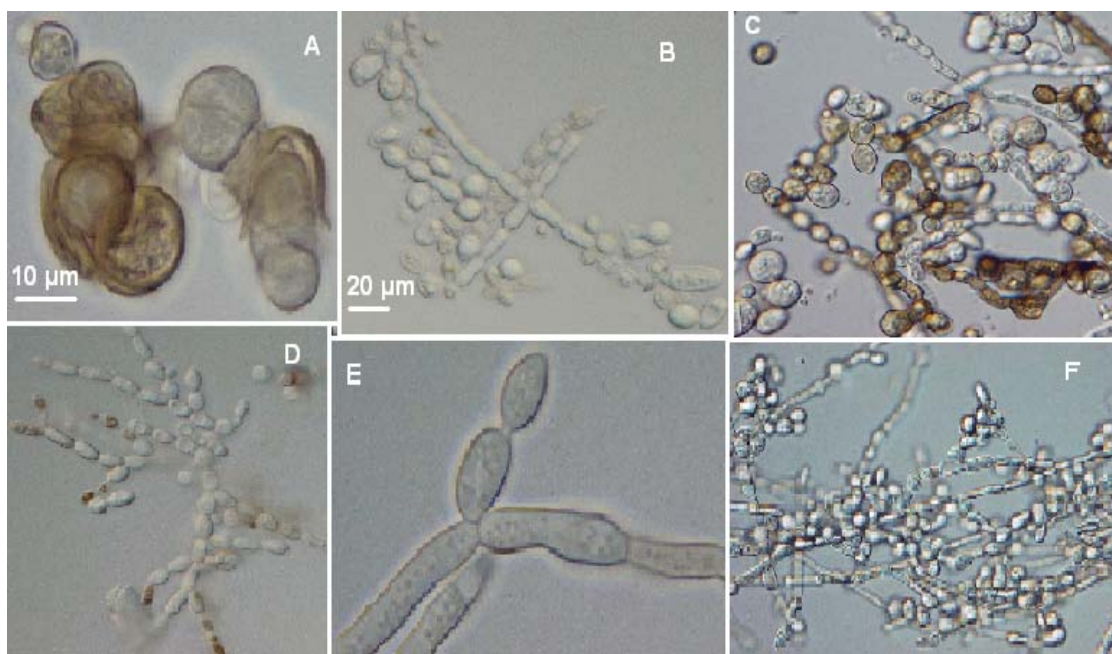
<i>Exophiala dermatitidis</i>	Rast pri različnih pH vrednostih			
	2,5	4	10	12,5
genotip A	- / +	+	+	+
genotip A2	-	+	+	+ / -
genotip A3	- / +	+	+	+
genotip B	+ / -	+	+	+ / -
genotip C	+	+	+	+
<i>Exophiala phaeomuriformis</i>				
genotip 1	+	+	+	+
genotip 2	+	+	+	+

Legenda: + rast; - ni rasti; + / - : 50 % ali več testiranih sevov je pozitivnih; - / + : 50 % ali več testiranih sevov je negativnih.

S svetlobnim mikroskopom smo opazovali morfologijo in živost sevov. Rast smo potrdili glede na opazno tvorbo brstov, hif ali muriformnih celic.

Morfologija vrste *Exophiala dermatitidis* pri različnih pH vrednostih:

Pri nižjih pH-jih smo opazili tvorbo muriformnih, melaniziranih celic, od pH 4 do pH 12,5 pa je bilo mogoče opaziti pojav konidijev v obliki verižic.

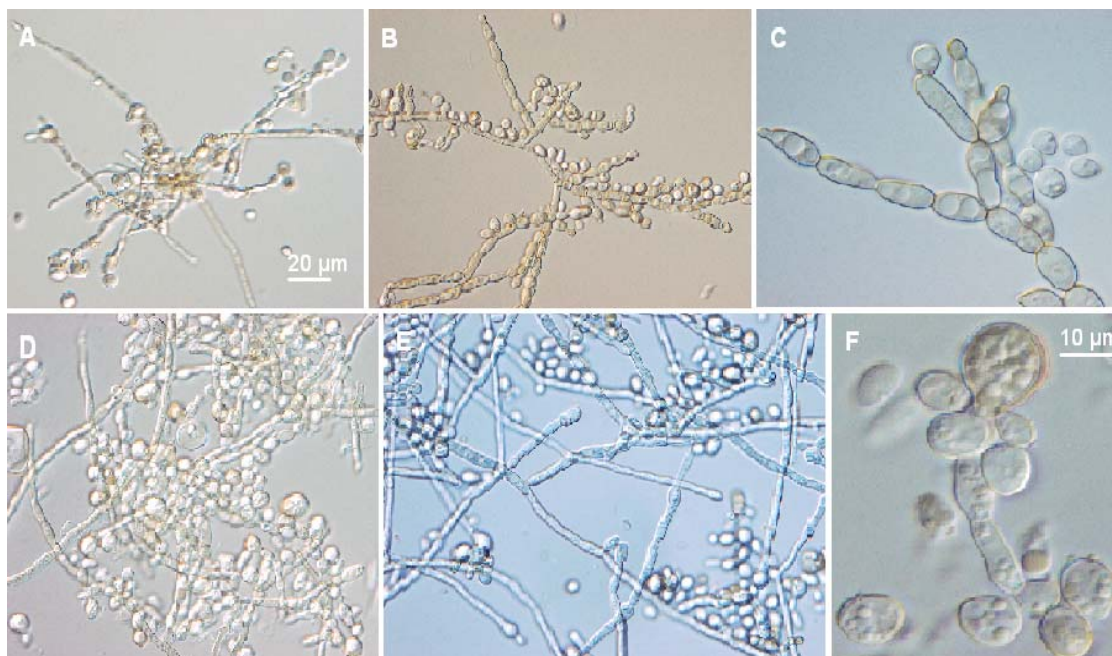


Slika 2: Morfologija vrste *Exophiala dermatitidis* pri različnih pH vrednostih v tekočih gojiščih

Legenda: **A:** pH 2,6: muriformne celice; **B:** pH 4,0: verižice konidijev; **C:** pH 5,0: verižice konidijev; **D:** pH 7,0: konidiji v verižicah; **E:** pH 11,6: brsteča hifa; **F:** pH 12,0: verižice konidijev. Merska enota pri sliki E je enaka kot na sliki A (10 µm). Merska enota na slikah C, D in F je enaka kot pri sliki B (20 µm).

Morfologija vrste *Exophiala phaeomuriformis* pri različnih pH vrednostih:

Rast sevov vrste *E. phaeomuriformis* je bila zelo podobna pri vseh testiranih pH vrednostih gojišč, saj smo povsod opazili septiran micelij z lateralnimi in terminalnimi brstečimi celicami (Slika 3).



Slika 3: Morfologija vrste *Exophiala phaeomuriformis* pri različnih pH vrednostih

Legenda: Posnetki s svetlobnim mikroskopom. **A:** posamezni konidiji na miceliju v gojišču pri pH 2,2; verižice konidijev pri **B:** pH 4,0; **C:** pri pH 5,0; **D:** pri pH 7,0; **E:** pri pH 11,0; **F:** posamezne brsteče celice pri pH 12,0. Merilo na sliki A velja tudi za slike B, D in E (20 µm); merilo na sliki F velja tudi za sliko C (10 µm).

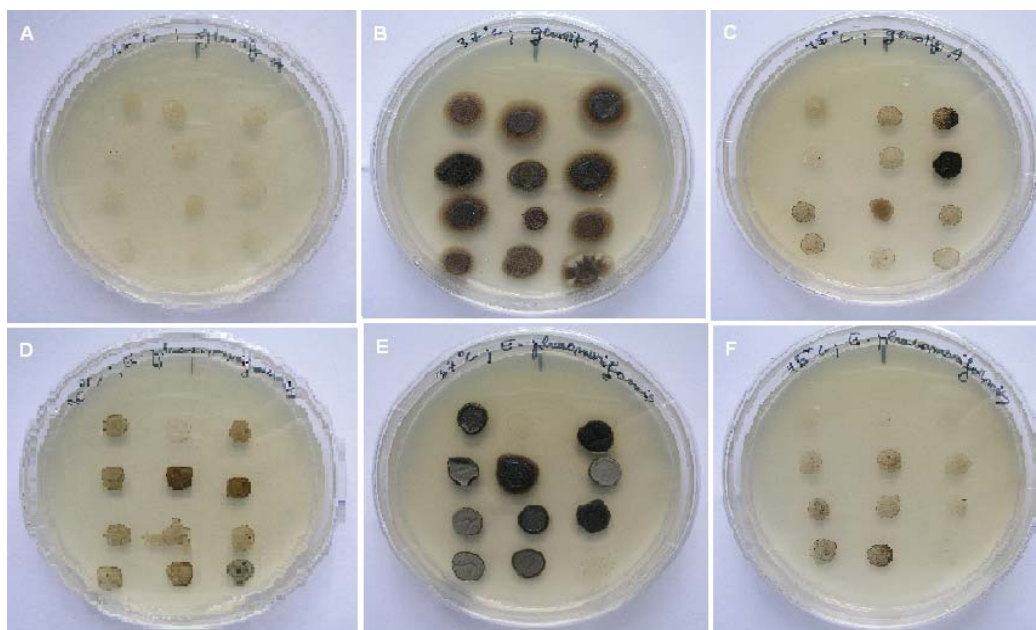
4.3.2 Rast pri različnih temperaturah

Rast pri različnih temperaturah smo testirali na MEA gojiščih, pri 37 °C, 2 tedna. Rast smo ocenjevali s prostim očesom, na podlagi spremembe v intenziteti inokuluma (slika 4). Večina sevov obeh vrst rodu *Exophiala*, *E. dermatitidis* in *E. phaeomuriformis*, je dobro rastla pri temperaturah od 10 °C do 45 °C, nekateri sevi, predvsem genotipa A in C *E. dermatitidis* pa tudi pri 47 °C (Preglednica 15). Pri 50 °C nismo zabeležili rasti.

