UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETEA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Klemen OKETIČ

VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA INVAZIVNO RAST SEVOV KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae*

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON INVASIVE GROWTH OF *Saccharomyces cerevisiae* STRAINS

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

POPRAVKI

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za gensko tehnologijo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija živilske tehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Petra Rasporja, za somentorja dr. Jana Mavrija in za recenzenta doc. dr. Blaža Cigića.

Mentor: prof. dr. Peter Raspor

Somentor: dr. Jan Mavri

Recenzent: doc. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Polona Jamnik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Peter Raspor
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: dr. Jan Mavri
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Blaž Cigić
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora: 29.07.2009

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Klemen Oketič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.24+579.26:582.282.23(043)=163.6
KG mikrobiološka ekologija/rast mikroorganizmov/kvasovke/*Saccharomyces cerevisiae*/invazivnost kvasovk v gojišče/celokupni volumen rasti/invazivni volumen rasti/relativna invazivnost/okoljski dejavniki/temperatura rasti/pH/NaCl/K-sorbat/Na-benzoat/Na-bisulfit/CO_2/pomanjkanje vira ogljika
AV OKETIČ, Klemen
SA RASPOR, Peter (mentor)/MAVRI, Jan (somentor)/CIGIĆ, Blaž (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2009
IN VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA INVAZIVNO RAST SEVOV KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae*
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP XIV, 42 str., 2 pregl., 13 sl., 22 pril., 40 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V nalogi smo ugotavljali, kakšen vpliv imajo izbrani okoljski dejavniki na invazivno rast invazivnih (virulentnih) sevov in na rast neinvazivnih sevov *S. cerevisiae*. V ta namen smo uporabili test kvantitativne opredelitve invazivne rasti mikroorganizmov v trdno gojišče. Merili smo celokupne in invazivne volumne kolonij in izračunali relativno invazivnost. Med eksperimentalnim delom smo 10 različnih sevov izpostavili 11 eksperimentalnim pogojem rasti. Rezultati testov so pokazali, da so okoljski dejavniki: znižanje temperature rasti, dodatek Na-bisulfita v gojišče, povišana vsebnost CO_2 v atmosferi in pomanjkanje vira ogljika v gojišču vplivali na zmanjšanje celokupnih volumnov vseh sevov, ostali pogoji so imeli različen učinek na spremembo celokupnih volumnov sevov, kar se je odražalo kot povečanje ali zmanjšanje volumnov. Dodatek Na-bisulfita gojišču je popolnoma inhibiral invazivno rast vseh testiranih sevov, ostali pogoji rasti so imeli različne učinke na invazivni volumen testiranih sevov. Kjer je bila invazivna rast prisotna, se je - v primerjavi s standardnimi pogoji rasti - odražala kot povečanje ali zmanjšanje relativne invazivnosti, v nekaterih primerih pa je le-ta ostala nespremenjena. Kot smo pričakovali, sevi, ki veljajo za neinvazivne, v nobenem primeru niso rasli v gojišče. Najvišje relativne invazivnosti pri posameznih pogojih rasti so se izkazale pri sevih 56, YJM311 in YJM128.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.24+579.26:582.282.23(043)=163.6
CX microbal ecology/microorganism growth/yeasts/*Saccharomyces cerevisiae*/growth medium yeast invasiveness/ total volume/invasive volume/relative invasivness environmental factors/growth temperature/pH/NaCl/K-sorbate/Na-benzoate/Na-bisulfite/CO_2/carbon source depletion
AU OKETIČ, Klemen
AA RASPOR, Peter (supervisor)/MAVRI, Jan (co-advisor)/CIGIĆ, Blaž (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljani, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2009
TI INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON INVASIVE GROWTH OF *Saccharomyces cerevisiae* STRAINS
DT Graduation thesis (University studies)
NO XIV, 42 p., 2 tab., 13 fig., 22 ann., 40 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In the graduation thesis we determined the impact of selected environmental factors on the invasive growth of selected invasive (virulent) strains and on the growth of non-invasive strains of *S. cerevisiae*. We used the test for quantitative determination of invasive growth of microorganisms in solid medium. We measured the total volume and invasive volume of the colonies and calculated the relative invasion. During the experimental work, we exposed 10 different strains to 11 experimental growth conditions. Test results have shown that environmental factors: reduction in growth temperature, addition of Na-bisulphite to the medium, increased part of CO_2 in the atmosphere and the lack of carbon source in the medium influenced the reduction in total volumes of all the strains, the other conditions had variable effects on the change of total volumes strains, which was reflected as an increase or decrease in volumes. The addition of Na-bisulphite to the medium medium completely inhibited invasive growth of all tested strains, the other growth conditions had different effects on the volume of invasive strains tested. Where the invasive growth was present, it was - in comparison with the standard conditions of growth - reflected as an increase or decrease in the relative invasion, or in some cases, it remained unchanged. As expected, the strains considered as non-invasive, did not invade the medium in any case. The highest relative invasion at the individual conditions of growth were demonstrated in strains 56, YJM311 and YJM128.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD 1
1.1 DELOVNA HIPOTEZA IN CILJI NALOGE 1
2 PREGLED OBJAV 2
2.1 KVASOVKE 2
2.1.1 *Saccharomyces cerevisiae* 2
2.1.1.1 *S. cerevisiae* kot oportunistični patogeni mikroorganizem 3
2.1.2 Invazivnost kvasovke *S. cerevisiae* 3
2.1.2.1 Geni, ključni za invazivno rast 4
2.1.2.2 Signalne poti 5
2.1.2.3 Invazivna rast haploidnih celic 6
2.1.3 Okoljski dejavniki 7
2.1.3.1 Alkoholi 7
2.1.3.2 Pomanjkanje virov ogljika 7
2.1.3.3 Drugi faktorji, ki vplivajo na invazivno rast 8
2.1.4. Spremljanje invazivne rasti v gojiščih 8
2.1.4.1 Test invazivnosti v agarju 8
3 MATERIALI IN METODE 10
3.1 MATERIALI 10
3.1.1 Mikroorganizmi 10
3.1.2 Priprava gojišč 11
3.1.2.1 Gojišče YPD 11
3.1.2.2 Gojišča s spremenjenimi vrednostimi pH 11
3.1.2.3 Gojišča z dodatkom konzervansov 11
3.1.2.4 Gojišče YPD z znižano vrednostjo a_w 12
3.1.2.5 Gojišče SCLD 12
3.2.1 Potek dela 13
3.2.2 Pogoji kultivacije mikroorganizmov 14
3.2.3 Kvantitativni test invazije v agar (Zupan in Raspor, 2008) 14
3.2.3.1 Kultivacija sevov 15
3.2.3.2 Merjeneje volumnov kolonij 15
3.2.3.3 Kalibracija kvantitativnega testa invazije v agar 16
3.2.3.4 Določitev invazivnosti in relativne invazivnosti 16
3.2.4 Statistična obdelava podatkov 16
3.2.4.1 Povprečna vrednost 16
3.2.4.2 Standardni odklon, koeficient variacije 17
3.3 OPREMA 17
3.3.1 Steklovina in potrošni material 17
3.3.2 Aparature 17
4 REZULTATI 18
4.1 REZULTATI MERITEV VOLUMNOV KOLONIJ 18
4.1.1 Volumni kolonij kvasovk inkubiranih pri 30 °C na gojišču YPD 19
4.1.2 Volumni kolonij kvasovk inkubiranih pri 26 °C na gojišču YPD 20
4.1.3 Volumni kolonij kvasovk inkubiranih pri 37 °C na gojišču YPD 21
4.1.4 Volumni kolonij kvasovk inkubiranih na gojišču YPD s pH4 22
4.1.5 Volumni kolonij kvasovk inkubiranih na gojišču YPD s pH8 23

4.1.6 Volumni kolonij kvasovk inkubiranih na gojišču YPD z 0,1 % dodatkom NaCl ... 24
4.1.7 Volumni kolonij kvasovk inkubiranih na gojišču YPD z 0,01 % K-sorbatom ... 25
4.1.8 Volumni kolonij kvasovk inkubiranih na gojišču YPD z 0,1 % Na-benzoatom ... 26
4.1.9 Volumni kolonij kvasovk inkubiranih na gojišču YPD z 0,1 % Na-bisulfitom ... 27
4.1.10 Volumni kolonij kvasovk inkubiranih na gojišču YPD, atmosfera s 15 % CO_2 ... 28
4.1.11 Volumni kolonij kvasovk inkubiranih na gojišču SCLD ... 29
5 RAZPRAVA IN SKLEPI ... 30
5.1 RAZPRAVA ... 30
5.1.1 Vpliv temperature na invazivno rast kvasovk ... 30
5.1.2 Vpliv pH na invazivno rast kvasovk ... 31
5.1.3 Vpliv NaCl na invazivno rast kvasovk ... 32
5.1.4 Vpliv v gojišču prisotnih konzervansov na invazivno rast kvasovk ... 33
5.1.5 Vpliv CO_2 na invazivno rast kvasovk ... 34
5.1.6 Vpliv pomanjkanja hranil v gojišču na invazivno rast kvasovk ... 35
5.1.7 Relativna invazivnost izstopajočih sevov ... 36
5.2 SKLEPI ... 37
6 POVZETEK ... 38
7 VIRI ... 39
ZAHVALA
PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sevi kvasovk uporabljeni v diplomski nalogi in njihov virulentni potencial (Zupan in Raspor, 2008). 10

Preglednica 2: Relativne invazivnosti sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309) in manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) pri vseh 11 testiranih pogojih rasti. 36

Deleted: 37

KAZALO SLIK

Slika 1: Življenjski cikel *S. cerevisiae*.. 4

Slika 2: Hodogram poskusa 13

Slika 3: Relativna invazivnost in celokupni ter invazivni volumni kolonij sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309), manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) in neinvazivne (ZIM2273, YJM222, S288c) inkubiranih pri standardnih pogojih rasti (4 dni pri 30 °C na gojišču YPD). 19

Slika 4: Relativna invazivnost in celokupni ter invazivni volumni kolonij sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309), manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) in neinvazivne (ZIM2273, YJM222, S288c) inkubiranih 4 dni pri 26 °C na gojišču YPD v primerjavi z istimi sevi inkubiranimi pri standardnih pogojih rasti (4 dni pri 30 °C na gojišču YPD). 20

Slika 5: Relativna invazivnost in celokupni ter invazivni volumni kolonij sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309), manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) in neinvazivne (ZIM2273, YJM222, S288c) inkubiranih 4 dni pri 37 °C na gojišču YPD v primerjavi z istimi sevi inkubiranimi pri standardnih pogojih rasti (4 dni pri 30 °C na gojišču YPD). 21

Slika 6: Relativna invazivnost in celokupni ter invazivni volumni kolonij sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309), manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) in neinvazivne (ZIM2273, YJM222, S288c) inkubiranih 4 dni pri 30 °C na gojišču YPD s pH 4 v primerjavi z istimi sevi inkubiranimi pri standardnih pogojih rasti (4 dni pri 30 °C na gojišču YPD)..... 22

Slika 7: Relativna invazivnost in celokupni ter invazivni volumni kolonij sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309), manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) in neinvazivne (ZIM2273, YJM222, S288c) inkubiranih 4 dni pri 30 °C na gojišču YPD s pH 8 v primerjavi z istimi sevi inkubiranimi pri standardnih pogojih rasti (4 dni pri 30 °C na gojišču YPD)..... 23

Slika 8: Relativna invazivnost in celokupni ter invazivni volumni kolonij sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309), manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) in neinvazivne (ZIM2273, YJM222, S288c) inkubiranih 4 dni pri 30 °C na gojišču YPD z 0,1 % dodatkom NaCl v primerjavi z istimi sevi inkubiranimi pri standardnih pogojih rasti (4 dni pri 30 °C na gojišču YPD). 24

Slika 9: Relativna invazivnost in celokupni ter invazivni volumni kolonij sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309), manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) in neinvazivne (ZIM2273, YJM222, S288c) inkubiranih 4 dni pri 30 °C na gojišču YPD z 0,01 % dodatkom K-sorbata v primerjavi z istimi sevi inkubiranimi pri standardnih pogojih rasti (4 dni pri 30 °C na gojišču YPD). 25

Deleted: 12

Slika 10: Relativna invazivnost in celokupni ter invazivni volumni kolonij sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309), manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) in neinvazivne (ZIM2273, YJM222, S288c) inkubiranih 4 dni pri 30 °C na gojišču YPD z 0,1 % dodatkom Na-benzoata v primerjavi z istimi sevi inkubiranimi pri standardnih pogojih rasti (4 dni pri 30 °C na gojišču YPD). 26

Slika 11: Relativna invazivnost in celokupni ter invazivni volumni kolonij sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309), manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) in neinvazivne (ZIM2273, YJM222, S288c) inkubiranih 4 dni pri 30 °C na gojišču YPD z 0,1 % dodatkom Na-bisulfita v primerjavi z istimi sevi inkubiranimi pri standardnih pogojih rasti (4 dni pri 30 °C na gojišču YPD). 27

Slika 12: Relativna invazivnost in celokupni ter invazivni volumni kolonij sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309), manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) in neinvazivne (ZIM2273, YJM222, S288c) inkubiranih 4 dni pri 30 °C na gojišču YPD v atmosferi s 15 % CO_2 v primerjavi z istimi sevi inkubiranimi pri standardnih pogojih rasti (4 dni pri 30 °C na gojišču YPD). 28

Slika 13: Relativna invazivnost in celokupni ter invazivni volumni kolonij sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309), manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) in neinvazivne (ZIM2273, YJM222, S288c) inkubiranih 4 dni pri 30 °C na gojišču SCLD v primerjavi z istimi sevi inkubiranimi pri standardnih pogojih rasti (4 dni pri 30 °C na gojišču YPD). 29

KAZALO PRILOG

Priloga A: Podatki o volumnu, standardni deviaciji, koeficientu variacije in relativni invazivnosti za kvasovke na gojišču YPD, inkubacija pri 30 °C.

Priloga B: Podatki o volumnu, standardni deviaciji, koeficientu variacije in relativni invazivnosti za kvasovke na gojišču YPD, inkubacija pri 26 °C.

Priloga C: Podatki o volumnu, standardni deviaciji, koeficientu variacije in relativni invazivnosti za kvasovke na gojišču YPD, inkubacija pri 37 °C.

Priloga D: Podatki o volumnu, standardni deviaciji, koeficientu variacije in relativni invazivnosti za kvasovke na gojišču YPD s pH 4.

Priloga E: Podatki o volumnu, standardni deviaciji, koeficientu variacije in relativni invazivnosti za kvasovke na gojišču YPD s pH 8.

Priloga F: Podatki o volumnu, standardni deviaciji, koeficientu variacije in relativni invazivnosti za kvasovke na gojišču YPD z nizko a_w vrednostjo (0,1 % dodatek NaCl).