Preglednica 15: Rast vrst *Exophiala dermatitidis* in *Exophiala phaeomuriformis* pri različnih temperaturnih vrednostih

<i>Exophiala dermatitidis</i>	Rast pri različnih temperaturnih vrednostih [°C]			
	10	42	45	47
genotip A	+	+	+	+
genotip A2	+	+	+	- / +
genotip A3	+	+	+	-
genotip B	+	+	+	+ / -
genotip C	+	+	+	+
<i>Exophiala phaeomuriformis</i>				
genotip 1	+	+	+ / -	+ / -
genotip 2	+	+	+ / -	+ / -

Legenda: + rast; - ni rasti; + / - : 50 % ali več testiranih sevov je pozitivnih; - / + : 50 % ali več testiranih sevov je negativnih.



Slika 4: Rast vrst *Exophiala dermatitidis* in *Exophiala phaeomuriformis* pri različnih temperaturnih vrednostih

Legenda: Inokulirane plošče, inkubirane pri različnih temperaturah. **A - C:** *E. dermatitidis*; **D - F:** *E. phaeomuriformis*; **A, D:** T = 10 °C; **B, E:** T = 37 °C; **C, F:** T = 45 °C.

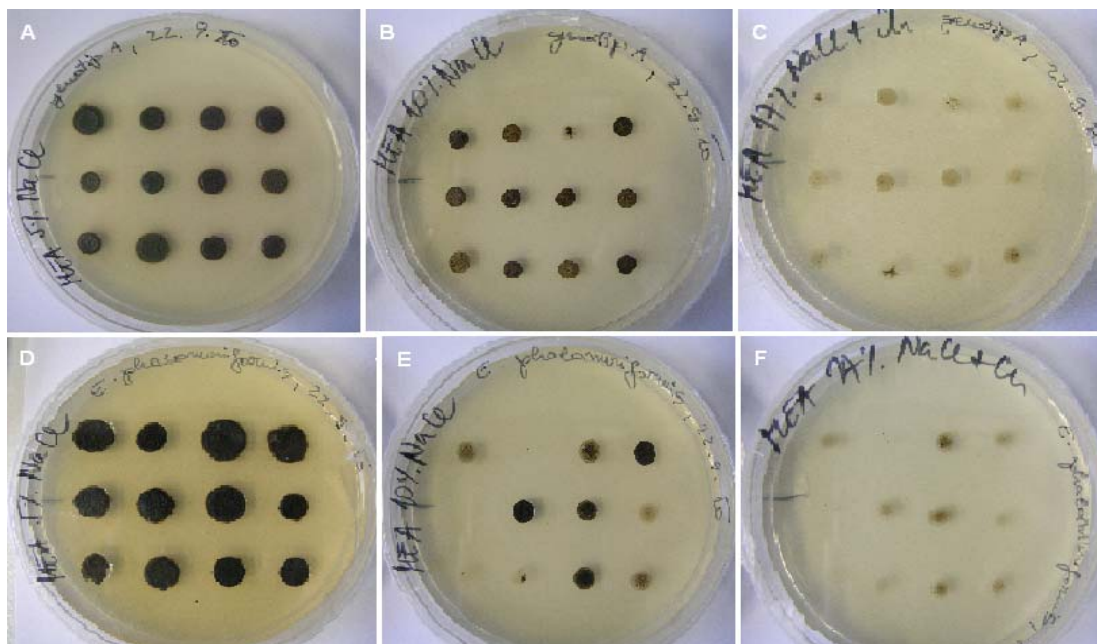
4.3.3 Rast pri različnih koncentracijah NaCl

Halotoleranco sevov smo testirali na MEA gojiščih z dodatkom različnih koncentracij soli, pri 37 °C, 2 tedna. Rast smo ocenjevali s prostim očesom, na podlagi spremembe v intenziteti inokuluma (Slika 5). Opazili smo, da vsi sevi *E. dermatitidis* in *E. phaeomuriformis* dobro rastejo na 5 in 10 % NaCl, večina pa tudi na 17 % NaCl, z izjemo sevov posameznih genotipov A3 *E. dermatitidis* ter genotipa 1 *E. phaeomuriformis* (Preglednica 16).

Preglednica 16: Rast vrst *Exophiala dermatitidis* in *Exophiala phaeomuriformis* pri različnih koncentracijah NaCl

<i>Exophiala dermatitidis</i>	Rast pri različnih koncentracijah NaCl [%]		
	5	10	17
genotip A	+++	++	+
genotip A2	+++	++	+
genotip A3	+++	+	+ (-)
genotip B	+++	++	+
genotip C	+++	++	+
<i>Exophiala phaeomuriformis</i>			
genotip 1	+++	++	+ (-)
genotip 2	+++	++	+

Legenda: +++: zelo dobra rast; ++: dobra rast, +: šibka rast, +(-): zelo šibka rast.



Slika 5: Rast vrst *Exophiala dermatitidis* in *Exophiala phaeomuriformis* pri različnih koncentracijah NaCl

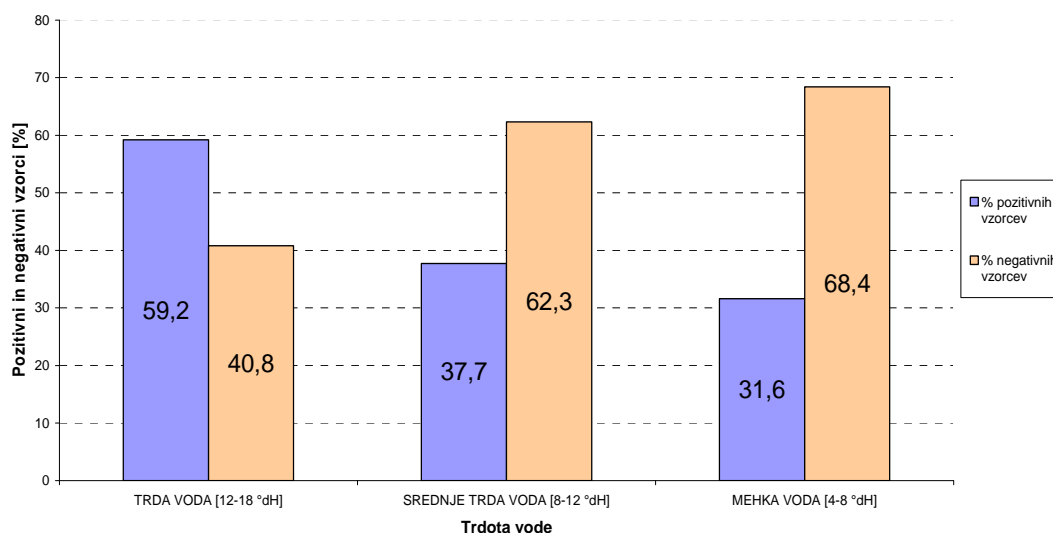
Legenda: Inokulirane plošče z različnimi koncentracijami NaCl. A - C: *E. dermatitidis*; D - F: *E. phaeomuriformis*; A, D: c [NaCl] = 5 %; B, E: c [NaCl] = 10 %; C, F: c [NaCl] = 17 %.

4.3.4 Vpliv trdote vode na pojav vrst *E. dermatitidis* in *E. phaeomuriformis* v pomivalnih strojih

Vpliv trdote vode na pojav gliv rodu *Exophiala* smo preverjali le na vzorcih iz Slovenije. Opazili smo, da se vrsti pogosteje pojavljata na območjih s trdo (*E. dermatitidis*: n = 11; *E. phaeomuriformis*: n = 6) in srednje trdo (*E. dermatitidis*: n = 14; *E. phaeomuriformis*: n = 6) vodo (Preglednica 17; Slika 6). Na območjih z mehko vodo smo našli le vrsto *E. dermatitidis* (n = 6). Za trdoto vode smo uporabili nemško enoto °dH (1 °dH = 0,01 mg CaO / mL vode).