Priloga G: Podatki o volumnu, standardni deviaciji, koeficientu variacije in relativni invazivnosti za kvasovke na gojišču YPD z 0,01 % K-sorbatom.

Priloga H: Podatki o volumnu, standardni deviaciji, koeficientu variacije in relativni invazivnosti za kvasovke na gojišču YPD z 0,1 % Na-benzoatom.

Priloga I: Podatki o volumnu, standardni deviaciji, koeficientu variacije in relativni invazivnosti za kvasovke na gojišču YPD z 0,1 % Na-bisulfitom.

Priloga J: Podatki o volumnu, standardni deviaciji, koeficientu variacije in relativni invazivnosti za kvasovke na gojišču YPD, atmosfera s 15 % CO_2.

Priloga K: Podatki o volumnu, standardni deviaciji, koeficientu variacije in relativni invazivnosti za kvasovke na gojišču SCLD.

Priloga L: Fotografije petrijevk s kolonijami kvasovk na gojišču YPD, inkubacija pri 30 °C, pred spiranjem (levo) in po spiranju (desno). Primer seva YJM128.

Priloga M: Fotografije petrijevk s kolonijami kvasovk na gojišču YPD, inkubacija pri 26 °C, pred spiranjem (levo) in po spiranju (desno). Primer seva YJM128.

Priloga N: Fotografije petrijevk s kolonijami kvasovk na gojišču YPD, inkubacija pri 27 °C, pred spiranjem (levo) in po spiranju (desno). Primer seva YJM128.

Priloga O: Fotografije petrijevk s kolonijami kvasovk na gojišču YPD s pH 4, pred spiranjem (levo) in po spiranju (desno). Primer seva YJM128.

Priloga P: Fotografije petrijevk s kolonijami kvasovk na gojišču YPD s pH 8, pred spiranjem (levo) in po spiranju (desno). Primer seva YJM128.

Priloga Q: Fotografije petrijevk s kolonijami kvasovk na gojišču YPD z nizko a_w vrednostjo (0,1 % dodatek NaCl), pred spiranjem (levo) in po spiranju (desno). Primer seva YJM128.

Priloga R: Fotografije petrijevk s kolonijami kvasovk na gojišču YPD z 0,01 % K-sorbatom, pred spiranjem (levo) in po spiranju (desno). Primer seva YJM128.

Priloga S: Fotografije petrijevk s kolonijami kvasovk na gojišču YPD z 0,1 % Na-benzoatom, pred spiranjem (levo) in po spiranju (desno). Primer seva YJM128.

Priloga T: Fotografije petrijevk s kolonijami kvasovk na gojišču YPD z 0,1 % Na-bisulfitom, pred spiranjem (levo) in po spiranju (desno). Primer seva YJM128.

Priloga U: Fotografije petrijevk s kolonijami kvasovk na gojišču YPD, atmosfera s 15 % CO_2, pred spiranjem (levo) in po spiranju (desno). Primer seva YJM128.

Priloga V: Fotografije petrijevk s kolonijami kvasovk na gojišču SCLD, pred spiranjem (levo) in po spiranju (desno). Primer seva YJM128.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

a_w	vodna aktivnost
cAMP-PKA	signalna pot, od cikličnega adenozin monofosfata odvisna protein kinaza A
FLO	družina genov, ki v kvasnih celicah kodira proteine flokuline
FLO1	gen iz družine FLO
FLO5	gen iz družine FLO
FLO11	gen iz družine FLO
Flo11p	protein, transkripcijski produkt gena FLO11
MAPK	signalna pot, mitogen aktivirana protein kinaza
$N_{T,I}$	normalizirane vrednosti volumnov
PD	gojišče brez dodatka kvasnega ekstrakta (peptone dextrose)
PGU1	gen, ki kodira endopoligalakturonazo
Ras2p	protein, aktivator signalnih poti cAMP-PKA in MAPK
Ras-cAMP	dejavnik protein kinaza signalne kaskadne poti
RI	relativna invazivnost
SCLD	sintetično gojišče z majhno vsebnostjo virov ogljika (synthetic complete low dextrose agar)
STE12	gen, ki kodira transkripcijski aktivator
Ste12p	protein, transkripcijski aktivator
V_I	invazivni volumen kolonij – po spiranjem
$V_{ST,\,i}$	standardni volumni
V_T	celokupen volumen kolonij – pred spiranjem
X_S	volumen standardizirane površine
$X_{T,I}$	prirejeni volumni kolonij
YD	gojišče brez dodatka peptona (yeast dextrose)
YNB	kvasna dušična baza (yeast nitrogen base)
YP	gojišče brez dodatka glukoze (yeast peptone)
YPD	hranljivo gojišče za rast kvasovk (yeast peptone dextrose)
ZIM	zbirka industrijskih mikroorganizmov

SLOVARČEK

Invazivnost	zmožnost patogenih mikroorganizmov, da se širijo skozi tkivo gostitelja; stopnja invazivnosti kaže, da so pri tem varstveni mehanizmi gostitelja sorazmerno nepomembni (Likar, 1987).
Virulenca	zmožnost patogenega mikroorganizma, da povzroči bolezen, kar se na splošno kaže po teži bolezenskih znamenj: močno virulenten mikrob povzroči hujša bolezenska znamenja kot manj virulenten. (Likar, 1987).
Relativna invazivnost	razmerje med invazivnim volumnom kolonij po spiranju in celokupnim volumnom kolonij pred spiranjem, daje nam podatek o preferenci rasti seva v določen del gojišča.

1 UVOD

Kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* človeku že tisočletja koristijo pri proizvodnji številnih fermentiranih živil. Ta vrsta je tudi splošno priznana kot varen organizem. Kljub temu pa obstaja možnost infekcij s kvasovko. Naraščajoča incidenca infekcij se odraža pri posameznikih z oslabljenim imunskim sistemom. Nekateri sevi kvasovk *S. cerevisiae* iz kliničnih vzorcev lahko zaradi invazivne rasti mikroorganizma in oslabljenega imunskega sistema bolnikov le-te okužijo, ter povzročijo širjenje iz lokalne v resnejšo sistemsko okužbo, zato lahko uvrščamo *S. cerevisiae* med oportunistične patogene.

Invazivna rast kvasovk je značilna oblika rasti celic, ki se odraža v primeru patogeneze kot tudi na številnih drugih substratih vključno v humani prehranski verigi. Taka rast predstavlja odziv in prilagoditev na pogoje, ki za kvasovke predstavljajo stres. Celice preidejo iz karakterističnega vzorca multipolarnega brstenja v unipolarno brstenje, začnejo lahko tvoriti psevdohife, ki spominjajo na hife plesni v trdnem gojišču. Čeprav te niso nujne za invazivno rast pa na ta način kvasovke v koloniji iščejo ali sledijo viru omejujočega hranila ali pa poskušajo doseči dele gojišča brez inhibitornih snovi. Na invazivnost imajo vpliv različni parametri na katere se kvasovke odzivajo specifično. V diplomski nalogi smo raziskovali, kako na rast kvasovk *S. cerevisiae* vplivajo različni dejavniki: temperatura rasti, pH vrednost gojišča, nizka a_w vrednost gojišča, pomanjkanje vira ogljika v gojišču, vpliv prisotnosti različnih konzervansov v gojišču in vpliv atmosfere z večjim deležem CO_2.

Nadaljnje raziskave mehanizmov invazivne rasti in vpliva različnih okoljskih dejavnikov nanje so pomembne zaradi identifikacije virulentnih faktorjev in z vidika razvoja orodji za identifikacijo potencialno patogenih sevov *S. cerevisiae*.

1.1 DELOVNA HIPOTEZA IN CILJI NALOGE

Delovna hipoteza:
Izbrani okoljski dejavniki imajo različen vpliv na invazivno rast invazivnih (virulentnih) sevov kot tudi na rast neinvazivnih sevov *S. cerevisiae*.

Cilji naloge:
V nalogi želimo kvantitativno ovrednotiti vpliv nekaterih okoljskih dejavnikov na invazivno rast skupine invazivnih sevov kvasovk. Preverili bomo vpliv intrinzičnih faktorjev - vpliv vira ogljika, razmerja CO_2/O_2 v atmosferi, vpliv konzervansov oz. ekstrinzičnih faktorjev - temperature, pH, a_w vrednosti gojišča, ki nastopajo v okolju mikroorganizma. V ta namen bomo uporabili "kvantitativni test invazivnosti na agarju" (Zupan in Raspor, 2008), ki omogoča kvantitativno opredelitev invazivne rasti v trdno gojišče.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KVASOVKE

Kvasovke vrste *S. cerevisiae* so enocelični mikroorganizmi iz kraljestva gliv, ki se razmnožujejo z brstenjem. Vegetativno se razmnožujejo z multipolarnim brstenjem. Celice so okrogle, elipsoidne ali cilindrične oblike. Formirajo lahko psevdohife, ne pa tudi septiranih hif. Vegetativna faza je pretežno diploidna, konjugacija poteče med germinacijo askospor ali kmalu po tem; formirajo lahko diploidne askospore. Askospore so okrogle ali kratke elipsoidne oblike, z gladko steno, navadno se v askusu nahaja ena do štiri askospore. *S. cerevisiae* fermentira sladkorje, ne proizvaja škrobu podobnih produktov. Kvasovke ne rastejo na gojišču z nitratom kot edinim virom dušika (Yarrow, 1984, cit. po Vaughan – Martini A. in Martini A., 1998).

Velikost kvasnih celic široko variira glede na vrsto in pogoje rasti. Nekatere celice so dolge 2 – 3 µm, medtem, ko lahko druge dosežejo dolžino 20 – 50 µm. Širina celic je manj variabilna in znaša 1 – 10 µm. Celice so različnih oblik, prav tako kolonije, ki jih tvorijo, te so tudi različnih barv: krem, bele, črne, rdeče, oranžne in rumene. Izolirati jih je mogoče iz vzorcev zemlje, vode in zraka, najpogostejši habitat kvasovk so rastlinska tkiva, določene vrste pa se pojavljajo v komenzalnem ali parazitskem razmerju z živalmi (Walker, 2000).

Kvasne celice potrebujejo za rast makrohranila v milimolarnih količinah (vir ogljika, dušika, kisika, žvepla, fosforja, kalija in magnezija), elemente v sledovih v mikromolarnih količinah (npr. Ca, Cu, Fe, Mn, Zn) ter rastne faktorje. Ti faktorji so organske spojine, ki jih celice potrebujejo v zelo majhnih koncentracijah za specifične katalitične in strukturne potrebe, vendar jih ne uporabijo kot vire energije. Večina laboratorijskih in industrijskih kvasovk (npr. sevi *S. cerevisiae*) najbolje rase pri 20 °C do 30 °C. Najvišja temperatura za rast kvasovk je okrog 50 °C. Dobro uspevajo pri pH med 4,5 in 6,5 (Walker, 2000).

Kot kemoorganotrofni organizmi pridobijo kvasovke ogljik in energijo v obliki organskih spojin. Izkoriščajo lahko širok spekter sladkorjev. Molekularnega dušika ne morejo fiksirati, lahko pa izkoriščajo enostavne anorganske vire dušika kot so amonijeve soli (Walker, 2000).

2.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Najbolj raziskana in najpogosteje uporabljena vrsta kvasovk je *S. cerevisiae*, za katero se navadno uporablja izraz pekovska kvasovka (pekovski kvas). Kvasovka pripada deblu (Phylum) Ascomycotina znotraj kraljestva gliv. Ta vrsta se razmnožuje nespolno z brstenjem in spolno s konjugacijo celic nasprotnih tipov. Pekovska ali pivska kvasovka se zelo pogosto uporablja v prehranski in fermentacijski industriji, izkorišča se tudi v moderni biotehnologiji (npr. pri proizvodnji rekombinantnih proteinov) in kot modelna evkariontska celica v temeljnih bioloških raziskavah (Walker, 2000).

S. cerevisiae skozi tradicionalno uporabo pri pripravi živil spremlja človeško kulturo že tisočletja. Poleg tega vzgajamo seve še mnoga desetletja po tem, ko je leta 1883 Emil

Christian Hansen prvi izoliral čisto kulturo kvasovk in je takrat izkazovala dimorfizem (Liu in sod., 1996).

2.1.1.1 *S. cerevisiae* kot oportunistični patogeni mikroorganizem

Kvasovka *S. cerevisiae* je bila izbrana kot modelni organizem za raziskovanje adhezije celica – substrat in celica – celica. Adhezija kvasovke na človeška tkiva in plastične površine je pomembna s stališča medicine, saj predstavlja začetne korake pri vzpostavljanju patogene interakcije gliva – gostitelj, to pa za glivo lahko pomeni dostop do notranjih organov (Fichtner in sod., 2007). Interakcija kvasne celice s površino, ki je lahko ključ do virulence v odnosu gostitelj – patogen, je primarno rezultat raznolikega izražanja genov za površinske proteine. Kot dodatno stopnjo adaptacije na določeno okolje si lahko zamislimo stohastične procese, ki se odražajo v pestri ekspresiji površinskih proteinov pri na splošno homogeni populaciji (Halme in sod., 2004).

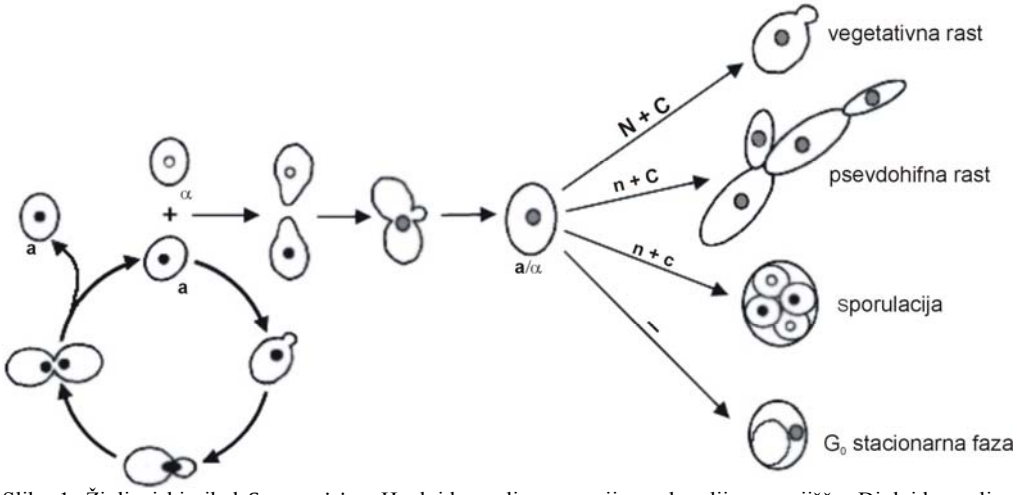
S. cerevisiae predstavlja kvasovko z znatno manj kompleksnim naborom različnih površinskih proteinov v primerjavi s kvasovkami iz rodu *Candida*. Ne glede na to, pa omejeno število genov za flokuline kvasovki *S. cerevisiae* omogoča dovolj velik potencial za povzročitev znatnega vpliva na različne habitate. Eden izmed takih primerov je izbruh fungemie, ki jo je povzročila ta kvasovka med pacienti na intenzivni negi (Cassone in sod., 2003). Kvasovka je navadno obravnavana kot občasni komenzal v prebavilu. Vendar pa od devetdesetih let 20. stoletja narašča število poročil s sklepom o kvasovki kot etiološkem agentu invazivne infekcije. V določenih oblikah take infekcije povezujejo s probiotičnim preparatom, ki vsebuje *S. boulardii* (podtip *S. cerevisiae*) in se uporablja za tretiranje diareje. Kvasovke iz rodu Saccharomyces se v poročilih vse pogosteje pojavljajo kot agenti invazivne infekcije, posebej pri pacientih z oslabljenim imunskim sistemom in kritično bolnih pacientih. Posebno skrb velja nameniti preparatom, ki vsebujejo *S. boulardii* (Enache-Angoulvan in Hennequin, 2005).