Preglednica 17: Število pozitivnih in negativnih vzorcev na območjih s trdo, srednje trdo in mehko vodo v Sloveniji

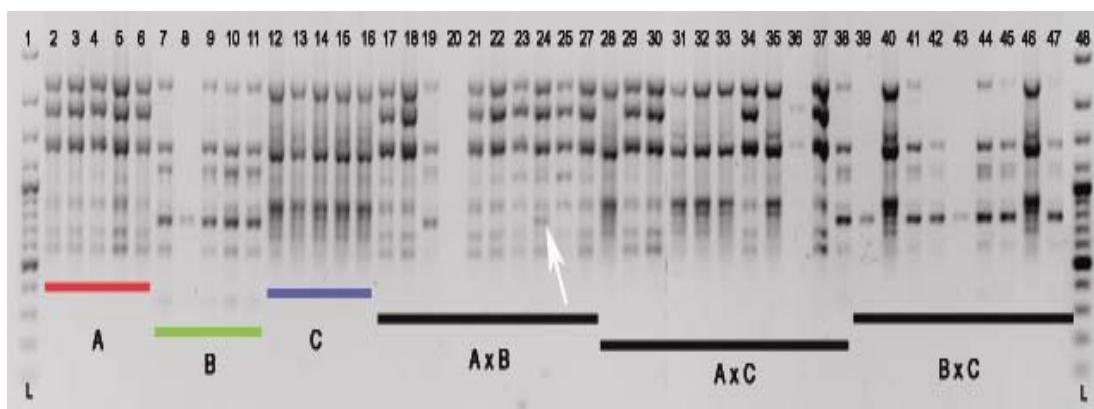
	Trda voda	Srednje trda voda	Mehka voda
Število pozitivnih vzorcev (<i>E. dermatitidis</i>)	16 (11)	20 (14)	6 (6)
(<i>E. phaeomuriformis</i>)	(5)	(6)	(0)
Število negativnih vzorcev	11	33	13
SKUPAJ	27	53	19



Slika 6: Grafični prikaz odstotkov pozitivnih in negativnih vzorcev glede na trdoto vode v Sloveniji

4.5 REZULTATI PARJENJA IN FINGERPRINTA M13

Pri DNA prstnem odtisu z M13 (Slika 7) smo pri sevih *E. dermatitidis* opazili 7 fragmentov (2290, 1830, 1400, 1120, 900, 700, 590 bp dolžine) pri genotipu **A**, 7 fragmentov nekoliko drugačnih velikosti (2300, 1380, 1180, 860, 760, 580 in 340 bp) pri genotipu **B** ter 8 fragmentov (2100, 1600, 1450, 1300, 1100, 850, 800, 660 bp) pri genotipu **C**. Rezultat parjenja je bil najpogosteje prstni odtis le enega genotipa. Le v enem primeru (parjenje genotipov **A** × **B**) smo opazili mešan profil: 7 fragmentov je bilo identičnih genotipu **A** (2290, 1830, 1400, 1120, 900, 700, 590 bp), medtem ko je 1 fragment (760 bp) pripadal genotipu **B** (Zalar in sod., 2011).

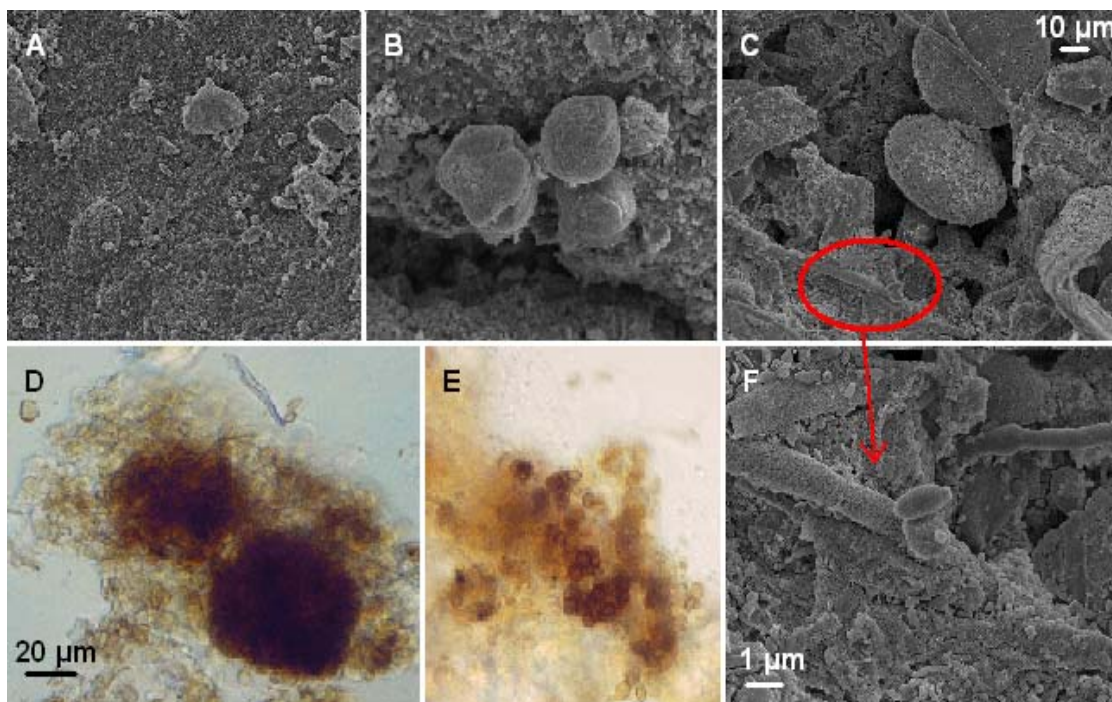


Slika 7: MSP-PCR fingerprinti (Zalar in sod., 2011)

Legenda: MSP-PCR prstni odtisi sevov *E. dermatitidis* genotipov **A**, **B** in **C**, pridobljeni z uporabo oligonukleotidnega začetnika M13. Z L je označen molekularni velikostni marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus, (stolpca 1, 48). Stolpci 2–6: genotip **A** (EXF-5718); stolpci 7–11: genotip **B** (EXF-5653); stolpci 12–16: genotip **C** (EXF-5586); stolpci 17–27: genotipa **A** × **B**; stolpci 28–38: genotipa **A** × **C**; stolpci 39–47: genotipa **B** × **C**. V 24. stolpcu je pri **A** × **B** z belo puščico označen dodaten fragment (Zalar in sod., 2011).

4.6 REZULTATI SEM

Pri SEM mikroskopiji smo opazovali površino gume približno 6 let starega pomivalnega stroja, neuporabljene gume, sterilno gumo pa smo tudi inokulirali z različnimi genotipi vrste *E. dermatitidis*. Pri vzorcih inokulirane gume smo opazili kolonizacijo gliv genotipa A na gumo, medtem ko se genotipa B in C na gumo nista pritrdila. Na vzorcu gume uporabljanega stroja smo našli biofilme, sestavljene iz alg, bakterij in gliv rodu *Exophiala* (Slika 8).



Slika 8: Površina gume pomivalnega stroja

Legenda: A-C, F: SEM posnetki; D, E: posnetki s svetlobnim mikroskopom. **A:** negativna kontrola - sterilna guma; **B:** guma, laboratorijsko inokulirana s kvasovkami rodu *Exophiala*; **C, F:** guma 6 let starega pomivalnega stroja, opazne bakterije in glive rodu *Exophiala*; **D, E:** guma 6 let starega pomivalnega stroja - *Exophiala* v biofilmu, celice obdane z EPS. Merska enota pri slikah A, B je enaka merski enoti na sliki F (1 μm). Merska enota na sliki E je enaka kot na sliki D (20 μm).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

O glivni flori znotraj gospodinjskih aparatov in ostalih umetno ustvarjenih okolij v gospodinjstvih ni veliko podatkov. Matos in Zalar s sodelavci (2002, 2007) so pojav nekaterih vrst oportunistično patogenih gliv v umetnih okoljih kopalnic in savn povežali z visokimi temperaturami, visoko zračno vlažnostjo ter dostopnostjo hranil. Iz naravnih vodnih okolij so Hageskal (2006), Göttlich (2002), Kärkkäinen (2009) in Pereira s sodelavci (2010) izolirali veliko različnih glivnih vrst. Med njimi so bile tudi vrste, znane kot oportunistični patogeni človeka. Okužbe z glivami rodu *Candida* so povežali z uporabo pomivalnih strojev (Bennett, 1998; Nedret Koc in sod., 2002).

S filtracijo vode iz različnih lokacij smo želeli ugotoviti, ali se v katerem od vodnih sistemov nahajajo glivni oportunistični patogeni, ki bi lahko v pomivalne in pralne stroje vstopali z vodo. Najpogosteje smo izolirali vrste rodov *Penicillium*, *Neurospora*, *Aspergillus*, *Trichoderma* in *Cladosporium*, kar se ujema z raziskavami vodnih habitatov predhodnikov. Kvasovk nismo opazili, razlog bi lahko bil v tem, da so filamentozne glive rastle hitreje kot kvasovke in so jih prerastle. Drug razlog bi lahko bil v količini prefiltrirane vode. Filtri so se pri filtraciji vodnih vzorcev iz narave zelo hitro zamašili tako, da smo lahko prefiltrirali zelo omejene količine vode. V primeru filtracije vode iz pomivalnega stroja smo pri vseh vzorcih opazili bele in črne kvasovke rodu *Exophiala*. Pri vzorcih, odvzetih na začetku pranja smo od filamentoznih gliv opazili le glive rodu *Aspergillus*. To bi lahko pripisali dvigu temperature in pH znotraj stroja, na kar so kvasovke in glive rodu *Aspergillus* prilagojene.

Pri pralnih strojih smo vzorčili predalčke za pralni prašek in mehčalec. Gre za okolje, v katerega pri vsakem pranju doteka voda iz vodovodnega sistema. Sem dodajamo detergente, ki vplivajo na pH in so bodisi toksični za mikroorganizme, lahko pa predstavljajo tudi vir hranil. V predalčkih za pralni prašek in mehčalec glavnino izolatov predstavljajo glive rodu *Fusarium*. Pogosto smo izolirali še glive rodu *Cladosporium*, *Mucor*, *Exophiala*. Odvzeli smo tudi brise tesnilne gume na vratih strojev. Tu je temperatura vode višja, okolje vsebuje dovolj hranil, vlage, pretok vode je slabši kot v

predalčkih za detergente. Tesnilo predstavlja tudi okolje za pritrnitev mikroorganizmom, ki izločajo polimerne sestavine (EPS). EPS imajo pomembno vlogo pri zaščiti mikrobov. Predstavljajo hidratirano osnovo, ki regulira prehod ionov iz sosednjega okolja, ščitijo pred mehanskimi poškodbami in zvišajo odpornost na temperaturo (Sterflinger 1998). Iz tesnila pralnega stroja smo izolirali večinoma kvasovke rodov *Rhodotorula*, *Candida* ter filamentozne vrste rodu *Cladosporium*. Razlike v sestavi združb v predalčkih in na tesnilu so najbrž posledica različnih temperatur in pretoka vode znotraj stroja. V predalčke za detergente doteka hladna voda iz vodovodnega sistema, pretok vode je višji. Tam najdemo vrste, ki rastejo pri temperaturah do 30 °C. Tesnilo je med pranju izpostavljeno višjim temperaturam in nižjemu pretoku vode, zato tam večinoma najdemo kvasne vrste, ki izločajo EPS. EPS omogoča pritrnitev na tesnilo in hkrati zaščito pred visokimi temperaturami. Iz pralnih strojev smo skupaj izolirali 23 vrst, pripadajočih 13 rodovom. Od tega 15 vrst iz 9 rodov, predhodno izoliranih tudi iz vode, spada med oportunistične patogene človeka, ki jih pogosto najdemo v kliničnem materialu imunsko oslabljenih ljudi. Tri vrste iz 3 rodov spadajo med redke oportunistične patogene človeka. O vrsti iz rodu *Pestalotiopsis* ni bilo poročano, da bi bila patogena za ljudi.

Vzorčeni pomivalni stroji so bili različno stari (od 6 mesecev do 20 let), z različno pogostostjo uporabe (enkrat na mesec do trikrat na dan), pri pranju pa so bili dodani različni detergentski. Nahajali so se na različnih geografskih lokacijah, kar je pomembno s stališča trdote vode. Pri vzorčenju pomivalnih strojev smo se osredotočili na tesnilno gumo. Na tem mestu so temperature sicer visoke, vendar ne dosegajo temperatur pranja. Pretok vode je manjši kot v notranjosti stroja, vlažnost pa dovolj visoka. Prisotni so bazični detergentski in visoka koncentracija soli. Zaradi hrapave površine se na tesnilu zaustavijo ostanki hrane in detergentov. Tudi guma sama je lahko vir hranil (Rose in Steinbuchel, 2005). Navedeni dejavniki lahko vplivajo na kolonizacijo mikroorganizmov in tvorbo biofilmov. Mešani biofilmi, ki nastanejo na tesnilu pomivalnih strojev, vsebujejo veliko EPS, ki mikrobe ščiti pred vplivi iz okolja. Iz tesnilne gume in notranjosti pomivalnih strojev smo izolirali 23 vrst, ki pripadajo 15 rodovom. Od tega 14 glivnih vrst iz 9 rodov, predhodno izoliranih tudi iz vode, spada med oportunistične patogene človeka, ki jih pogosto najdemo v kliničnem materialu imunsko oslabljenih ljudi. Šest vrst gliv iz 5 rodov ter alga *Prototheca wickerhamii* spadajo med redke oportunistične patogene človeka. Vrsta

iz rodu *Phaeosphaeria* ni patogena za ljudi. Najpogosteje izolirane vrste pripadajo rodovom *Aspergillus*, *Candida*, *Magnusiomyces*, *Exophiala*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Pichia* in *Rhodotorula*. S tesnil pomivalnih strojev smo najpogosteje izolirali rod črnih kvasovk *Exophiala* in sicer vrsti *E. dermatitidis* in *E. phaeomuriformis*. Iz 62 % vzorčenih pomivalnih strojev smo izolirali glive, od tega smo pri 55 % izolirali vrste rodu *Exophiala*. Čeprav smo na primarnih izolacijskih ploščah pogosto opazili kolonije črnih kvasovk z različno morfologijo, smo iz posameznega pomivalnega stroja v glavnem izolirali en sam genotip. Prevladujoč genotip *E. dermatitidis* je bil genotip A. Genotip A vrste *E. dermatitidis* je po podatkih iz literature bolj infektiven kot genotip B, sodeč po številu kliničnih izolatov in prevladujočem pojavu v prebavnem sistemu (povzeto po Gerrits van den Ende in sod., neobjavljeni podatki). V treh primerih smo znotraj enega pomivalnega stroja našli dva genotipa: A in C, A in A2 ter A in B. Sopoljav *E. dermatitidis* in *E. phaeomuriformis* smo zabeležili le v enem primeru. Pri vrsti *E. phaeomuriformis* smo v pomivalnih strojih zabeležili pojav dveh jasno ločenih genotipov, v nalogi označenih z 1 in 2. Večina izolatov je pripadala genotipu 1, dva seva z Danske pa sta predstavljala genotip 2 (Zalar in sod., 2011). Podatki MSP-PCR prstnega odtisa kažejo, da je glede na prisotnost stresnih dejavnikov in več genotipov znotraj enega stroja možna občasna rekombinacija. Telomorfi pri rodu *Exophiala* sicer niso znani (Zalar in sod., 2011).

Ker se *E. dermatitidis* in *E. phaeomuriformis* pojavljata kot najpogosteje izolirani vrsti, smo seve testirali na različne temperature, pH in različne koncentracije soli (NaCl). Ugotovili smo, da so sevi vseh genotipov *E. dermatitidis* in sevi *E. phaeomuriformis* rasli pri 42 °C in večinoma tudi pri 45 °C in 47 °C. Nobeden izmed izolatov ni rasel pri 50 °C. Vrsta *E. dermatitidis* je dobro rasla tudi pri višjih temperaturah, rast *E. phaeomuriformis* pa je bila pri višjih temperaturah šibkejša. To so opazili že Matos in sodelavci (2002), ki so *E. dermatitidis* izolirali pretežno iz vročih savn, *E. phaeomuriformis* pa iz temperaturno manj ekstremnih okolij kopalnic. Odpornost na visoke temperature je najverjetneje pogojena s tvorbo kapsul pri vrsti *E. dermatitidis* (Yurlova in de Hoog, 2002), ki celice ščitijo pred izsušitvijo. Zabeležili smo tudi rast obeh vrst do pH 12,5 in pri 17 % NaCl. Prav tako smo ugotovili, da sevi *E. dermatitidis* pri nizkih pH vrednostih gojišča rastejo kot posamezne kvasne celice in muriformni skupki, pri pH 5,0 pa je bila njihova rast filamentozna, tvorili so v verigo povezane konidije. Tak fenotip smo opazili do pH 12,5 (Zalar in sod., 2011).

Morfologija *E. phaeomuriformis* se pri različnih pH ni opazno razlikovala. Rast *E. phaeomuriformis* je pri 17 % NaCl šibkejša kot rast *E. dermatitidis*. Prilagoditev na slanost bi lahko bil pomemben virulentni dejavnik. Haase s sodelavci (1991) predvideva, da je *E. dermatitidis* kot stalni naseljevalec pljuč bolnikov s cistično fibrozo, halotolerantna vrsta (Haase in sod., 1991).

Kombinacija termotolerance, tolerance na ekstremne pH vrednosti in halotolerance omogoča kvasovkam preživetje in pojasnjuje njihovo pogosto pojavljanje v gospodinjskih strojih. Pri glivah ta kombinacija do sedaj še ni bila opažena. Omenjene glive lahko skladno z objavo Bowersa in sodelavcev (2009) označimo kot **poliekstremotolerantne mikroorganizme**. Termin „poliekstremofili“ so uporabili za anaerobne bakterije in aerobne arheje iz afriških bazičnih in izjemno slanih jezer. Le-te so sposobne optimalne rasti na visokih koncentracijah soli (med 3,7 in 4,3 M Na⁺), pri bazičnem pH (nad 9,5) in visokih temperaturah (med 46 in 66 °C). Aktivno rast rodu *Exophiala* smo zabeležili do 47 °C, v pH območju od 2,5 do 12,5 in do koncentracije 17 % (oz. 3 M) NaCl.

Ugotovili smo, da ima trdota vode pomembno vlogo pri pojavljanju *E. dermatitidis* in *E. phaeomuriformis* v pomivalnih strojih. Iz območij s srednje trdo in trdo vodo smo črne kvasovke rodu *Exophiala* najpogosteje izolirali. Karuppayil in Szaniszlo (1997) sta odkrila, da je koncentracija in razpoložljivost Ca⁺ ionov pomemben povod za regulacijo oblike rasti *E. dermatitidis* in posledično za njeno virulenco. Pri nizkih koncentracijah je rast muriformna in virulentna, pri višjih koncentracijah so opazili brsteče celice ali pseudo- oz. prave hife (Karuppayil in Szaniszlo, 1997; Zalar in sod., 2011).