2.1.2 Invazivnost kvasovke *S. cerevisiae*

Dobro znani pekovski ali pivski kvas navadno rase kot posamezne brsteče celice; Pasteur jih je opisal kot globuli. Ne glede na stara opažanja rasti *S. cerevisiae* v filamentozni obliki (Guilliermond, 1920) je dejstvo, da je večina laboratorijskih sevov raslo le v enocelični obliki (Kron, 1997) vzrok, da je dimorfizem zaslužil večjo pozornost šele v zadnjih desetletjih. Leta 1992 je bil objavljen podatek o diploidnem sevu kvasovke *S. cerevisiae*, ki je formiral psevdohife zaradi pomanjkanja dušika v gojišču, kar je vodilo v filamentozno rast (Gimeno in sod., 1992). Pri nastajanju psevdohif se kvasne celice podaljšajo, brstenje se odvija sinhrono na unipolarni način. Hčerinske celice se ne odcepijo, nastanejo verige celic, ki se imenujejo psevdohife (Roberts in Fink, 1994).

Mnogo predstavnikov kraljestva gliv ima značilno lastnost, dimorfizem, to je zmožnost spreminjanja morfološke oblike iz enocelične kvasne oblike v večcelično filamentozno obliko. Pri reguliranju tranzicije med tema morfološkima oblikama brsteče kvasovke *S. cerevisiae* so prisotne vsaj tri regulacijske poti. Pojavljajo se dokazi o homolognih signalnih poteh, ki so vključene v regulacijo formacije filamentoznih struktur in virulence v vrsti humanih in rastlinskih patogenov iz kraljestva gliv. Iste komponente, ki se

uporabljajo pri signaliziranju spolne diferenciacije kot odgovor na paritvene feromone, so pogosto uporabljene pri regulaciji dimorfnega razvoja, kar nakazuje na povezavo med procesoma (Madhani in Fink, 1998).



Slika 1: Življenjski cikel *S. cerevisiae*. Haploidne celice se parijo na hranljivem gojišču. Diploidne celice zavzamejo različne poti nadaljnjega razvoja, glede na hranila, ki so na voljo. N + C, zadostna količina dušika in fermentabilnega vira ogljika; n + C pomanjkanje dušika in zadostna količina fermentabilnega vira ogljika; n +c pomanjkanje dušika in fermentabilnega vira ogljika; - brez hranil (Lengeler in sod., 2000).

2.1.2.1 Geni, ključni za invazivno rast

Gen FLO11 kodira protein celične stene, ki je ključnega pomena za invazivno rast kvasovk in za formacijo psevdohif. FLO11 kodira flokulin, ki je na površini celice. Flokulin ima strukturo podobno proteinom iz razreda proteinov kvasne celične stene, v katero so zasidrani z glikozilfosfatidilinozitolom in bogati s serinom / treoninom (Lo in Dranginis, 1998).

Pri posameznih kvasnih celicah, ki ne razvijejo psevdohif, povzroči ekspresija gena FLO11 tip adhezije celica – celica, ki je odvisna od kalcija in ji rečemo flokulacija. FLO11 je identičen MUC1 genu, za katerega kaže, da je potreben pri formaciji psevdohif kvasovke *S. cerevisiae var. diastaticus*, ki izloča amilazo (Lambrecht in sod., 1996). Flokulacija je definirana kot aseksualna, reverzibilna, od kalcija odvisna agregacija kvasnih celic, ki formirajo flokule. Ti vsebujejo veliko število celic, ki se v tekočem rastnem substratu hitro usedejo na dno (Bony in sod., 1997; Stratford, 1989).

Vsi Flo11 proteini so glikoproteini vezani preko glikozilfosfatidilinozitola. Vsem tem proteinom je skupna osnovna struktura iz treh domen: centralna domena, ki jo gradijo velikokrat ponovljene sekvence bogate s serinom in treoninom; lecitinska domena z N koncem in domena, ki vsebuje glikozilfosfatidilinozitol sidriščno sekvenco s karboksilnim koncem (Verstrepen in Klis, 2006).

Pri kvasovkah, ki brstijo je Flo11p vključen v širok repertoar fenotipskih variacij, ki so vključene v adaptacijo na neugodne pogoje. Te variacije so flokulacija, filamentacija,

invazivna rast in pritrjevanje na trdno podlago. Osrednja vloga , ki jo adhezin Flo11p igra kot odgovor na okoljske spremembe verjetno pojasnjuje kompleksnost same regulacije (Fidalgo in sod., 2006).

Adhezini igrajo osrednjo vlogo pri celičnem odgovoru evkariontskih mikroorganizmov na okolje njihovega gostitelja. Pri patogenih organizmih, kot so *Candida spp*. in drugih glivah so adhezini odgovorni za pritrditev na tkiva sesalcev, pri *Saccharomyces spp*. pa so odgovorni še za pritrjevanje na trdno podlago in druge kvasne celice. Analize FLO11, gena, ki je najpomembnejši adhezin identificiran v *S. cerevisiae*, so pokazale kompleksne mehanizme, ki vključujejo tako genetsko kot epigenetsko regulacijo in nadzorujejo ekspresijo tega ključnega gena (Barrales in sod., 2007). Proteini vključeni v adhezijski fenotip so združeni v družine, ki jim rečemo adhezini. V *S. cerevisiae* na primer, jih predstavlja družina FLO (Guo in sod., 2000).

Zgleda, da so specifične adhezivne lastnosti celic primarno definirane z lastnostmi specifičnih flokulinov in ne s splošnimi lastnostmi celične stene, kot je na primer hidrofobnost. Vsak FLO gen vodi do specifičnih fenotipov in intenzitete fenotipov; FLO1 in FLO5 se odražata v agregaciji celic in flokulaciji, medtem, ko ekspresija FLO11 vodi do invazivne rasti. Čas izražanja in intenziteta fenotipa so popolnoma odvisni od regulacije transkripcije posameznega FLO gena (Govender in sod., 2008).

Gen FLO11 regulira transkripcijski aktivator Ste12p. Sevi z delecijo STE12 ne izražajo FLO11 RNK. Ekspresija FLO11 na plazmidu z velikim številom kopij preseže nesposobnost invazije v agar pri sevu z delecijo STE12, kar kaže, da je aktivacija FLO11 primarni mehanizem preko katerega transkripcijski aktivator Ste12p promovira invazivnost. Verjetno je, da so adhezija, invazivnost in filamentozna funkcija FLO11 povezani. Ena izmed hipotez pravi, da je FLO11 odgovoren za adhezijo materinske in hčerinske celice v filamentozni verigi celic v psevdohifi. Adhezivnim lastnostim Flo11p lahko prištejemo ključno vlogo v invazivnosti. Adhezivnost na substrat lahko igra vlogo v mehanizmu invazivnosti, lahko pa adhezija celica – celica zagotovi stabilen filament celic in omogoči, da nadaljnja delitev celic nadaljuje invazivnost (Lo in Dranginis, 1998).

2.1.2.2 Signalne poti

Ekspresijo gena FLO11 kontrolirajo okoljski dejavniki in nekatere signalne kaskadne poti: med drugim tudi kinaza kompleks odvisen od Ras-cAMP; mitogen aktivirana proteinska kinaza, ki nadzira filamentozno rast in glavna pot za represijo glukoze, ki so bile neposredno povezane z regulacijo FLO11 (Verstrepen in Klis, 2006).

Signalne transdukcijske poti se med seboj prepletajo in igrajo osrednjo vlogo pri regulaciji celičnih dogodkov. Prepletanje signalnih poti vnaša kompleksnost v sistem, sistematična analiza teh prepletov pomaga pri iskanju povezav med strukturo omrežja signalnih poti in njihovo funkcijo. Signalni poti cAMP-PKA (od cikličnega adenozin monofosfata odvisna protein kinaza A) in MAPK (mitogen aktivirana proteinska kinaza) sta vključeni v regulacijo FLO11 gena, ki je potreben za psevdohifno rast pri *S. cverevisiae*. Ti dve signalni poti se prepletata pri isti tarči to je FLO11 in preko Ras2p, slednji je aktivator obeh, cAMP in MAP kinaza signalnih poti. Analize prepleta signalnih poti na nivoju genov

so pokazale, da sta cAMP-PKA in MAP kinaza signalni poti nepogrešljivi za ekspresijo gena FLO11 (Sengupta in sod., 2007). Regulacijska mreža signalnih poti, ki posreduje pri ekspresiji FLO11 vključuje omenjeni vzporedni signalni poti. Prva signalna pot vključuje MAP kinazno kaskado, ki pozitivno regulira transkripcijska aktivatorja FLO11: Ste12p in Tec1p (Jansen in sod., 2001). Druga signalna pot, vključena v ekspresijo FLO11, je cAMP-PKA, ki pozitivno regulira transkripcijski aktivator Flo8p (Gagiano in sod., 2002).

Sengupta in sod. so uporabili modeliranje za kvantifikacijo frakcionalne ekspresije FLO11 gena pri različnih aktivacijskih nivojih signalnih poti cAMP-PKA in MAP kinaza. Analiza je pokazala, da je ekspresija FLO11 bolj občutljiva na cAMP-PKA signalno pot, kot pa na MAP kinaza signalno pot. Poleg višje občutljivosti, ki jo izkazuje cAMP-PKA, je analiza pokazala, da aktivacijski nivo cAMP-PKA signalne poti primarno nadzira generalno ekspresijo FLO11. Analiza pa je pokazala tudi, da je pri nižjih aktivacijskih nivojih MAP kinaza signalne poti ekspresija FLO11 omejena na stopnjo nižjo od 20 %, kar kaže na to, da je MAP kinaza signalna pot nepogrešljiva za ekspresijo FLO11 (Sengupta in sod., 2007).

2.1.2.3 Invazivna rast haploidnih celic

Psevdohifna rast je fiziološki odgovor kvasovk, ne le na stradanje, temveč tudi na stresne okoliščine. Zgleda, da je za odziv potrebno koordinirano delovanje kaskade MAP kinaze in od cAMP odvisne signalne poti (Zaragoza in Gancedo, 2000).

Nastanek psevdohif se v diploidnih celicah pojavlja kot odgovor na prisotnost zadostnega vira fermentabilnega ogljika in omejenega vira dušika. Sorodni morfološki proces, kot pri diploidnih celicah, je bil opisan tudi pri haploidnih celicah in si deli nekaj lastnosti z diploidno psevdohifno rastjo (Roberts in Fink, 1994).

Izkazalo se je, da med drugim tudi feromoni regulirajo invazivno in filamentozno rast *S. cerevisiae*. Divji sevi *S. cerevisiae* so v naravi v glavnem diploidni. Haploidno stanje življenjskega cikla predstavljajo gamete, ki so v naravi kratkožive. Pri haploidnih kvasnih celicah se je razvil vzorec aksialnega brstenja, za katerega menijo, da promovira hitrejše parjenje in diploidizacijo, ki sledi mejozi. Kaže, da je glavna aktivnost haploidnih kvasnih sevov lokaliziranje celic nasprotnega tipa. Študije so pokazale, da feromoni inducirajo nekatere gene, za katere je znano, da so aktivni med filamentozno rastjo - med drugim tudi gen PGU1, ki kodira hidrolitični encim (Madhani in sod., 1999; Roberts in sod., 2000). Že nizke koncentracije feromonov spodbujajo invazivno rast v agarju (Roberts in sod., 2000). To kaže, da bi lahko bila invazivna rast haploidnih celic mehanizem, s katerim kvasne celice na daljavo locirajo partnerje med parjenjem. Znano je, da se kvasne celice odzivajo na gradient feromonov. Med invazivno rastjo se haploidne celice podaljšajo in spremenijo vzorec brstenja iz aksialnega v bipolarno in unipolarno brstenje ter prodirajo v agar (Roberts in sod., 2000; Roberts in Fink, 1994).

Ko kvasne celice izčrpajo hranila v mediju, se začne zaradi potrebe po dušiku katabolizem celičnih proteinov in aminokislin. Pri tem nastajajo kot derivati aminokislin tudi kratkoverižni alkoholi, ki jim rečemo patočna olja. Izkazalo se je, da nekateri kratkoverižni

alkoholi, med drugim izoamil alkohol in butanol, močno stimulirajo psevdohifno diferenciacijo haploidnih kvasnih sevov (Dickinson, 1996; Lorenz in sod., 2000).

2.1.3 Okoljski dejavniki

2.1.3.1 Alkoholi

Mnogi alkoholi lahko inducirajo morfološke spremembe v kvasovkah. Čeprav je etanol primarni fermentacijski produkt *S. cerevisiae*, pa kvasovke proizvajajo tudi vrsto drugih alkoholov, večinoma gre za produkte metabolizma aminokislin. Ti alkoholi vključujejo spojine, kot so izoamil in izobutil alkoholi, ki se sintetizirajo v pogojih stradanja, ko gre za pomanjkanje dušika. Dickinson (Dickinson, 1994; Dickinson, 1996) je pokazal, da pri *S. cerevisiae* številni tovrstni alkoholi stimulirajo podaljšanje celic in spremenjeno morfologijo celic. Pri pomanjkanju dušika v rastnem mediju lahko tudi levcin, prekurzor za izoamil alkohol, inducira podaljšanje celic (Dickinson, 1994).

V raziskavi je bila ugotovljena povezava med psevdohifno rastjo in morfološkimi spremembami, ki jih inducirajo alkoholi. Več alkoholov, posebej izoamil alkohol in butanol, promovira filamentozno rast na trdnem gojišču in podaljšano ter filamentozno obliko v tekočem gojišču. Butanol inducira podaljšanje celic in spremembe v vzorcu brstenja, kar vodi v spremembo morfologije in formacijo psevdohif. Najbolj očitne spremembe so opazne pri haploidnih celicah, pri katerih je filamentacija navadno zavrta. Tudi etanol, najpomembnejši alkohol, ki ga proizvajajo kvasovke, spodbuja filamentozno rast v diploidnih celicah. Rezultati nakazujejo, da kvasne celice lahko zaznavajo pri reguliranju diferenciacije kombinacijo omejitve hranil in stranskih produktov metabolizma (Lorenz in sod., 2000).