Z neposrednim opazovanjem gumijastega tesnila pod svetlobnim in vrstičnim mikroskopom smo odkrili biofilme, polne muriformnih celic rodu *Exophiala*. Črne kvasovke namreč pri neugodnih pogojih tvorijo ekstremotoleranten ekotip, opazen kot meristematske, močno melanizirane, muriformne celice. Muriformni fenotip v pomivalnih strojih je rezultat več stresnih dejavnikov, kot so sprememba pH (od 6,5 do 9,5 v ciklu pranja), menjava suhih in mokrih period, nizkih in visokih slanosti in dviga temperature od 10 do 80 °C. Načrtna inokulacija sterilne gume je bila uspešna. Z uporabo vrstične mikroskopije smo odkrili, da so se na sterilno gumo v SNA gojišču pritrdile le celice *E.*

dermatitidis genotipa A. To smo pričakovali, saj le ta genotip tvori kapsulo, s katero se lahko pritrdi na površino gume. Znano je, da lahko črne kvasovke koristijo alkilbenzene, monoaromske ogljikovodikove spojine in gumo kot edini vir ogljika (Prenafeta-Boldú in sod., 2006; Rose in Steinbuchel, 2005). Pralna sredstva in tesnila iz gume bi tako lahko predstavljala dodaten vir hranil za črne kvasovke, saj so sestavljena iz biorazgradljivih komponent, kot so sladkorji, alkoholi, kisline, poliizopren in komponente nafte. Po 1 mesecu inkubacije je gojišče SNA postalo motno, kar kaže na namnožitev gliv. Iz tega sklepamo, da lahko vsi genotipi, ne glede na njihovo sposobnost vezave, izkoriščajo gumo kot edini vir ogljika.

Skupaj smo iz pomivalnih in pralnih strojev izolirali in identificirali 38 glivnih vrst, ki pripadajo 20 rodovom. Poleg že navedenih glivnih rodov smo izolirali tudi glive rodov *Magnusiomyces*, *Gibberella*, *Phaeosphaeria*, *Ochroconis*, *Pestalotiopsis*, *Sporopachydermia* ter algo rodu *Prototheca*, ki jih v raziskavah glivne flore voda in vlažnih prostorov niso opazili.

O glivi *Magnusiomyces capitatus* (prej *Dipodascus capitatus*) je malo znanega. Spada v deblo Ascomycota, opisanih je 8 vrst. Kolonije so bele ali brezbarvne, tvori septirane hife, gametangije in askospore. Anamorf je *Geotrichum capitatum* (de Hoog in sod., 2000). *M. capitatus* je bila izolirana iz okolja bogatega z lesom in iz iztrebkov ptic (perutnine) (Anaissie in sod., 2009). Anamorf in telomorf sta oportunistična patogena ljudi. Pogosto okuži ljudi, ki bolehalo za krvnimi nepravilnostmi kot je levkemija (Pimentel in sod., 2005). Izgleda, da je ta vrsta v pomivalnih strojih našla novo ekološko nišo.

Rod *Ochroconis* spada v deblo Ascomycota. Glive tega rodu tvorijo rjave, temno pigmentirane, puhaste kolonije. Hife imajo debelo celično steno, na koncih tvorijo konidije. Optimalna temperatura za rast je 35 °C, nekatere vrste lahko rastejo pri temperaturah do 45 °C. Vrsta *O. gallopava* je znan patogen ptic, posebej perutnine. Vrsti *O. gallopava* in *O. constricta* lahko povzročata lokalne ali sistemske okužbe tudi pri ljudeh (Rippon, 1988).

Znotraj rodu *Sporopachydermia*, ki spada v deblo Ascomycota, najdemo vrsto *S. cereana*. Kvasovko so izolirali iz površine kaktusov, tvori askospore, kolonije so rumenkasto bele barve, sprva ni bila opisana kot oportunistični patogen človeka. Anoop in sodelavci (2011) so opisali prvi smrtni primer človeka z levkemijo kot posledico okužbe s *S. cereana*. Patogena je za imunsko oslABLJENE ljudi, pri katerih lahko povzroči glivno sepso (Anoop in sod., 2011).

Prototheca wickehamii je saprofitna, aklorofilna mutanta zelene alge *Chlorella*. Je precej razširjena, predvsem na območjih z vodo kot so jezera, potoki, ribniki. Lahko se nahaja tudi v pitni vodi. Nevarna je za imunsko oslABLJENE ljudi, za ljudi s transplantacijami, diabetesom in AIDS-em (Taylor in sod., 2010). Povzročča sistemske infekcije, odporna je na antibiotike, razen na tetracikline. Okužb s to algo je verjetno več, vendar so pogosto zavedene kot okužbe s kvasovkami rodu *Candida*. Od *C. albicans* se razlikuje v velikosti celic in po prisotnosti citoplazemskih zrn v starih kulturah (Lee in sod., 1975).

Vrsti rodov *Phaeosphaeria* in *Pestalotiopsis* nista patogeni za ljudi, povzročata nekroze rastlin, predvsem žitaric in koroze. Spadata v deblo Ascomycota. Glive iz rodu *Gibberella* so telomorfi gliv iz rodu *Fusarium*. Kolonizirajo rastline in povzročajo nekroze žitaric. Znane so po produkciji sekundarnih metabolitov (toksinov), ki so ob pogosti prisotnosti v živilih (npr. v moki) škodljivi za ljudi. Po rodu *Gibberella* so poimenovali rastlinski rastni hormon giberelin, ki vpliva na celično elongacijo in rast rastlin (Blixt, 2009; Liu in sod., 2007; Agrios, 1988).

5.2 SKLEPI

Pokazali smo, da lahko splošno uporabljani stroji kot so pomivalni in pralni stroji, predstavljajo okolje za rast in razvoj poliekstremofilnih in oportunistično patogenih gliv, ki v te sisteme zaidejo z vodo. Pri tem starost, znamka in uporaba stroja ter znamka detergenta niso pomembni. Iz pomivalnih strojev smo izolirali 158 sevov gliv, ki pripadajo 23 vrstam. Iz pralnih strojev smo osamili 38 glivnih sevov, ki pripadajo 23 vrstam.

55 % izolatov iz pomivalnih strojev so predstavljale črne kvasovke rodu *Exophiala*. Vsi genotipi *E. dermatitidis* in *E. phaeomuriformis* so rasli pri temperaturah od 10 °C do 45 °C in na 17 % NaCl. Oba genotipa *E. phaeomuriformis* ter genotip C *E. dermatitidis* rastejo v pH območju od 2,5 do 12,5. Genotipa A in B *E. dermatitidis* pri pH 2,5 ne rastejo.

Ugotovili smo, da ima trdota vode vpliv na pojavnost oportuno patogenih črnih kvasovk in lahko vpliva na morfologijo nekaterih gliv ter na pogostost njihovega pojava. *E. dermatitidis* in *E. phaeomuriformis* smo iz vzorcev s trdo vodo izolirali v 59,2 %, iz vzorcev s srednje trdo vodo v 37,7 % in iz vzorcev z mehko vodo v 31,6 %.

Med genotipi *E. dermatitidis* je mogoča rekombinacija. Vsi genotipi *E. dermatitidis* lahko za rast izkoriščajo tesnila iz gume.

Za zdrave ljudi glive izolirane iz pomivalnih in pralnih strojev redko predstavljajo tveganje. Kljub množični prisotnosti gliv v teh aparataturah še nismo zasledili konkretne povezave med gospodinjskimi stroji in okužbo ljudi.

Posebna pozornost v smislu večje higiene pomivalnih in pralnih strojev bi se morala posvečati v vrtcih, bolnišnicah in domovih za ostarele. Oportunistično patogene glive namreč predstavljajo večje tveganje za imunsko oslajljene ljudi, kot so otroci, starostniki, bolniki s kroničnimi boleznimi; rakom, AIDS-em, diabetesom in kroničnimi obolenji dihal.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Pralni in pomivalni stroji postajajo vse pogosteje uporabljani v naših gospodinjstvih. Glede na umazanost oblačil oz. posode izberemo cikel pranja. Cikli pri procesu pranja dosegajo različne temperature, pH, nivo vode. Z dodajanjem detergentov se voda mehča. V zadnjih letih se več skrbi posveča tudi okolju in manjši porabi energije, zato uporabljamo programe z nižjimi temperaturami in manjšo porabo vode, pralna sredstva pa naj bi bila zaradi čiščenja odpadnih voda biorazgradljiva. Zaradi naštetih dejavnikov gospodinjski stroji ne predstavljajo več aparatov za mikrobiološko neoporečno posodo, ampak okolje za namnožitve mikroorganizmov. Organizacija NSF International je razvila standard ANSI Standard 184, po katerem certificirani proizvodi po pranju dosežejo 99,9 % redukcijo bakterij, vendar pa ta standard ne vključuje testiranj na glive.

V pralne in pomivalne stroje doteka voda iz vodovodnega omrežja. Iz vode, ki se uporablja tudi v vodovodnih sistemih, je bilo izoliranih veliko število glivnih vrst. Nekatere izmed njih spadajo med oportunistične patogene človeka. Oportunistični glivni patogeni so bili najdeni tudi v okoljih antropogenega izvora kot so savne, kopalnice in okolja z visoko zračno vlažnostjo. Pogoji v omenjenih naravnih in umetnih okoljih so podobni pogojem znotraj pomivalnih in pralnih strojev. O glivni flori v notranjosti pomivalnih in pralnih strojev je malo znanega. Pojav plesni povezujejo z zračno vlago v prostorih s pomivalnimi in pralnimi stroji. Opisane so okužbe z oportunističnimi patogeni rodu *Candida*. Okuženi ljudje so bili v stiku s pomivalnimi stroji.

V diplomskem delu smo poskušali ugotoviti sestavo glivne flore in pojav oportunističnih patogenov v pomivalnih in pralnih strojih ter njihovo toleranco na pogoje znotraj strojev. Vzorčenje je potekalo po vsem svetu. Inokulirane MEA plošče s kloramfenikolom smo inkubirali pri 25 °C in 37 °C. Po 3 do 5 dneh smo glive precepili na sveža MEA gojišča. Iz čistih kultur smo izolirali DNA, jo pomnožili v PCR reakcijah in pomnožke poslali na sekvenciranje v podjetje Macrogen (Južna Koreja). Dobljene sekvence smo identificirali z uporabo BLAST algoritma. Ugotovili smo, da se glivna flora znotraj posameznih delov pomivalnih in pralnih strojev razlikuje ter, da na to najbrž vplivajo razlike v temperaturi, pretoku vode in količini hranil.