2.1.3.2 Pomanjkanje virov ogljika

V raziskavah je bilo pokazano, da povzroča pri haploidnih kvasovkah pomanjkanje hranil invazivno rast (Roberts in Fink, 1994). Ugotovljeno je bilo tudi, da odstranitev glukoze iz YPD gojišča (YP gojišče) prav tako povzroča invazivno rast haploidnih kvasovk. V prvih 16 urah rasti na YP gojišču je bila opažena znatna invazivna rast, tudi v primerjavi s kvasovkami, ki so 48 ur rasle na YPD gojišču. Pri mikroskopiranju so se pokazale filamentozne strukture na YP gojišču že ob prvi delitvi celic. Dodatek glukoze ali drugega fermentabilnega sladkorja (fruktoza ali manoza) YP mediju je preprečil invazivno rast. Odstranitev drugih komponent iz gojišča, kot na primer kvasnega ekstrakta (PD) ali peptona (YD), ni v prisotnosti glukoze povzročilo invazivne rasti kvasovk (Cullen in Sprague, 2000).

Neposredna opazovanja celic v prisotnosti in odsotnosti glukoze so razkrila značilno prehajanje iz vegetativne rasti celic v filamentozno morfologijo, kar je bilo očitno že po prvi celični delitvi. Invazivno rast lahko specifično povzroči pomanjkanje fermentabilnih sladkorjev kot je glukoza. Poleg tega pa glukoza popolnoma zavre filamentozno morfologijo pri številnih hiperinvazivnih mutantih (Cullen in Sprague, 2000).

Zmožnost formiranja psevdohif in invazivnost oz. prodiranje v agar zaradi pomanjkanja hranil lahko deluje kot selekcijska prednost nemobilnih celic *S. cerevisiae*, saj ta sposobnost olajša sledenje potrebnim hranilom na daljavo glede na njihovo prvotno pozicijo. Poleg tega zmožnost razvoja psevdohif kot odgovor na stres pripomore oddaljevanju celic od škodljivega okolja (Zaragoza in Gancedo, 2000).

2.1.3.3 Drugi faktorji, ki vplivajo na invazivno rast

Dodatek Kongo rdeče (spojine, ki modificira strukturo glukanov celične stene) YPD gojišču (Kopecka in Gabriel, 1992) je prav tako sprožil formacijo verig iz kvasnih celic, ki so lahko prodirale v agar. To, da prisotnost Kongo rdeče v gojišču stimulira invazivnost *S. cerevisiae* nakazuje, da je stanje celične stene pomemben dejavnik za morfogenezo kvasovk (Zaragoza in Gancedo, 2000).

2.1.4. Spremljanje invazivne rasti v gojiščih

Podatki o profiliranju ekspresije genoma *S. cerevisiae* kažejo, da invazivne rasti ne nadzoruje samo določen, za invazivnost specifičen transkripcijski program, tako lahko tudi vrsta drugih signalov doprinese k iniciaciji invazivnosti (Breitkreutz in sod., 2003). Zaradi tega lahko podajo kvantitativne meritve invazivnosti v širokem spektru različnih rastnih pogojev pomembne dodatne podatke za razjasnitev vloge relevantne družine genov (Zupan in Raspor, 2008).

2.1.4.1 Test invazivnosti v agarju

Za testiranje invazivne rasti je znanih nekaj testov. Obstaja test, pri katerem so seve kvasovk pazljivo, da so se izognili poškodovanju površine gojišča, z zobotrebcem nanašali na plošče s hranljivim agarjem. Kolonije so inkubirali tri dni pri 30 °C, nato pa še dva dni pri sobni temperaturi. Celice na površini agarja so fotografirali, nato pa so jih pazljivo sprali s površine agarja z deionizirano vodo. Agarja se niso dotikali neposredno, niti ga niso drgnili. Mikroskopske analize so pokazale, da so celice, ki so po spiranju ostale pod površino agarja, bile nedostopne za secirno iglo, razen, če z njo niso predrli agarja. Po spiranju, ko so se plošče kratek čas sušile, so jih ponovno fotografirali. Celice, ki so rasle v agar, so za nadaljnje raziskave izrezali z zobotrebcem (Roberts in Fink, 1994).

Pri nacepljanju celic na ohlajene agarjeve plošče lahko uporabimo cepilno zanko. Pri metodi za kvantifikacijo invazivne rasti v agarju so s cepilno zanko oblikovali »iglo« iz kvasne biomase in s konico »igle« nacepljali sveže agarjeve plošče. S pazljivo inokulacijo je možno doseči relativno enake oblike in velikosti kolonij. V praksi se je izkazalo, da ni znatne korelacije med številom celic v inokulumu in končno velikostjo kolonij. Bolj kot število celic v inokulumu, je za kvantifikacijo pomemben premer inokuluma nanešenega na agar. Metoda je hitrejša kot inokulacija z mikromanipulatorjem in boljša kot inokulacija s suspenzijo celic. Pri slednji se kapljica suspenzije razlije po plošči in tvori večjo kolonijo, kot pri inokulaciji z zanko. To je pomembno, ker ima površina inokuluma večji vpliv na končni volumen kolonij, kot število celic. Ko so kolonije kvasovk zrasle, so jih fotografirali in sprali s curkom destilirane vode. Sprane plošče so ponovno fotografirali. Da so potrdili, da podatki po spiranju resnično predstavljajo invazivne kolonije v agarju, so

izrezali bloke agarja z značilnimi kolonijami in jih fotografirali s strani. Pri pregledu invazivnega dela kolonij z mikroskopom je mogoče opaziti podaljšane celice in psevdohifno rast. Nizek koeficient variacije volumna kolonij tudi potrjuje, da pri nacepljanju z zanko ni potrebna natančno definirana količina inokuluma (Zupan in Raspor, 2008).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Zelo invazivne, manj invazivne in neinvazivne seve kvasovk *S. cerevisiae* smo nacepili na različna gojišča in smo jih uporabljali za ugotavljanje vpliva eksperimentalnih pogojev rasti na celokupno in invazivno rast mikroorganizmov.

3.1.1 Mikroorganizmi

Uporabili smo naslednje seve kvasovk *S. cerevisiae* iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Biotehniški fakulteti v Ljubljani:

Preglednica 1: Sevi kvasovk uporabljeni v diplomski nalogi in njihov virulentni potencial (Zupan in Raspor, 2008).

Sevi	**Izvor**	**Poročana virulenca oz. invazivnost**	**Reference**
56	Danski sir s plemenito plesnijo	Zelo invaziven	
YJM311	Človek, žolčevod	Zelo virulenten	Byron in sod., 1995; McCusker in sod., 1994a,b
YJM128	Pljuča človeka z AIDS-om	Zelo virulenten	Byron in sod., 1995; McCusker in sod., 1994a,b
YJM309	Človek, kri	Zelo virulenten	Byron in sod., 1995; McCusker in sod., 1994a,b
YJM273	Človek, peritonealna tekočina	Manj virulenten	Byron in sod., 1995; McCusker in sod., 1994a,b
YHUM272	Izvor iz Σ1278b	Manj virulenten	Lo in Dranginis, 1998
YJM308	Človek, pankreasna tekočina	Manj virulenten	Byron in sod., 1995; McCusker in sod., 1994a,b
YJM222	človek	Nevirulenten/neinvaziven	McCusker in sod., 1994a,b
ZIM2273	Izvor iz Σ1278b, flo11Δ::lacZ	Neinvaziven	Lo in Dranginis, 1998
S228c	Laboratorijski sev	Nevirulenten/neinvaziven	Liu in sod. 1996; McCusker in sod., 1994a,b

Kvasovke smo hranili v glicerolu pri – 80 °C, po revitalizaciji smo vitalnost kvasovk ohranjali s precepljanjem na petrijeve plošče s trdnim gojiščem YPD pri 30 °C, v naslednji

fazi pa na gojišča za testiranje. Volumne kolonij različnih sevov kvasovk in invazivnost smo določali pri različnih pogojih rasti po 4 dneh inkubacije.

3.1.2 Priprava gojišč

Za kultivacijo kvasovk smo pripravili hranljivo gojišče YPD, ki vsebuje potrebne sestavine za rast kvasovk. Pri testiranju različnih parametrov smo gojišču YPD dodajali še eno od naslednjih sestavin: sol (NaCl), konzervanse (Na-benzoat, Na-bisulfit, K-sorbat), HCl, NaOH. Za kultivacijo kvasovk na gojišču s pomanjkanjem hranil smo pripravili sintetično gojišče SCLD z nizko vsebnostjo virov ogljika.

3.1.2.1 Gojišče YPD

Bujon YPD v prahu (Sigma, Steinheim, Nemčija) je kompleksno hranljivo gojišče, ki vsebuje vse potrebne sestavine za rast kvasovk: 1 L gojišča vsebuje 10 g kvasnega ekstrakta, 20 g peptona in 20 g glukoze ter vodo. Za pripravo trdnih gojišč smo v gojišče YPD dodali bakteriološki agar (Biolife, Milano, Italija), (2%), avtoklavirali 20 min pri 121 °C in aseptično razlili v petrijeve plošče (BD Biosciences, San Jose-CA, USA).

3.1.2.2 Gojišča s spremenjenimi vrednostimi pH

Pri testiranju invazivnosti ob različnih pH vrednostih gojišča smo pripravili YPD plošče z vrednostjo pH: 4 (kislo), 6,5 (standardno, brez regulacije pH) in 8 (bazično). Vrednost pH smo regulirali po avtoklaviranju in ohladitvi gojišča na 60 °C z dodatkom 1M HCl (Merck, Darmstadt, Nemčija) oz. 1M raztopine NaOH (Merck, Darmstadt, Nemčija) Vrednosti pH gojišča smo preverjali s pH lističi (EM Science, Gibbstown-NJ, ZDA). Koncentracijo gojišča smo nazadnje popravili z dodatkom destilirane sterilne vode do ustreznega končnega volumna, nakar smo gojišče razlili v petrijevke.

3.1.2.3 Gojišča z dodatkom konzervansov

-Gojišče z dodanim K-sorbatom (0,01 %) smo pripravili tako, da smo 0,75 g K-sorbata (Kemika, Zagreb, Hrvaška) raztopili v 10 ml destilirane vode, desetkrat razredčili in raztopino sterilizirali skozi membranski filter (Sartorius, Goettingen, Nemčija; velikost por 0,2 μm). Raztopino K-sorbata smo vmešali v 740 ml avtoklaviranega in na 60 °C ohlajenega gojišča YPD in aseptično razlili v petrijevke.

-Gojišče z dodanim Na-benzoatom (0,1 %) smo pripravili tako, da smo 0,75 g Na-benzoata (Kemika, Zagreb, Hrvaška) raztopili v 10 ml destilirane vode in raztopino sterilizirali skozi membranski filter (Sartorius, Goettingen, Nemčija; velikost por 0,2 μm). Raztopino Na-benzoata smo vmešali v 740 ml avtoklaviranega in na 60 °C ohlajenega gojišča YPD in aseptično razlili v petrijevke.

-Gojišče z dodanim Na-bisulfitom (0,1 %) smo pripravili tako, da smo 1,875 ml 40 % Na-bisulfita (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Nemčija) odpipetirali v 750 ml avtoklaviranega in na 60 °C ohlajenega gojišča YPD in aseptično razlili v petrijevke.

3.1.2.4 Gojišče YPD z znižano vrednostjo a_w

V 1 L gojišča YPD smo dodali 1 g NaCl (Merck, Darmstadt, Nemčija), kar ustreza 0,1% NaCl v gojišču.

3.1.2.5 Gojišče SCLD

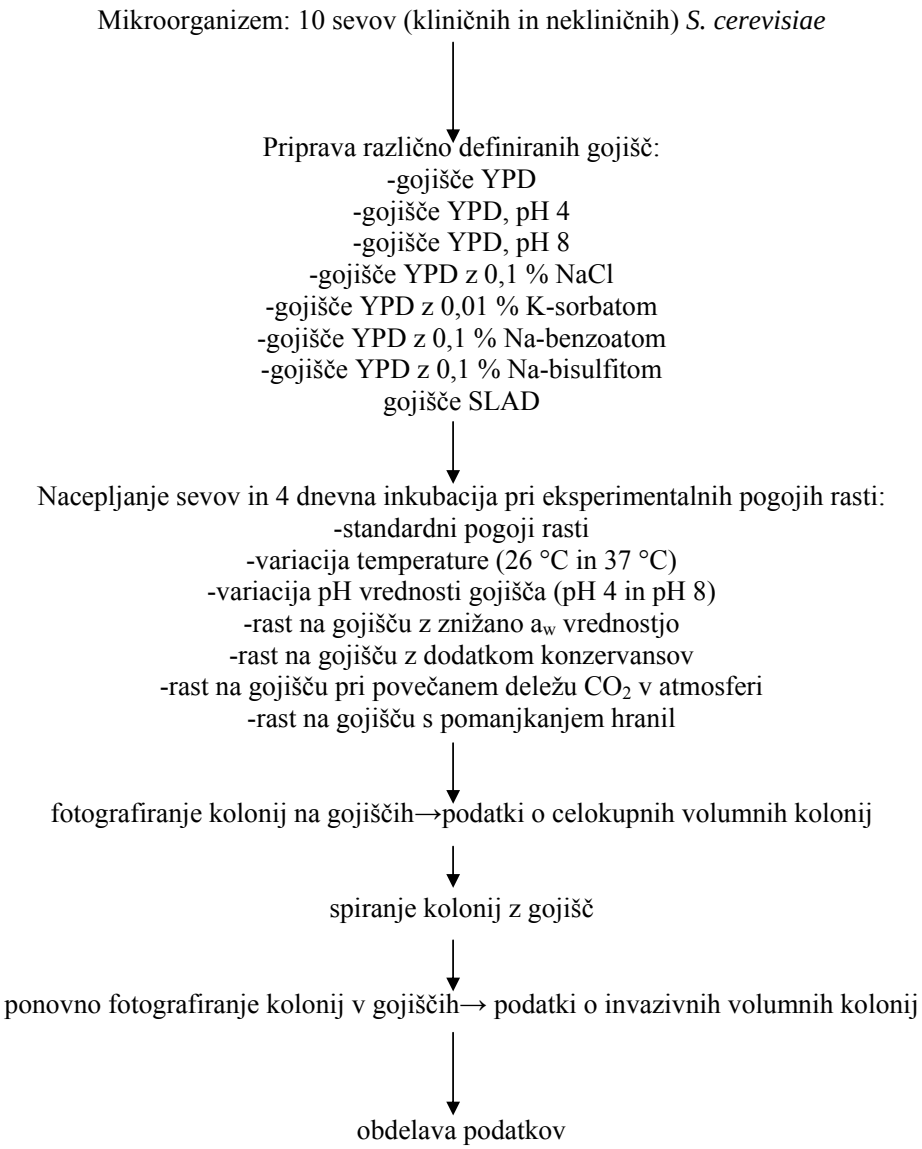
SCLD (Synthetic complete low-dextrose) je sintetično gojišče z nizko vsebnostjo virov ogljika za kvasovke. Trdno gojišče SCLD smo pripravili tako da smo: 5,025 g YNB (kvasna dušična baza) brez aminokislin (Sigma-Aldrich, St. Louis-MO, ZDA), 0,75 g glukoze (Kemika, Zagreb, Hrvaška), 15,0 g bakteriološkega agarja (Biolife, Milano, Italija) zatehtali v litrske steklenice in raztopili v 750 ml destilirane vode. Nadalje smo postopali kot opisano v točki 3.1.2.1.

Gojišča smo po razlitju ohladili in jih pred uporabo hranili dva dni v hladilniku pri 4 °C.

3.2 METODE

Izbrane invazivne oz. neinvazivne seve kvasovk *S. cerevisiae* smo vzgajali na različnih gojiščih in pri različnih pogojih rasti. Invazivno rast kvasovk v agar smo izmerili s pomočjo kvantitativnega testa invazivne rasti v agar.

3.2.1 Potek dela



Slika 2: Hodogram poskusa

3.2.2 Pogoji kultivacije mikroorganizmov

Izbrane seve v Preglednici 1 smo 4 dni gojili na pripravljenih gojiščih v normalni atmosferi pri 30 °C (razen kjer je navedeno drugače) pri izbranih pogojih rasti;

Standardni pogoji rasti
-gojišče YPD, inkubacija pri 30 °C

Variacija temperature: 26 °C in 37 °C
-gojišče YPD, inkubacija pri 26 °C
-gojišče YPD, inkubacija pri 37 °C

Variacija pH vrednosti gojišča;
-gojišče YPD, pH 4
-gojišče YPD, pH 8

Gojišče z znižano a_w vrednostjo
-gojišče YPD z nizko a_w vrednostjo (0,1 % NaCl)

Dodatek konzervansov gojišču
-gojišče YPD z 0,01 % K-sorbatom
-gojišče YPD z 0,1 % Na-benzoatom
-gojišče YPD z 0,1 % Na-bisulfitom

Rast na gojišču pri povečanem deležu CO_2 v atmosferi
-gojišče YPD, gojenje v atmosferi s 15 % CO_2; Nacepljena gojišča YPD smo zavili v plastično vrečo z vhodom in izhodom za plin in kvasovke 4 dni prepihovali z mešanico plinov iz jeklenke CO_2 (15 % CO_2, 85 % zrak).

Pomanjkanje hranil v gojišču
-gojišče SCLD s pomanjkanjem virov ogljika za kvasovke

3.2.3 Kvantitativni test invazije v agar (Zupan in Raspor, 2008)

Metoda se uporablja za opredelitev invazivne rasti kvasovk. Omogoča kvantitativno ovrednotenje volumna kolonij in relativno invazivnost sevov ter razvrščanje le-teh glede na stopnjo njihove invazivnosti. Test se lahko uporablja za hitro determinacijo virulentnega potenciala kvasovk.

Test v osnovi sestoji iz predhodne kultivacije sevov kvasovk na trdnih gojiščih v obliki invazivno rastočih kolonij in nadalje merjenja volumnov različnih makromorfoloških delov kolonij s pomočjo videosistema Gel Doc 2000 (Bio-Rad, Italija) ter obdelave podatkov z računalniško programsko opremo Quantity One 4.0.3 (Bio-Rad, Italija). Izmerjeni volumni celokupnih in invazivnih delov kolonij nadalje služijo za izračunavanje parametrov testa – invazivnost, relativna invazivnost, ki opisujeta stopnjo invazivne rasti kvasovk v gojišče.

3.2.3.1 Kultivacija sevov

Pri testiranju invazivnosti smo kvasovke sprva nacepili na površino gojišča v obliki posebne geometrijske prostorske razporeditve. Kvasovke smo na petrijevo ploščo nacepili v 7 paralelkah - v ogliščih šestkotnika in na sredini petrijevke. Kvasovke so na gojiščih tvorile različno velike kolonije krem barve, ki so zrasle na razdalji 0,5 cm od stene petrijevke, sedma kolonija pa na sredini. Med sabo so bile oddaljene 2,7 cm. Poleg rasti na površini agarja, so nekateri sevi rasli tudi invazivno v agar, kar smo opazili po spiranju kolonij z vodo. Vse kolonije na ploščah smo pred in po spiranju fotografirali z dokumentacijskim sistemom in s programsko opremo izmerili volumna različnih makromorfoloških delov kolonij kvasovk na slikah. Razdalja med kolonijami na petrijevi plošči in oddaljenost od roba plošče lahko vplivata na velikost kolonij. Geometrijska oblika nacepljanja kvasovk (sedem na ploščo, šest v ogliščih šestkotnika in ena kolonija na sredini) zagotavlja vsem kolonijam kvasovk enake prostorske pogoje rasti. Na ta način je bila tudi dosežena racionalna izraba prostora z maksimalnim številom kolonij na agarni plošči, kjer ni opaziti vplivov bližine sosednjih kolonij kvasovk na invazivno rast v agar ter na velikost kolonij (Zupan in Raspor, 2008).

Pri nacepljanju smo seve *S. cerevisiae* s cepilno zanko postrgali z gojišča YPD tako, da se je biomasa na cepilni zanki nabrala v koničasto obliko. S konico biomase smo se pazljivo dotaknili površine sveže agarne plošče in tako kvasovke precepili v obliki (majhne) točke, z minimalnim nanosom biomase ter zagotovili nadaljnjo rast v obliki kolonij krožne oblike.

Po inokulaciji smo petrijevke ohlapno zavili v plastične vrečke, da smo omejili izsuševanje, pri tem pa še vedno omogočili zračenje ter seve inkubirali 4 dni pri izbranih pogojih kultivacije (3.2.2).

3.2.3.2 Merjeneje volumnov kolonij

Petrijevke s kolonijami kvasovk smo po inkubaciji najprej fotografirali z dokumentacijskim sistemom za gele Gel Doc 2000 – merjenje celokupnega volumna kolonije. Z nežnim curkom destilirane vode smo s površine agarja nato sprali del kolonije, ki je rasel na površini agarja. Oprane plošče z delom kolonije, ki je rasel invazivno v gojišče, smo nato ponovno fotografirali – merjenje invazivnega dela volumna. Pri fotografiranju smo petrijevki priložili košček belega papirja kvadratne oblike (1 cm^2), ki je služil kot standard za normalizacijo optičnih pogojev (osvetlitev objekta, odprtost zaslonke in goriščna razdalja). S programsko opremo Quantity One 4.0.3 smo nato določili volumne posameznih delov kolonij; celokupne volumne kolonij – pred spiranjem (V_T) in invazivne volumne kolonij – po spiranju (V_I). Izmero volumov kolonij in odstranitev intenzitete lokalnega ozadja smo opravili v skladu z navodili programske opreme, ki definirajo volumen kot vsoto intenzitete pikslov (pixel »picture element« angl., najmanjših enot slike z informacijo o intenziteti) na območju objekta (kolonije) × površina pikslov. S programsko opremo smo dobili podatke o prirejenih volumnih kolonij ($X_{T,I}$), z enoto definirano kot enota intenzitete × mm^2. Normalizirane vrednosti volumnov ($N_{T,I}$) smo nadalje izračunali po enačbi:

$$N_{T,I} = X_{T,I} / X_S \quad ...(1)$$

kjer X_S predstavlja prirejeni volumen standardizirane površine. Z uporabo umeritvene krivulje sistema (3.2.3.3) smo nadalje izračunali celokupne volumne kolonij (V_T) in invazivne volumne kolonij (V_I).

3.2.3.3 Kalibracija kvantitativnega testa invazije v agar

Za kalibracijo testa smo kot modelni medij uporabili mleko s 3,5 % maščobe, ki smo ga odpipetirali na parafilm. Mleko se je na hidrofobni površini parafilma oblikovalo v kaplje, ki so bile po obliki podobne kolonijam kvasovk. Z interpolacijo rezultatov meritev, izračunanih normaliziranih vrednosti volumnov $N_{T,I}$ za standardne volumne ($V_{ST,\,i}$) od 0,6 µl do 30 µl izmerjene v osmih paralelkah je bila izdelana umeritvena krivulja: enačba (2) (Zupan in Raspor, 2008) in enačba (3) (Zupan in Raspor, 2008)

Za $N_{T,I} \leq 0{,}071$ ($V_{ST} \leq 10$ ul):
$$V_{T,I} = 733{,}62\,(N_{TI})^2 + 89{,}15\,N_{TI} \quad ...(2)$$

Za $N_{T,I} > 0{,}071$ ($V_{ST} > 10$ ul):
$$V_{T,I} = 189{,}09\,N_{TI} - 3{,}39 \quad ...(3)$$

3.2.3.4 Določitev invazivnosti in relativne invazivnosti

Intenziteto invazivne rasti seva smo kvantitativno opredelili z izmerjeno vrednostjo absolutnega volumna invazivnega dela kolonije (V_I), ki smo ga izračunali iz enačb umeritvene krivulje (2) in (3).
Da bi določili kolikšna je nagnjenost seva k invazivni rasti v agar v primerjavi z rastjo na površini, smo iz izmerjenih vrednosti V_I, V_T tudi izračunali parameter relativne invazivnosti po enačbi:

$$RI = V_I / V_T \times 100 \quad ...(4)$$

3.2.4 Statistična obdelava podatkov

Pri testiranju invazivne rasti kvasovk v agar smo opravili poskuse z več ponovitvami. Rezultate, ki smo jih dobili na ta način, smo statistično obdelali. Meritve volumnov kolonij smo podali kot povprečno vrednost izmerjenih volumnov 14 do 42 kolonij za posamezen sev pri določenem pogoju rasti. Izračunali smo standardni odklon od povprečne vrednosti različnih volumnov in koeficient variacije.

3.2.4.1 Povprečna vrednost

Rezultate meritev smo podali kot povprečno vrednost ($\overline{X}$), enačba (7) (Košmelj, 2001).

$$\overline{X} = \frac{\sum_{i=1}^{n} X_i}{n} \quad ...(5)$$

$\overline{X}$ – povprečna vrednost; n – število vzorcev; X_i – vrednost i-te meritve; število meritev

3.2.4.2 Standardni odklon, koeficient variacije

Za oceno variabilnosti rezultatov pri vzorcih smo uporabili standardni odklon (standardno deviacijo – SD), enačba (6) in koeficient variacije (KV), enačba (7) (Košmelj, 2001).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i-1}^{n} (X_i - \overline{X})^2}{n-1}} \quad ...(6)$$

$$KV(\%) = \frac{SD}{\overline{X}} \bullet 100 \quad ...(7)$$

3.3 OPREMA

3.3.1 Steklovina in potrošni material

- 100 ml, 250 ml, 1000 ml steklenice
- kovinske žlice
- merilne bučke
- merilni valji
- petrijeve plošče
- pH lističi (EM Science, Gibbstown-NJ, ZDA).
- plastične konice za avtomatske pipete
- steklene čaše
- stekleni lij
- sterilni membranski filtri (Sartorius, Goettingen, Nemčija; velikost por 0,2 μm)

3.3.2 Aparature

- avtoklav (International PBI, Milano, Italija)
- avtomatske pipete (Gilson, Middleton-WI, ZDA)
- hladilnik (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- laminarij
- mikrovalovna pečica Sanyo (Sanyo, Osaka, Japonska)
- tehtnica Analytic (Sartorius, Goettingen, Nemčija)
- tehtnica Excellence (Sartorius, Goettingen, Nemčija)
- zamrzovalna skrinja (- 20 °C) (LTH, Škofja Loka, Slovenija)
- zamrzovalnik (- 80 °C) (Heto)

4 REZULTATI

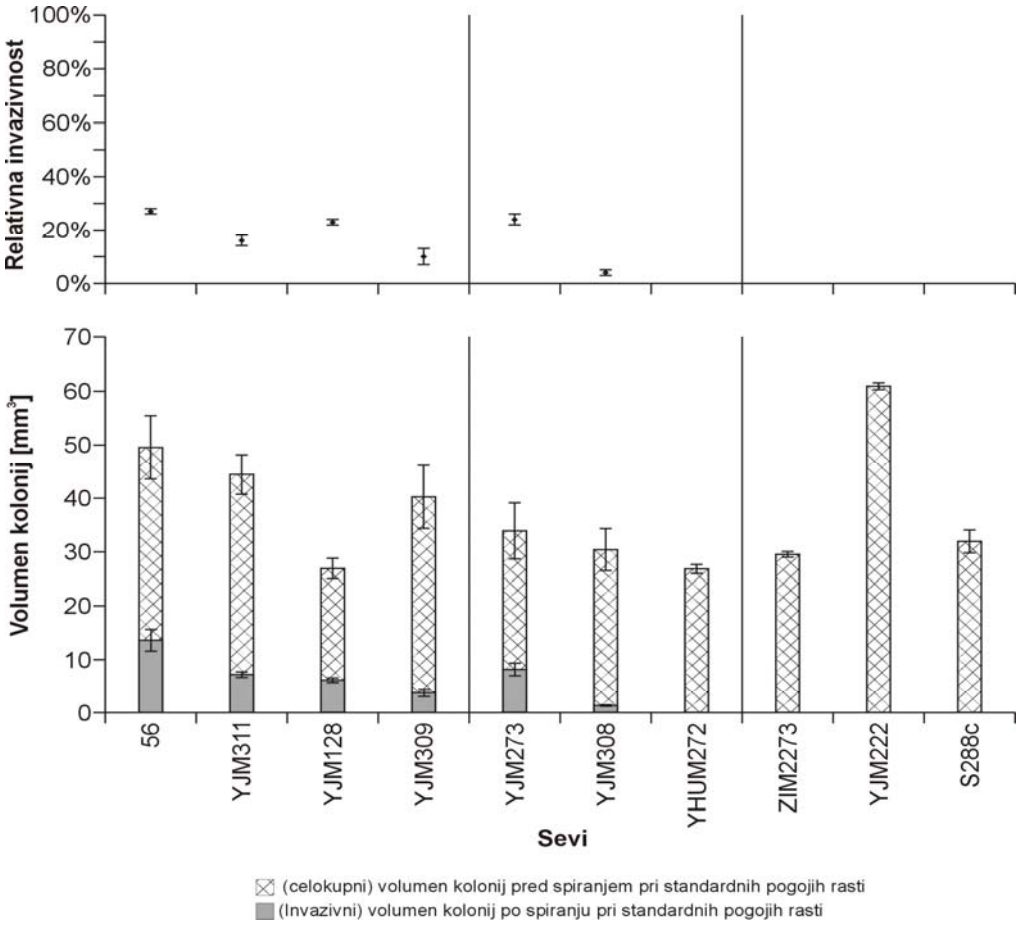
Med raziskovalnim delom v laboratoriju, ki je potekalo od 07. januarja 2008 do 01. aprila 2008 smo izvedli kvantitativne teste invazije 10 kvasnih sevov v agar pri 11 različnih pogojih rasti (110 eksperimentov). Na 11 elektroforetskih gelih smo pripravili tudi analize proteinskega profila celične stene kvasnih sevov. Proteinski profil smo pripravili iz celic z encimsko obdelavo in sledečo elektroforezo. Rezultate analize proteinskega profila nismo vključili v diplomsko nalogo zaradi nedovršene metode in obsega podatkov, ki bi presegal okvir naloge. Prvi rezultati (rezultati meritev invazije kvasovk v agar) so predstavljeni v tem poglavju. Meritve so bile opravljene s kvantitativnim testom invazivne rasti v agar, na gojišču YPD: pri temperaturi 30 °C (standardni pogoji rasti), 26 °C in 37 °C, na gojišču z znižano a_w vrednostjo, ob dodatkih konzervansa gojišču (K-sorbat, Na-benzoat, Na-bisulfit), pri povečanem deležu CO_2 v atmosferi in na gojišču s pomanjkanjem vira ogljika (SCLD).