Pomivalne in pralne stroje naseljujejo oportunistični patogeni človeka kot so *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Exophiala*, *Fusarium*, *Magnusiomyces*, *Penicillium*, *Pichia* in *Rhodotorula*. Ugotovili smo, da večino izolatov iz tesnila pomivalnih strojev predstavljajo črne kvasovke, vrste *E. dermatitidis* (genotipi A, A2, A3, B in C) in *E. phaeomuriformis*, ki so bile prisotne v 55 % strojev, okuženih z glivami. Pri *E. phaeomuriformis* smo prvič zabeležili pojav novega genotipa, poimenovanega genotip 2. Znotraj posameznih pomivalnih strojev smo najpogosteje izolirali genotip A, v treh primerih smo zabeležili pojav dveh genotipov (A in C, A in A2 ter A in B) in le v enem primeru sopojava obeh vrst.

Pri obeh vrstah smo preverjali temperaturno in pH toleranco na gojiščih MEA ter halotoleranco na gojiščih MEA z dodanim NaCl. Rast sevov je bila opazovana 2 tedna. Večina sevov obeh vrst je dobro rasla pri temperaturah od 10 °C do 45 °C, nekateri sevi tudi pri 47 °C. Pri 50 °C nismo zabeležili rasti. *E. phaeomuriformis* je rastla na gojiščih s pH od 2,5 do 12,5 medtem, ko je pri *E. dermatitidis* le genotip C rasel pri pH 2,5. Vsi genotipi *E. dermatitidis* so rasli pri pH 12,5. Prav tako so vsi sevi *E. dermatitidis* in večina sevov *E. phaeomuriformis* rasli na 17 % NaCl. Kombinacija teh dejavnikov pri glivah do sedaj še ni bila opažena. Te glive smo označili kot poliekstremotolerantne mikroorganizme.

Ugotovili smo, da trdota vode lahko vpliva na pojav *E. dermatitidis* in *E. phaeomuriformis*. Vrsti sta bili iz vzorcev iz območja s trdo vodo izolirani v 59,2 %, iz vzorcev iz območja s srednje trdo vodo v 37,7 % in iz vzorcev iz območja z mehko vodo v 31,6 %. Zaradi neugodnih pogojev znotraj strojev smo predpostavili tudi, da med genotipi vrste *E. dermatitidis* poteka občasna rekombinacija, čeprav telomorfi te vrste niso znani. Z MSP-PCR prstnim odtisom smo pokazali, da je občasna rekombinacija med genotipi mogoča.

Meristematske, močno melanizirane, muriformne celice črnih kvasovk so bile prevladujoča morfologija, ki smo jo opazili pri mikroskopiranju tesnila s svetlobnim in vrstičnim mikroskopom. Muriformni fenotip v pomivalnih strojih je rezultat več stresnih dejavnikov, kot so sprememba pH (od 6,5 do 9,5 v ciklu pranja), menjava suhih in mokrih period, nizkih in visokih slanosti ter dviga temperature od 10 °C do 80 °C. Pri inokulaciji sterilne gume z vrsto *E. dermatitidis* v gojišču SNA smo ugotovili, da se je le A genotip pritrdil na

površino gume. To je bilo pričakovano, saj le ta genotip proizvaja celično kapsulo. Vsi trije genotipi so bili sposobni razgradnje gume kot edinega vira ogljika, saj je po 1 mesecu inkubacije SNA gojišče postalo motno, kar kaže na rast glive.

V diplomski nalogi smo pokazali, da lahko pomivalni in pralni stroji predstavljajo okolje za rast in evolucijo poliekstremofilnih in oportunistično patogenih gliv, ki v te sisteme zaidejo z vodo. Glive so na okolje znotraj strojev prilagojene. Na prisotnost nekaterih vrst gliv lahko vpliva tudi trdota vode. Starost, znamka stroja in detergenta ter pogostost uporabe stroja na pojav gliv nimajo vpliva.

6.2 SUMMARY

Washing machines and dishwashers are increasingly used in our households. Washing cycle is selected according to the dirtiness of clothes or dishes. Cycles in the washing process reach different temperatures, pH and water level. With the addition of detergents, water becomes softer. In recent years, more care is dedicated to the environment protection and energy consumption, so cycles with lower temperatures and reduced water consumption are becoming more common. Due to the treatment of wastewater, detergents have to be biodegradable. Due to the listed factors, household machines can represent enrichment environments for microorganisms. The organization NSF International has developed a ANSI Standard 184, according to which certified products after washing reduced bacteria for 99.9 %, however this standard does not include testing for fungi.

Washing machines and dishwashers receive water from water supply systems. A large number of fungal species has been isolated from tap water used in plumbing systems. Some of them were recognised as human opportunistic pathogens. Opportunistic fungal pathogens have been also found in environments of anthropogenic origin such as saunas, bathrooms and the environments with high air humidity. There are less information about the fungal flora inside dishwashers and washing machines. The emergence of mold is associated with moisture in the rooms with dishwashers and washing machines. Human infections with opportunistic pathogens of the genus *Candida* were reported. Infected people were in contact with the dishwashers.

In this thesis we tried to determine the composition of fungal flora, the emergence of opportunistic pathogens in dishwashers and washing machines and their tolerance to conditions within the machines. Sampling was conducted around the world. MEA plates with chloramphenicol were inoculated and incubated at 25 ° C and 37 ° C. After 3 to 5 days, we plated fungi on a fresh MEA medium. DNA isolated from pure cultures was amplified and sequenced. Sequencing was done by the company Macrogen in South Korea. The sequences were identified using the BLAST algorithm. We found that the fungal flora within individual parts of dishwashers and washing machines differs. This is probably due to differences in temperature, water flow and nutrition quantity. Dishwashers and washing machines are inhabited by the human opportunistic pathogens:

Aspergillus, *Candida*, *Cladosporium*, *Exophiala*, *Fusarium*, *Magnusiomyces*, *Penicillium*, *Pichia* and *Rhodotorula*. We found that most isolates from dishwasher rubbers are represented by black yeasts species *E. dermatitidis* (genotypes A, A2, A3, B and C) and *E. phaeomuriformis*. Those species were isolated in 55 % with fungi infected machines. In species *E. phaeomuriformis* occurrence of a new genotype, named genotype 2, was first recorded. Genotype A was most frequently isolated from dishwashers. In only three cases from one dishwasher two genotypes (A and C, A and A2, A and B) were isolated and in one case we isolated both species from one dishwasher.

In both black yeast species we tried to determine temperature and pH tolerance on the MEA medium. Halotolerance was determined on MEA medium with the addition of NaCl. Growth of the strains was observed for 2 weeks. Most strains of both species grew well at temperatures from 10 °C to 45 °C, some strains even at 47 °C. At 50 °C no growth was observed. *E. phaeomuriformis* could grow in media with pH 2,5 to 12,5, while in *E. dermatitidis* only genotype C grew at pH 2,5. All genotypes of *E. dermatitidis* grew at pH 12,5. Also, all strains of *E. dermatitidis* and most strains of *E. phaeomuriformis* grew at 17 % NaCl. The combination of tolerance to these factors in fungi has not been observed yet, therefore they could be classified as polyextremotolerant microorganisms.

We found that water hardness may influence the occurrence of *E. dermatitidis* and *E. phaeomuriformis*. In samples from areas with hard water, the positive occurrence was recorded in 59,2 %, in areas with moderately hard water in 37,7 % and in areas with soft water in 31,6 %. Due to adverse conditions within the machines, we assume that in *E. dermatitidis* genotypes occasional recombinations take place, although mature teleomorphs in this species are not known. MSP-PCR fingerprint data suggest that occasional recombination between genotypes is possible.

Meristematic, heavily melanised, muriform cells were the prevailing morphology that we observed on the rubber with electron and scanning microscopy. Muriform phenotype in dishwashers is probably the result of multiple stress factors, such as changing pH (from 6,5 to 9,5 in a washing cycle), alternation of dry and wet periods, low and high salinity and increase of temperature from 10 °C to 80 °C. When we inoculated the sterile dishwasher

rubber with *E. dermatitidis* in SNA medium, we observed that only genotype A can adhere to the surface of the rubber. This was expected, since only this genotype can produce cell capsules. All three genotypes were capable of degrading rubber as the sole source of carbon. After one month of incubation, medium SNA became turbid, which was indication of fungal growth.

In the thesis we have shown that dishwashers and washing machines represent environments for growth and evolution of fungi. Most of them are polyextremotolerant and opportunistic pathogenic fungi. They enter in household machines with water from the plumbing systems. These fungi are adapted to the conditions within the machines. Water hardness can also affect the presence of certain fungal species. Age, brand of machines and detergents, and the frequency of machine use have little effect on the occurrence of fungi.