4.1 REZULTATI MERITEV VOLUMNOV KOLONIJ

Fotografije kvasnih kolonij (Priloga L – V) smo obdelali s pomočjo programske opreme Quantity One po postopku opisanem v 3.2.3, in dobili podatke o celokupnih volumnih kolonij – pred spiranjem in podatke o invazivnih volumnih kolonij – po spiranju. Podatki so predstavljeni v grafih (Slike 3 – 13) in tabelah (Priloga A – K), ki smo jih izdelali s programskim orodjem MS Office Excel. Vrednosti o celokupnih volumnih kolonij in invazivnih volumnih kolonij so bile izračunane iz povprečja 14 – 42 izmerjenih volumnov kolonij z dveh do šestih petrijevih plošč.

Na Sliki 3 so predstavljeni rezultati meritev volumnov celokupnega in invazivnega dela kolonij ter izračunane vrednosti relativne invazivnosti za testirane seve kvasovk *S. cerevisiae*, kultiviranih pri standardnem pogoju rasti. Na Slikah 4 – 13 so predstavljeni isti rezultati meritev za testirane seve kvasovk *S. cerevisiae*, kultiviranih pri standardnem pogoju rasti, poleg teh pa so predstavljeni še rezultati pri izbranih fizioloških pogojih rasti. Rezultati izmerjenih volumnov kolonij v mm^3 so prikazani za različne seve v stolpcih. Višina šrafiranega in praznega stolpca ponazarja celokupni volumen kolonij pred spiranjem, višina polnega sivega in črnega stolpca pa volumen invazivnega dela kolonij, ki so rasle v notranjost gojišča. Relativna invazivnost je pri standardnih pogojih na grafu ponazorjena z malim karom, pri izbranih testiranih pogojih pa s piko. Kjer rezultati niso prikazani pomeni, da pogoji niso bili ugodni za rast seva. Vrednosti relativne invazivnosti so v grafih prikazane v odstotkih (točke na grafu). V primerih, kjer je bila izražena rast kvasovk le na površini gojišča, znaša relativna invazivnost 0 %.

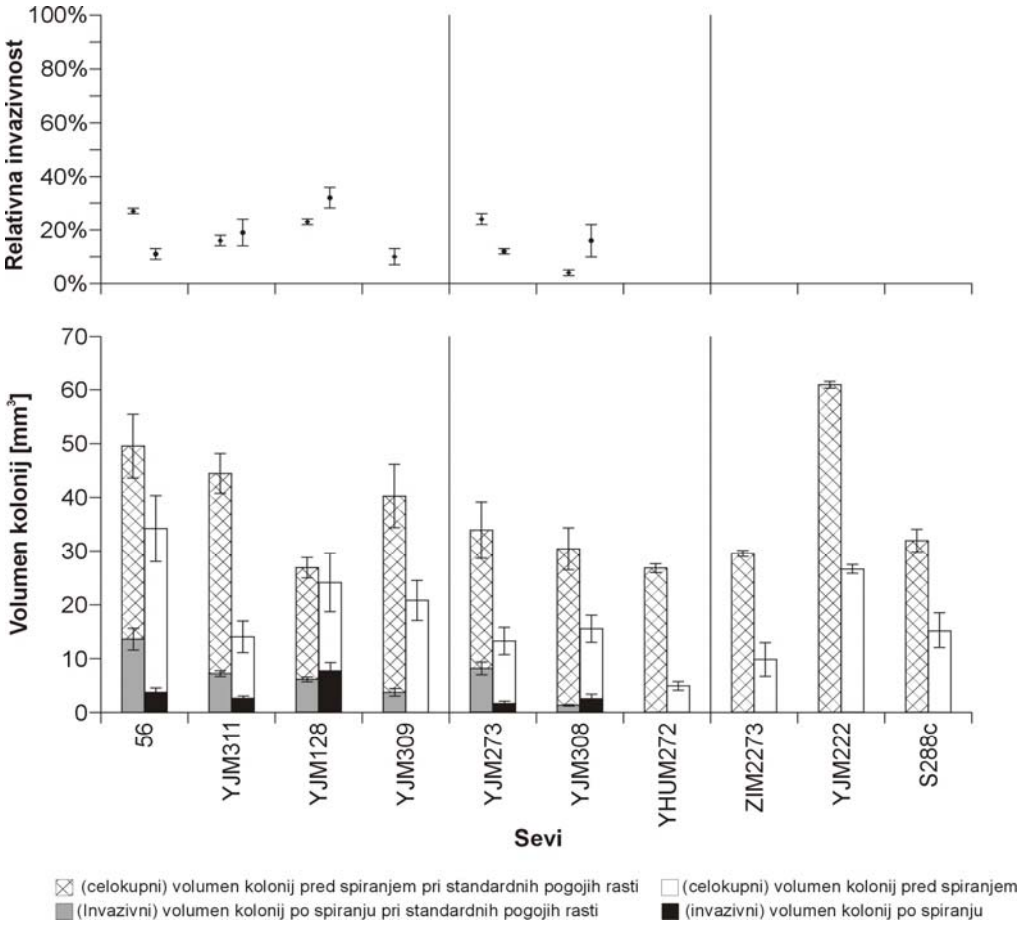
4.1.1 Volumni kolonij kvasovk inkubiranih pri 30 °C na gojišču YPD



Slika 3: Relativna invazivnost in celokupni ter invazivni volumni kolonij sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309), manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) in neinvazivne (ZIM2273, YJM222, S288c) inkubiranih pri standardnih pogojih rasti (4 dni pri 30 °C na gojišču YPD).

Največji volumen kolonij pred spiranjem znaša 60,9 mm^3 ± 0,6 mm^3 (YJM222), najmanjši pa 26,8 mm^3 ± 0,8 mm^3 (YHUM272). Povprečni koeficient variacije znaša 8 %, z maksimalno vrednostjo 15 % (YJM309 in YJM273) in minimalno vrednostjo 1 % (YJM222). Največji invazivni volumen kolonij po spiranju znaša 13,6 mm^3 ± 2,0 mm^3 (56), najmanjši pa 0,0 mm^3 (YHUM272, ZIM2273, YJM222, S288c). Povprečni koeficient variacije za invazivne volumne po spiranju znaša 7 %, z maksimalno vrednostjo 19 % (YJM309). Sevi YHUM272, ZIM2273, YJM222, S288c niso rasli invazivno pri danih eksperimentalnih pogojih. Največja relativna invazivnost znaša 27 % ± 1 % (56). Povprečni koeficient variacije za relativno invazivnost znaša 8 % z maksimalno vrednostjo do 30 % (YJM309).

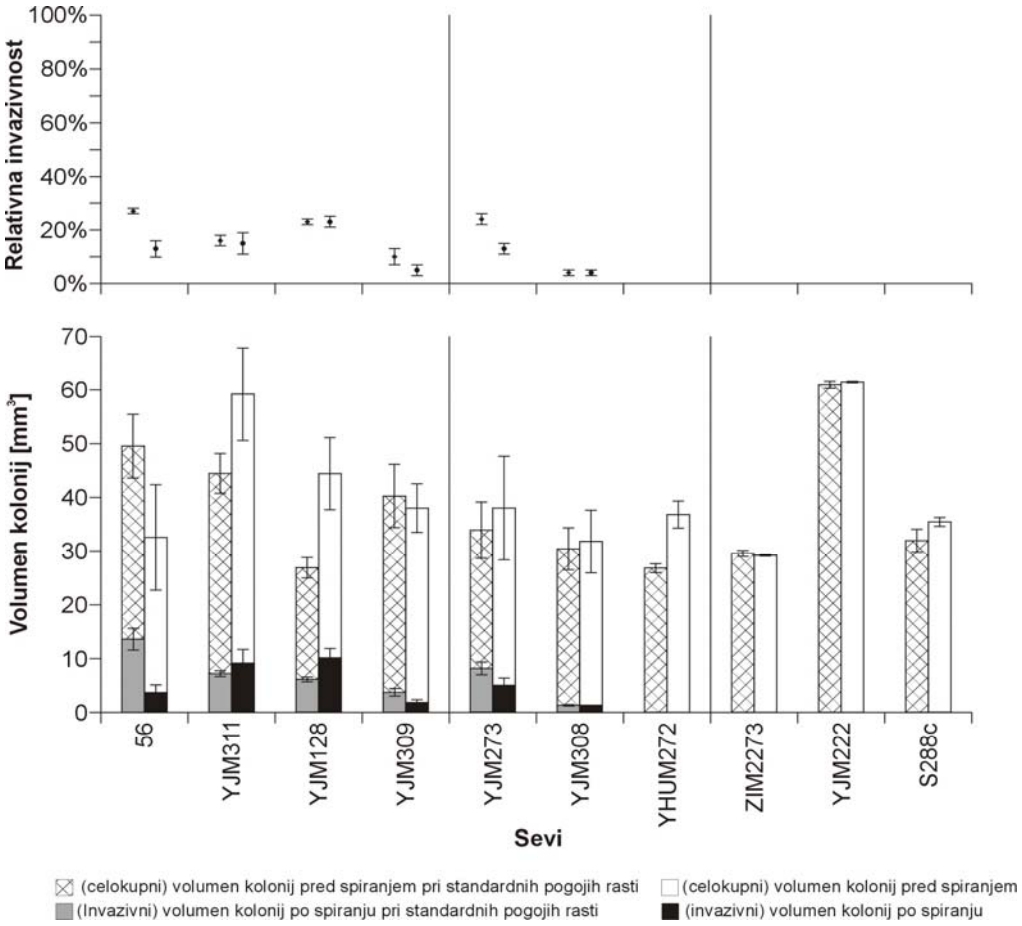
4.1.2 Volumni kolonij kvasovk inkubiranih pri 26 °C na gojišču YPD



Slika 4: Relativna invazivnost in celokupni ter invazivni volumni kolonij sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309), manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) in neinvazivne (ZIM2273, YJM222, S288c) inkubiranih 4 dni pri 26 °C na gojišču YPD v primerjavi z istimi sevi inkubiranimi pri standardnih pogojih rasti (4 dni pri 30 °C na gojišču YPD).

Največji volumen kolonij pred spiranjem znaša 34,1 mm^3 ± 6,1 mm^3 (56), najmanjši pa 4,9 mm^3 ± 0,8 mm^3 (YHUM272). Povprečni koeficient variacije znaša 19 %, z maksimalno vrednostjo od 32 % (ZIM2237) in minimalno vrednostjo do 3 % (YJM222).
Največji invazivni volumen kolonij po spiranju znaša 7,7 mm^3 ± 1,5 mm^3 (YJM128), najmanjši pa 0,0 mm^3 (YJM309, YHUM272, ZIM2273, YJM222, S288c). Povprečni koeficient variacije za invazivne volumne po spiranju znaša 11 %, z maksimalno vrednostjo do 33 % (YJM308). Sevi YJM309, YHUM272, ZIM2273, YJM222, S288c pri izbranih eksperimentalnih pogojih niso rasli invazivno.
Največja relativna invazivnost znaša 32 % ± 4 % (YJM128). Povprečni koeficient variacije za relativno invazivnost znaša 10 % z maksimalno vrednostjo do 38 % (YJM308).

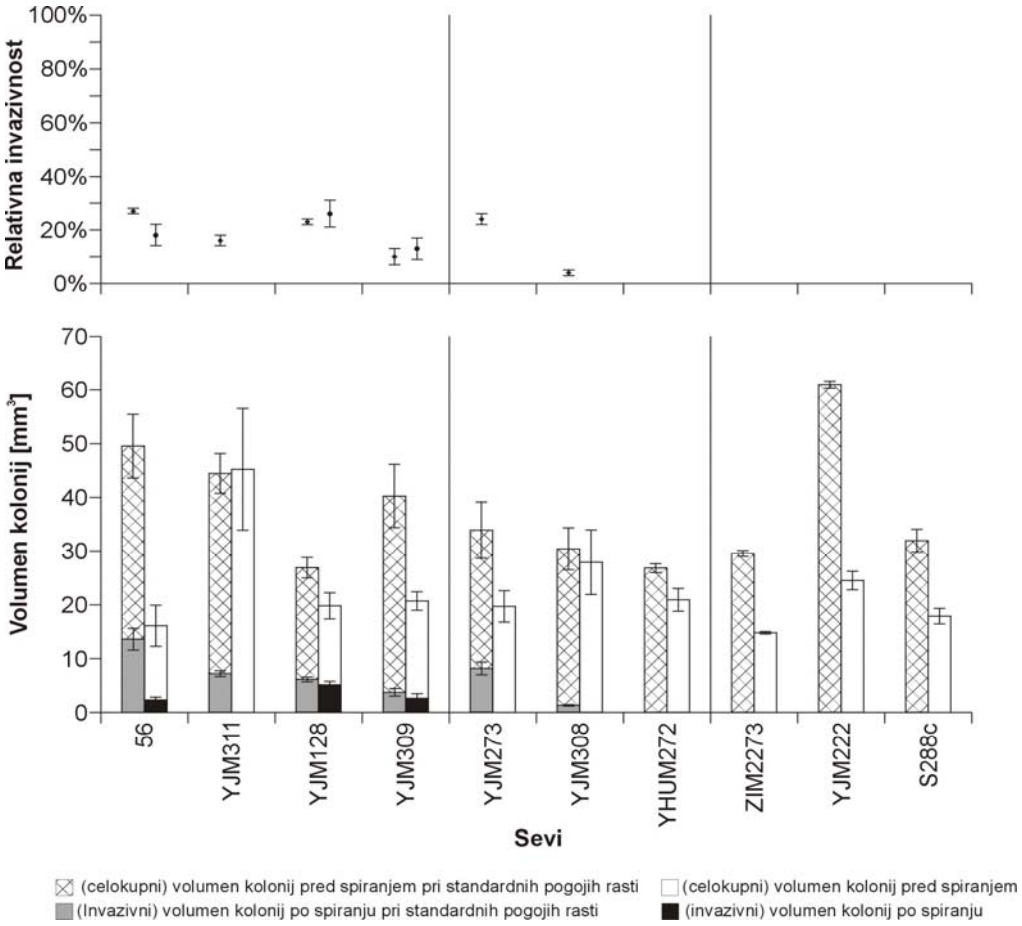
4.1.3 Volumni kolonij kvasovk inkubiranih pri 37 °C na gojišču YPD



Slika 5: Relativna invazivnost in celokupni ter invazivni volumni kolonij sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309), manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) in neinvazivne (ZIM2273, YJM222, S288c) inkubiranih 4 dni pri 37 °C na gojišču YPD v primerjavi z istimi sevi inkubiranimi pri standardnih pogojih rasti (4 dni pri 30 °C na gojišču YPD).

Največji volumen kolonij pred spiranjem znaša 61,4 mm^3 ± 0,1 mm^3 (YJM222), najmanjši pa 31,8 mm^3 ± 5,8 mm^3 (YJM308). Povprečni koeficient variacije znaša 12 %, z maksimalno vrednostjo od 30 % (56) do 0 % (ZIM2273 in YJM222).
Največji invazivni volumen kolonij po spiranju znaša 10,1 mm^3 ± 1,7 mm^3 (YJM128), najmanjši pa 0,0 mm^3 (YHUM272, ZIM2273, YJM222, S288c). Povprečni koeficient variacije za invazivne volumne po spiranju znaša 14 %, z maksimalno vrednostjo do 39 % (56). Sevi YHUM272, ZIM2273, YJM222, S288c pri izbranih eksperimentalnih pogojih niso rasli invazivno.
Največja relativna invazivnost znaša 23 % ± 2 % (YJM128). Povprečni koeficient variacije za relativno invazivnost znaša 14 % z maksimalno vrednostjo do 40 % (YJM309).

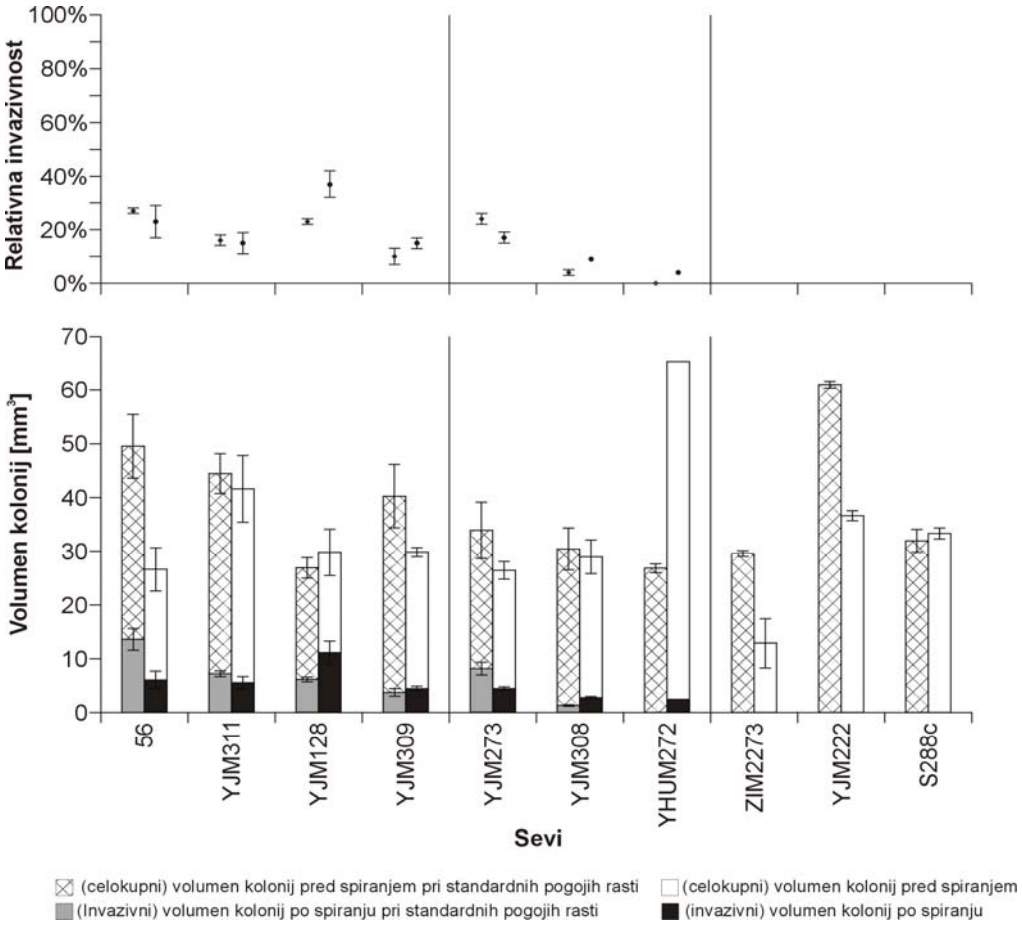
4.1.4 Volumni kolonij kvasovk inkubiranih na gojišču YPD s pH4



Slika 6: Relativna invazivnost in celokupni ter invazivni volumni kolonij sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309), manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) in neinvazivne (ZIM2273, YJM222, S288c) inkubiranih 4 dni pri 30 °C na gojišču YPD s pH 4 v primerjavi z istimi sevi inkubiranimi pri standardnih pogojih rasti (4 dni pri 30 °C na gojišču YPD).

Največji volumen kolonij pred spiranjem znaša 45,2 mm^3 ± 11,3 mm^3 (YJM311), najmanjši pa 14,8 mm^3 ± 0,2 mm^3 (ZIM2273). Povprečni koeficient variacije znaša 13 %, z maksimalno vrednostjo 25 % (YJM311) in minimalno vrednostjo 1 % (ZIM2273).
Največji invazivni volumen kolonij po spiranju znaša 5,1 mm^3 ± 0,6 mm^3 (YJM128), najmanjši pa 0,0 mm^3 (YJM311, YJM273, YJM308, YHUM272, ZIM2273, YJM222, S288c). Povprečni koeficient variacije za invazivne volumne po spiranju znaša 6 %, z maksimalno vrednostjo do 31 % (YJM309). Sevi YJM311, YJM273, YJM308, YHUM272, ZIM2273, YJM222, S288c pri izbranih eksperimentalnih pogojih niso rasli invazivno.
Največja relativna invazivnost znaša 26 % ± 5 % (YM128). Povprečni koeficient variacije za relativno invazivnost znaša 7 % z maksimalno vrednostjo do 31 % (YJM309).

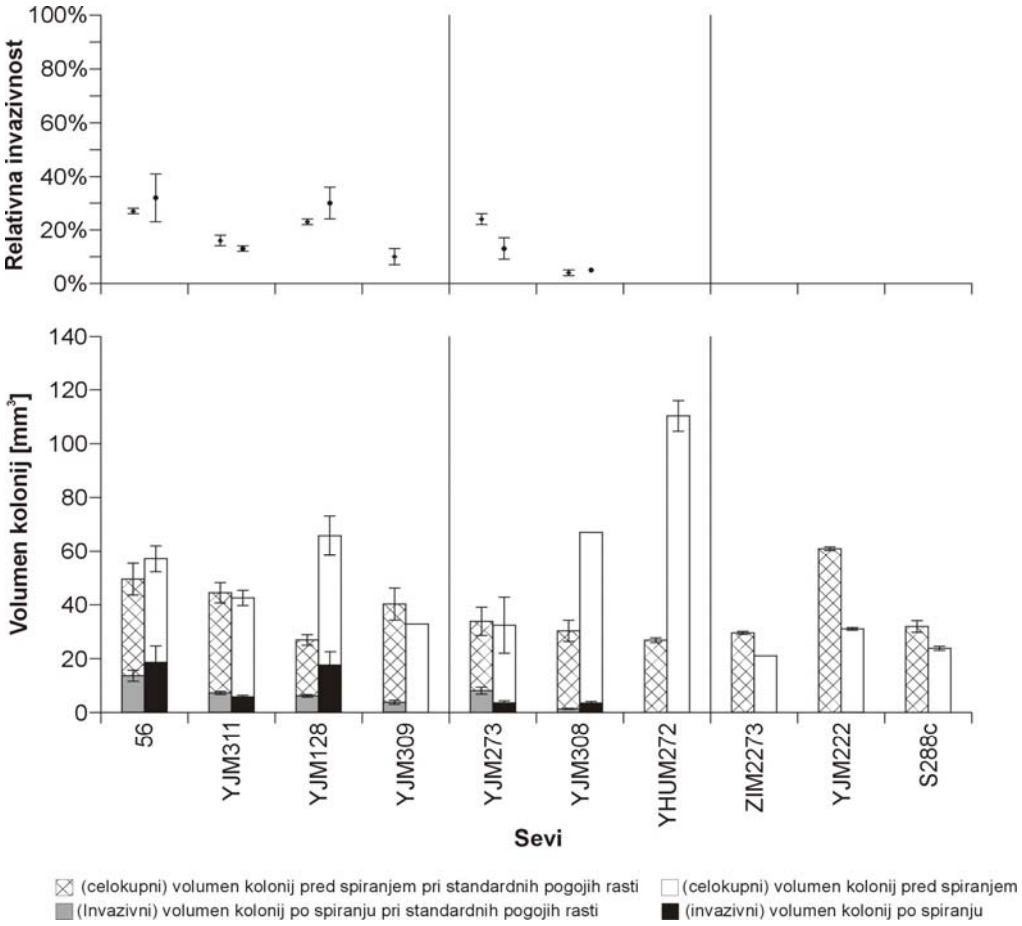
4.1.5 Volumni kolonij kvasovk inkubiranih na gojišču YPD s pH8



Slika 7: Relativna invazivnost in celokupni ter invazivni volumni kolonij sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309), manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) in neinvazivne (ZIM2273, YJM222, S288c) inkubiranih 4 dni pri 30 °C na gojišču YPD s pH 8 v primerjavi z istimi sevi inkubiranimi pri standardnih pogojih rasti (4 dni pri 30 °C na gojišču YPD).

Največji volumen kolonij pred spiranjem znaša 65,3 mm^3 ± 0,0mm^3 (YHUM272) najmanjši pa 12,9 mm^3 ± 4,5 mm^3 (ZIM2273). Povprečni koeficient variacije znaša 10 %, z maksimalno vrednostjo od 34 % (ZIM2273) do 0 % (YHUM272).
Največji invazivni volumen kolonij po spiranju znaša 11,1 mm^3 ± 2,1 mm^3 (YJM128), najmanjši pa 0,0 mm^3 (ZIM2273, YJM222, S288c). Povprečni koeficient variacije za invazivne volumne po spiranju znaša 9 %, z maksimalno vrednostjo do 26 % (56). Sevi ZIM2273, YJM222, S288c niso rasli invazivno pri izbranih eksperimentalnih pogojih.
Največja relativna invazivnost znaša 37 % ± 5 % (YM128). Povprečni koeficient variacije za relativno invazivnost znaša 9 % z maksimalno vrednostjo do 27 % (56).

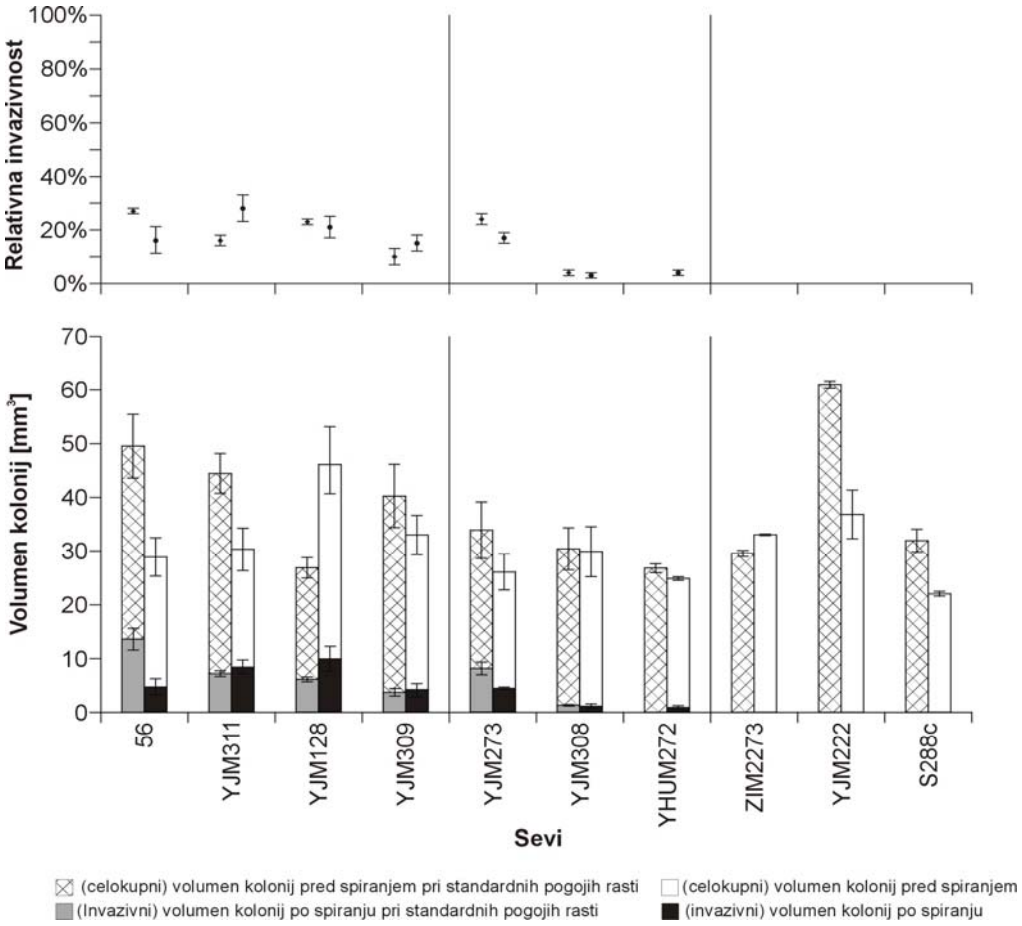
4.1.6 Volumni kolonij kvasovk inkubiranih na gojišču YPD z 0,1 % dodatkom NaCl



Slika 8: Relativna invazivnost in celokupni ter invazivni volumni kolonij sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309), manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) in neinvazivne (ZIM2273, YJM222, S288c) inkubiranih 4 dni pri 30 °C na gojišču YPD z 0,1 % dodatkom NaCl v primerjavi z istimi sevi inkubiranimi pri standardnih pogojih rasti (4 dni pri 30 °C na gojišču YPD).