7 VIRI

- Abdel-Fattah H. M., Moubasher A. H., Abdel-Hafez S. I. 1977. Studies on mycoflora of saline marshes in Egypt. I. Sugar fungi. *Mycopathologia*, 61: 19-26
- Agrios G.N. 1988. Plant pathology. 3rd ed. San Diego, Academic Press: 803 str.
- A.I.S.E. / Cefic. 2009. Čemu posamezne sestavine sploh služijo? Ljubljana, A.I.S.E. / Cefic / Združenje kemijske industrije: 1 str.
http://si.cleanright.eu/index.php?option=com_content&task=pdf&Itemid=1577
(marec 2011)
- Altschul F. S., Gish W., Miller W., Myers W. E., Lipman J. D. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410
- Anaissie E. J., Kuchar R. T., Rex J. H., Francesconi A., Kasai M., Müller F. M., Lozano-Chiu M., Summerbell R. C., Dignani M. C., Chanock S. J., Walsh T. J. 2001. Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: A new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. *Clinical Infectious Diseases*, 33: 1871-1878
- Anaissie E. J., McGinnis R. M., Pfaller A. M. 2009. *Clinical mycology*. 2nd ed. Philadelphia, Churchill Livingstone Elsevier: 700 str.
- Andrighetto C., Psomas E., Tzanetakis N., Suzzi G., Lombardi A. 2000. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Letters in Applied Microbiology*, 30: 5-9
- Anoop P., Riley U., Ethell M. E., Treleaven J., Johnson M. E., Morgan J. G., Potter N. M. 2011. First report of fatal human infections with the cactophilic yeast *Sporopachydermia cereana*. *Journal of Infection*, 62, 4: 311-313
- Arikan S., Lozano-Chiu M., Paetznick V., Nangia S., Rex J. H. 1999. Microdilution susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 3946-3951
- Austen B., McCarthy H., Wilkins B., Smith A., Duncombe A. 2001. Fatal disseminated fusarium infection in acute lymphoblastic leukaemia in complete remission. *Journal of Clinical Pathology*, 54: 488-490
- Band J. D., Maki D. G. 1979. Infections caused by arterial catheters used for hemodynamic monitoring. *American Journal of Medicine*, 67: 735-741
- Barber B. A., Crotty J. M., Washburn R. G., Pegram P. S. 1995. *Cryptococcus neoformans* myositis in a patient with AIDS. *Clinical Infectious Diseases*, 21: 1510-1511

- Baro T., Torres-Rodriguez J. M., Morera Y., Alia C., Lopez O., Mendez R. 1999. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 1170-1172
- Bellis M. 2011. History of washing machines. New York, About.com: 2 str.
<http://inventors.about.com/od/wstartinventions/a/washingmachines.htm> (februar 2011)
- Bennett J. E. 1998. Candidiasis. V: Harrison's principles of internal medicine. Isselbacher K. J., Braunwald E., Wilson J. D., Martin J. B., Fauci A. S., Kasper D. L. (eds.). New York, McGraw-Hill: 860-861
- Bigley V. H., Duarte R. F., Gosling R. D., Kibbler C. C., Seaton S., Potter M. 2004. *Fusarium dimerum* infection in a stem cell transplant recipient treated successfully with voriconazole. *Bone Marrow Transplant*, 34: 815-817
- Blixt E. 2009. On *Phaeosphaeria nodorum* in wheat. Doctoral Thesis. Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences: 55 str.
- Bodey G., Bueltmann B., Duguid W., Gibbs D., Hanak H., Hotchi M., Mall G., Martino P., Meunier F., Milliken S., Naoe S., Okudaira M., Scevola D., van't Wout J. 1992. Fungal infections in cancer patients: An international autopsy survey. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 11: 99-109
- Boedijn K. B. 1978. Rastlinski svet 3. del.: Steljčnice, mahovi, praprotnice. Mladinska knjiga, Ljubljana: 385 str.
- Boekhout T., Kurtzman C. P. 1996. Principles and methods used in yeast classification and an overview of currently accepted yeast genera. V: Nonconventional yeasts in biotechnology. Wolf K. (ed.). Springer, Berlin Heidelberg: 1-81
- Bowers K., Mesbah N., Wiegel J. 2009. Biodiversity of poly-extremophilic bacteria: Does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physico-chemical boundary for life? *Saline Systems*, 5: 1-8
- Bren A. 1998. Fungal peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 17: 839-843
- Carbone I., Kohn L. M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91: 553-556
- Chang C. L., Kim D-S., Park D. J., Kim H. J., Lee C. H., Shin J. H. 2000. Acute cerebral phaeohyphomycosis due to *Wangiella dermatitidis* accompanied by cerebrospinal fluid eosinophilia. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 1965-1966
- Collier L., Balows A., Sussman M. 1998. Topley & Wilson's microbiology and microbial infections. 9th ed. London, Arnold Publishing: 674 str.

- de Hoog G. S., Guarro J., Gene J., Figueras M. J. 2000. Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 1126 str.
- de Hoog, G. S., Queiroz-Telles F., Haase G., Fernandez-Zeppenfeldt G., Angelis D. A., van den Ende A., Matos T., Peltroche-Llacsahuanga H., Pizzirani-Kleiner A. A., Rainer J., Richard-Yegres N., Vicente V., Yegres F. 2000. Black fungi: Clinical and pathogenic approaches. *Medical Mycology*, 38: 243-250
- Debeauvais J. P., Sarfati J., Chazalet V., Latgé J. P. 1997. Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunology*, 65, 8: 3080-3085
- Dixon D. M., McNeil M. M., Cohen M. L., Gellin B. G., La Montagne J. R. 1996. Fungal infections: a growing threat. *Public Health Reports*, 111, 3: 226-236
- Du Preez C. J., Bosch M., Prior A. B. 1986. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. *Enzyme and Microbial Technology*, 8, 6: 360-364
- Dunlap J. C. 2007. Fungal genomics. Amsterdam, Academic Press: 302 str.
- Gallagher R. M. 1992. Naravoslovje – kemija. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 167 str.
- Gerrits van den Ende A., de Hoog G. S. 1999. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. *Studies in Mycology*, 43: 151-162
- Gizmo Highway. 2005. The history of the dishwasher. Geelong, Gizmo Highway: 1 str.
<http://www.gizmohighway.com/history/dishwasher.htm> (februar 2011)
- Glass N., Donaldson G. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1323-1330
- Göttlich E., van der Lubbe W., Lange B., Fiedler S., Melchert I., Reifenrath M., Flemming H-C., de Hoog G. S. 2002. Fungal flora in groundwater-derived public drinking water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 205: 269-279
- Hageskal G., Knutsen A. K., Gaustad P., de Hoog G. S., Skaar I. 2006. Diversity and significance of mold species in Norwegian drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 7586-7593
- Haase G., Skopnik H., Groten T., Kusenbach G., Posselt H. G. 1991. Long-term fungal cultures from patients with cystic fibrosis. *Mycoses*, 34: 373-376
- Jacobson D. J., Dettman J. R., Adams R. I., Boesl C., Sultana S., Roenneberg T., Merrow M., Duarte M., Marques I., Ushakova A., Carneiro P., Videira A., Navarro-Sampedro L., Olmedo M., Corrochano L. M., Taylor J. W. 2006. New findings of *Neurospora* in

- Europe and comparisons of diversity in temperate climates on continental scales. *Mycologia*, 98, 4: 550-559
- Jeanmougin F., Thompson J. D., Gouy M., Higgins D. G., Gibson T. J. 1998. Multiple sequence alignment with ClustalX. *Trends in Biochemical Sciences*, 23: 403-405
- Kärkkäinen P., Räsänen A., Kauhanen E., Nevalainen A., Miettinen I., Rintala H. 2009. Fungal diversity in finnish drinking water distribution networks determined by culture, rapdfingerprinting and sequencing. V: Abstracts: Microbes and man-interdependence and future challenges. 3rd congress of European Microbiologists FEMS, Gothenburg, Sweden, June 28 – July 2, 2009. Gothenburg, Federation of European Microbiological Society (FEMS): 1 str.
- Karuppaiyil S. M., Szaniszlo P. J. 1997. Importance of calcium to the regulation of polymorphism in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *Medical Mycology*, 35: 379-388
- Kirk P. M., Cannon P. F., Winter D. W., Stalpers J. A. 2008. Dictionary of the fungi. 10th ed. Oxfordshire, CABI Publishing: 640 str.
- Krcmery V., Jesenska Z., Spanik S., Gyarfás J., Nogova J., Botek R., Mardiak J., Sufliarsky J., Sisolakova J., Vanickova M., Kunova A., Studena M., Trupl J. 1997. Fungaemia due to *Fusarium* spp. in cancer patients. *Journal of Hospital Infection*, 36: 223-228
- Kurtzman C. P., Fell J. W. 1998. The yeasts: A taxonomic study. 4th ed. New York, Elsevier: 1055 str.
- Kwon-Chung K. J., Bennett J. E. 1992. Medical mycology. Philadelphia, London, Lea & Febiger: 2049 str.
- Larone D. H. 1995. Medically important fungi: A guide to identification. 3rd ed. Washington, ASM Press: 409 str.
- Latgé J. P. 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 2: 310-350
- Lee W. S., Lagios M. D., Leonards R. 1975. Wound infection by *Prototheca wickerhamii*, a saprophytic alga pathogenic for man. *Journal of Clinical Microbiology*, 2, 1: 62-66
- Letscher-Bru V., Campos F., Waller J., Randriamahazaka R., Candolfi E., Herbrecht R. 2002. Successful outcome of treatment of a disseminated infection due to *Fusarium dimerum* in a leukemia patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 1100-1102
- Lian X., de Hoog G. S. 2010. Indoor wet cells harbour melanized agents of cutaneous infection. *Medical Mycology*, 48: 622-628

- Liu A. R., Xu T., Guo L. D. 2007. Molecular and morphological description of *Pestalotiopsis hainanensis* sp. nov. a new endophyte from a tropical region of China. *Fungal Diversity*, 24: 23-36
- Madigan T. M., Martinko M. J. 2006. Brock biology of microorganisms. 11th ed. New York, Pearson Prentice Hall: 992 str.
- Malovrh M., Oberžan D., Pogačnik J., Šijanec Zavrl M., Repič K. 1999. Pralni stroj. Ljubljana, Ministrstvo za gospodarske dejavnosti, Agencija RS za učinkovito rabo energije: 4 str.
http://www.aure.gov.si/eknjiznica/IL_3-06.PDF (februar 2011)
- Manfredini L., Garaventa A., Castagnola E., Viscoli C., Moroni C., Dini G., Garre M. L., Manno G., Savioli C., Kotitsa Z. 1995. Fungal infections in pediatric oncology. *Pediatrica Medica E Chirurgica*, 17: 435-441
- Matos T., de Hoog G. S., de Boer A. G., de Crom I., Haase G. 2002. High prevalence of the neurotropic *Exophiala dermatitidis* and related oligotrophic black yeasts in sauna facilities. *Mycoses*, 45: 373-377
- Matos T., Haase G., Gerrits van den Ende A., de Hoog G. S. 2003. Molecular diversity of oligotrophic and neurotropic members of the black yeast genus *Exophiala*, with accent on *E. dermatitidis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 83: 293-303
- McGinnis M. R. 1983. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: New concepts, diagnosis, and mycology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 8: 1-16
- MMWR. 2002. *Exophiala* infection from contaminated injectable steroids prepared by a compounding pharmacy – United States, July-November 2002. *JAMA*, 289: 291-293
- Nedret Koc A., Kocagöz S., Erdem F., Gündüz Z. 2002. Outbreak of nosocomial fungemia caused by *Candida glabrata*. *Mycoses*, 45, 11-12: 470-475
- Neofytos D., Horn D., De Simone J. A. J. 2007. *Rhodotorula mucilaginosa* catheter-related fungemia in a patient with sickle cell disease: Case presentation and literature review. *Southern Medical Journal*, 100: 198-200
- Novak M. 2009. Hemolitične učinkovine v ekstraktu plesni *Aspergillus fumigatus*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 52 str.
- NSF International. 2008. NSF/ANSI standard for residential equipment - residential dishwashers. Arlington, National Science Foundation: 13 str.
http://standards.nsf.org/apps/group_public/download.php/6280/184i1r4.pdf (marec 2011)
- Ogundero W. V. 1981. Nutritional physiology of pathogenic species of thermophilic *Mucor*. *Medical Mycology*, 19, 3: 179-185

- Pereira V. J., Fernandes D., Carvalho G., Benoliel M. J., San Romão M. V., Barreto Crespo M. T. 2010. Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods. *Water Research*, 44, 17: 4850-4859
- Pimentel J. D., Baker M., Woodgyer A. J., Harris O. C. 2005. Fatal disseminated *Blastoschizomyces capitatus* (*Geotrichum capitatum*) in a patient with relapse of acute lymphoblastic leukaemia. *Pathology*, 37, 4: 319-322
- Pitt I. J. 1987. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 2: 266-269
- Podobnik A., Devetak D. 2000. *Biologija 4 in 5, Raznolikost živih bitij*. 2. izd. Ljubljana, DZS: 119 str.
- Poročilo komisije Evropskemu parlamentu in Svetu o biorazgradljivosti glavnih organskih sestavin detergentov, ki niso površinsko aktivne, v skladu s členom 16 Uredbe (ES) št. 648/2004 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 31. marca 2004 o detergentih. 2009. Bruselj, Komisija evropskih skupnosti: 13 str.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2009:0208:FIN:sl:PDF>
(marec 2011)
- Prenafeta-Boldú F. X., Summerbell R., de Hoog G. S. 2006. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: Biotechnology's unexpected encounter with biohazard? *FEMS Microbiology Reviews*, 30: 109-130
- Puncer Z., Vaš M. 2000. *Električne naprave in stroji v našem domu*. Žalec, OŠ Žalec: 1 str.
<http://ro.zrsss.si/~puncer/elektrika/pomival.html>. (februar 2011)
- Raper K. B., Fennell I. D. 1965. *Aspergillus fumigatus* group. V: The genus *Aspergillus*. Raper K. B., Fennell I. D. (eds.). Baltimore, The Williams & Wilkins Company: 238-268
- Rementería A., López-Molina N., Ludwig A., Vivanco B. A., Bikandi J., Pontón J., Garaizar J. 2005. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22: 1-23
- Rippon J. W. 1988. *Medical mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic Actinomycetes*. 3rd ed. Philadelphia, W. B. Saunders Company: 797 str.
- Romani L. 2011. Immunity to fungal infections. *Nature Immunology*, 11: 275-288
- Rose H. D., Kurup V. P. 1977. Colonization of hospitalized patients with yeast-like organisms. *Sabouraudia*, 15: 251-256
- Rose K., Steinbuchel A. 2005. Biodegradation of natural rubber and related compounds: Recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 2803-2812

- Schroers H.-J., O'Donnell K., Lamprecht S. C., Kammeyer P. L., Johnson S., Sutton D. A., Rinaldi M. G., Geiser D. M., Summerbell R. C. 2009. Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. *Mycologia*, 101: 44-70
- Skoulidis F., Morgan S. M., MacLeod M. K. 2004. *Penicillium marneffeii*: a pathogen on our doorstep? *Journal of the Royal Society of Medicine*, 97, 8: 394-396
- Sterflinger K. 1998. Temperature and NaCl- tolerance of rock-inhabiting meristematic fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 74: 271-281
- Sudhadham M. 2009. *Exophiala dermatitidis*: an opportunistic pathogen emerging from the tropical rainforest. Doctoral Thesis. Amsterdam, Faculteit der Natuurwetenschappen: 129 str.
- Taj-Aldeen S. J., El Shafie S., Alsoub H., Eldeeb Y., de Hoog G. S. 2006. Isolation of *Exophiala dermatitidis* from endotracheal aspirate of a cancer patient. *Mycoses*, 49: 504-509
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599
- Taylor J. W., Bowman B., Berbee M. L., White, T. J. 1993. Fungal model organisms: Phylogenetics of *Saccharomyces*, *Aspergillus* and *Neurospora*. *Systematic Biology*, 42: 440-457
- Taylor S. K., Meyerle H. J., Glusac J. E. 2010. Cutaneous protothecosis. New York, Medscape: 7 str.
<http://emedicine.medscape.com/article/1109118-overview> (marec 2011)
- UBM Canon. 2010. Miele dishwasher protects against infections. Los Angeles, Appliance Magazine, september 2010: 1 str.
<http://www.appliancemagazine.com/news.php?article=1430114&zone=0&first=1>
(marec 2011)
- Wang Q., Szaniszló P. J. 2009. Roles of the pH signaling transcription factor PacC in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 9: 657-666
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: PCR protocols: A guide to methods and applications. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (eds.). New York, Academic Press: 315-322
- Whitmyre K. G., Pandian D. M. 2004. Probabilistic assessment of the potential impacts of vent-free gas products on indoor relative humidity. *Building and Environment*, 39, 10: 1179-1185
- Yurlova N. A., de Hoog G. S. 2002. Exopolysaccharides and capsules in human pathogenic *Exophiala* species. *Mycoses*, 45: 443-448

- Zalar P., de Hoog G. S., Schroers H-J., Crous P. W., Groenewald J. Z., Gunde-Cimerman N. 2007. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Studies in Mycology*, 58: 157-183
- Zalar P., Gunde-Cimerman N. 2008. Taksonomija in identifikacija gliv. Ljubljana, Scripta: 92 str.
- Zalar P., Novak M., de Hoog G. S., Gunde-Cimerman N. 2011. Dishwashers – a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Fungal Biology*, doi:10.1016/j.funbio.2011.04.007: 23 str. (v tisku)
- Zhang N., O'Donnell K., Sutton D. A., Nalim F. A., Summerbell R. C., Padhye A. A., Geiser D. M. 2006. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 2186-2190
- ZPS. 2009. Čistila za strojno pomivanje posode. Ljubljana, Zveza potrošnikov Slovenije: 1 str. <http://www.zps.si/okolje/nevarne-kemikalije/cistila-za-strojno-pomivanje-posode-3.html?Itemid=644> (marec 2011)

ZAHVALA

Zahvalila bi se mentorici prof. dr. Nini Gunde-Cimerman in somentorici doc. dr. Poloni Zalar, ki sta me uspešno vodili skozi eksperimentalni del in mi s svojim obsežnim znanjem pomagali izdelati diplomsko nalogo.

Recenzentki prof. dr. Ani Plemenitaš za recenzijo diplomske naloge.

Knjižničarki Lini Burkan Makivić za pregled diplomske naloge.

Osebjem na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Biotehniške fakultete v Ljubljani, ki so mi prijazno pomagali pri pripravi reagentov in gojišč.

Prof. dr. Damjani Drobne, Živi, Sari in Mateju, ki so mi pomagali pri preparaciji, opazovanju in fotografiranju vzorcev z uporabo vrstične elektronske mikroskopije.

Posebna zahvala velja vsem ljudem, ki so priskrbeli vzorce iz pomivalnih in pralnih strojev ter tako omogočili raziskavo. Ta zahvala velja študentom biologije in mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani ter profesorjem iz celega sveta.

Vsem, ki so me moralno in finančno podpirali med študijem.

Hvala.