Največji volumen kolonij pred spiranjem znaša 110,3 mm^3 ± 5,6 mm^3 (YHUM272), najmanjši pa 21,0 mm^3 ± 0,0 mm^3 (ZIM2273). Povprečni koeficient variacije znaša 7 %, z maksimalno vrednostjo do 32 % (YJM273) in minimalno vrednostjo 0 % (YJM309, YJM308, ZIM2273).
Največji invazivni volumen kolonij po spiranju znaša 18,5 mm^3 ± 6,0 mm^3 (56), najmanjši pa 0,0 mm^3 (YJM309, YHUM272, ZIM2273, YJM222, S288c). Povprečni koeficient variacije za invazivne volumne po spiranju znaša 10 %, z maksimalno vrednostjo do 32 % (56). Sevi YJM309, YHUM272, ZIM2273, YJM222, S288c pri izbranih eksperimentalnih pogojih niso rasli invazivno.
Največja relativna invazivnost znaša 32 % ± 9 % (56). Povprečni koeficient variacije za relativno invazivnost znaša 9 % z maksimalno vrednostjo do 31 % (YJM273).

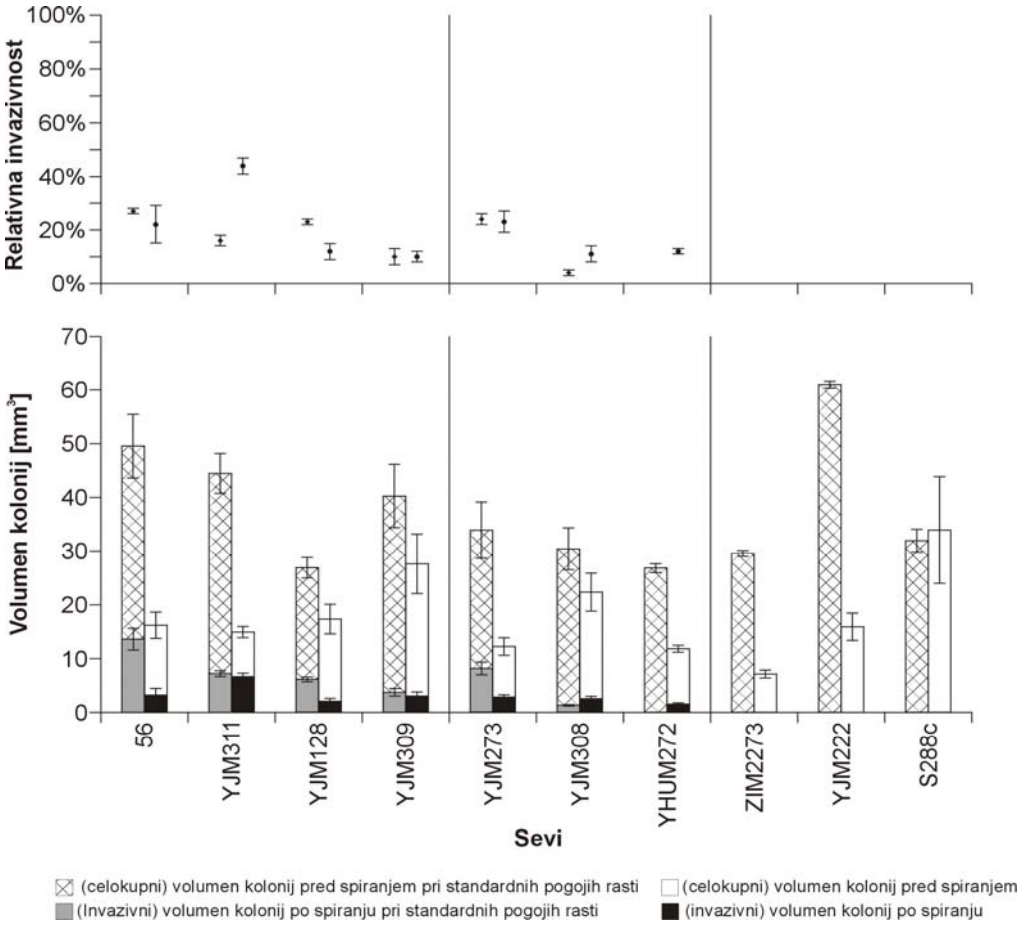
4.1.7 Volumni kolonij kvasovk inkubiranih na gojišču YPD z 0,01 % K-sorbatom



Slika 9: Relativna invazivnost in celokupni ter invazivni volumni kolonij sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309), manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) in neinvazivne (ZIM2273, YJM222, S288c) inkubiranih 4 dni pri 30 °C na gojišču YPD z 0,01 % dodatkom K-sorbata v primerjavi z istimi sevi inkubiranimi pri standardnih pogojih rasti (4 dni pri 30 °C na gojišču YPD).

Največji volumen kolonij pred spiranjem znaša 46,1 mm^3 ± 7,0 mm^3 (YJM128), najmanjši pa 22,0 mm^3 ± 0,4 mm^3 (S288c). Povprečni koeficient variacije znaša 9 %, z maksimalno vrednostjo 15 % (YJM128 in YJM308) in minimalno vrednostjo 0 % (ZIM2273).
Največji invazivni volumen kolonij po spiranju znaša 9,9 mm^3 ± 2,3 mm^3 (YJM128), najmanjši pa 0,0 mm^3 (ZIM2273, YJM222, S288c). Povprečni koeficient variacije za invazivne volumne po spiranju znaša 18 %, z maksimalno vrednostjo do 36 % (YJM308). Sevi ZIM2273, YJM222, S288c niso rasli invazivno pri izbranih eksperimentalnih pogojih. Največja relativna invazivnost znaša 28 % ± 5 % (YJM311). Povprečni koeficient variacije za relativno invazivnost znaša 16 % z maksimalno vrednostjo do 33 % (YJM308).

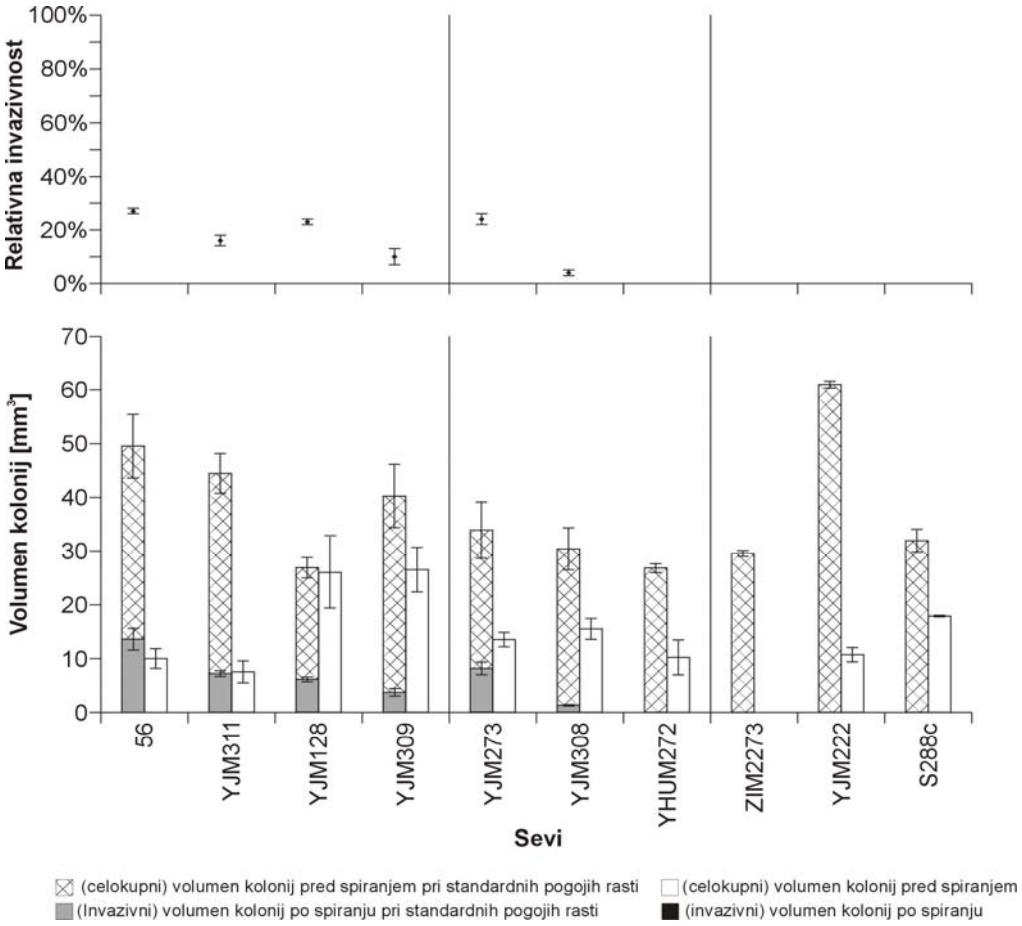
4.1.8 Volumni kolonij kvasovk inkubiranih na gojišču YPD z 0,1 % Na-benzoatom



Slika 10: Relativna invazivnost in celokupni ter invazivni volumni kolonij sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309), manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) in neinvazivne (ZIM2273, YJM222, S288c) inkubiranih 4 dni pri 30 °C na gojišču YPD z 0,1 % dodatkom Na-benzoata v primerjavi z istimi sevi inkubiranimi pri standardnih pogojih rasti (4 dni pri 30 °C na gojišču YPD).

Največji volumen kolonij pred spiranjem znaša 33,9 mm^3 ± 9,9 mm^3 (S288c), najmanjši pa 7,1 mm^3 ± 0,7 mm^3 (ZIM2273). Povprečni koeficient variacije znaša 15 %, z maksimalno vrednostjo 29 % (S288c) in minimalno vrednostjo 5 % (YHUM272).
Največji invazivni volumen kolonij po spiranju znaša 6,6 mm^3 ± 0,6 mm^3 (YJM311), najmanjši pa 0,0 mm^3 (ZIM2273, YJM222, S288c). Povprečni koeficient variacije za invazivne volumne po spiranju znaša 14 %, z maksimalno vrednostjo do 38 % (56). Sevi ZIM2273, YJM222, S288c niso rasli invazivno pri eksperimentalnih pogojih.
Največja relativna invazivnost znaša 44 % ± 3 % (YJM311). Povprečni koeficient variacije za relativno invazivnost znaša 14 % z maksimalno vrednostjo do 32 % (56).

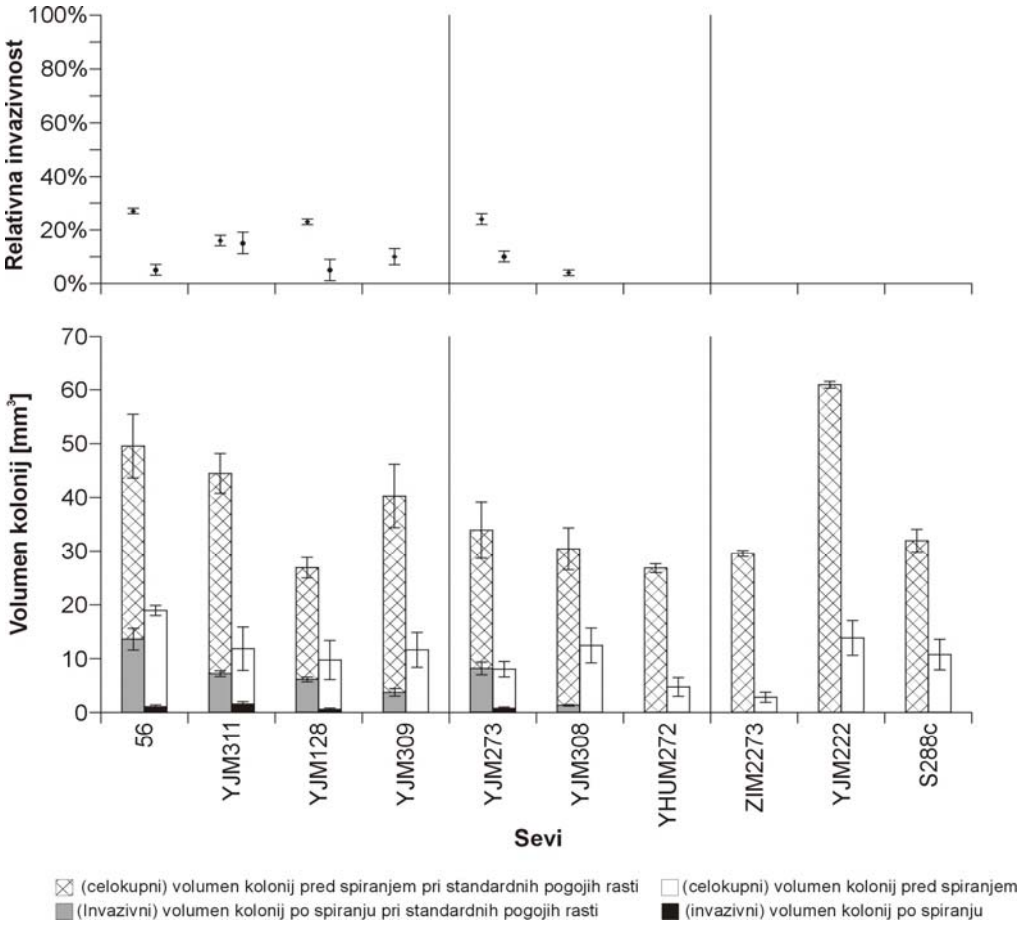
4.1.9 Volumni kolonij kvasovk inkubiranih na gojišču YPD z 0,1 % Na-bisulfitom



Slika 11: Relativna invazivnost in celokupni ter invazivni volumni kolonij sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309), manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) in neinvazivne (ZIM2273, YJM222, S288c) inkubiranih 4 dni pri 30 °C na gojišču YPD z 0,1 % dodatkom Na-bisulfita v primerjavi z istimi sevi inkubiranimi pri standardnih pogojih rasti (4 dni pri 30 °C na gojišču YPD).

Največji volumen kolonij pred spiranjem znaša 26,5 mm^3 ± 4,1 mm^3 (YJM309), najmanjši pa 0,0 mm^3 (ZIM2273). Povprečni koeficient variacije znaša 15 %, z maksimalno vrednostjo 31 % (YHUM272) in minimalno vrednostjo 0 % (ZIM2273).
Na gojišču YPD z 0,1 % Na-bisulfitom ni rasel invazivno nobeden izmed 10 sevov, sev ZIM2273 pa na omenjenem gojišču sploh ni rasel, niti na površini.

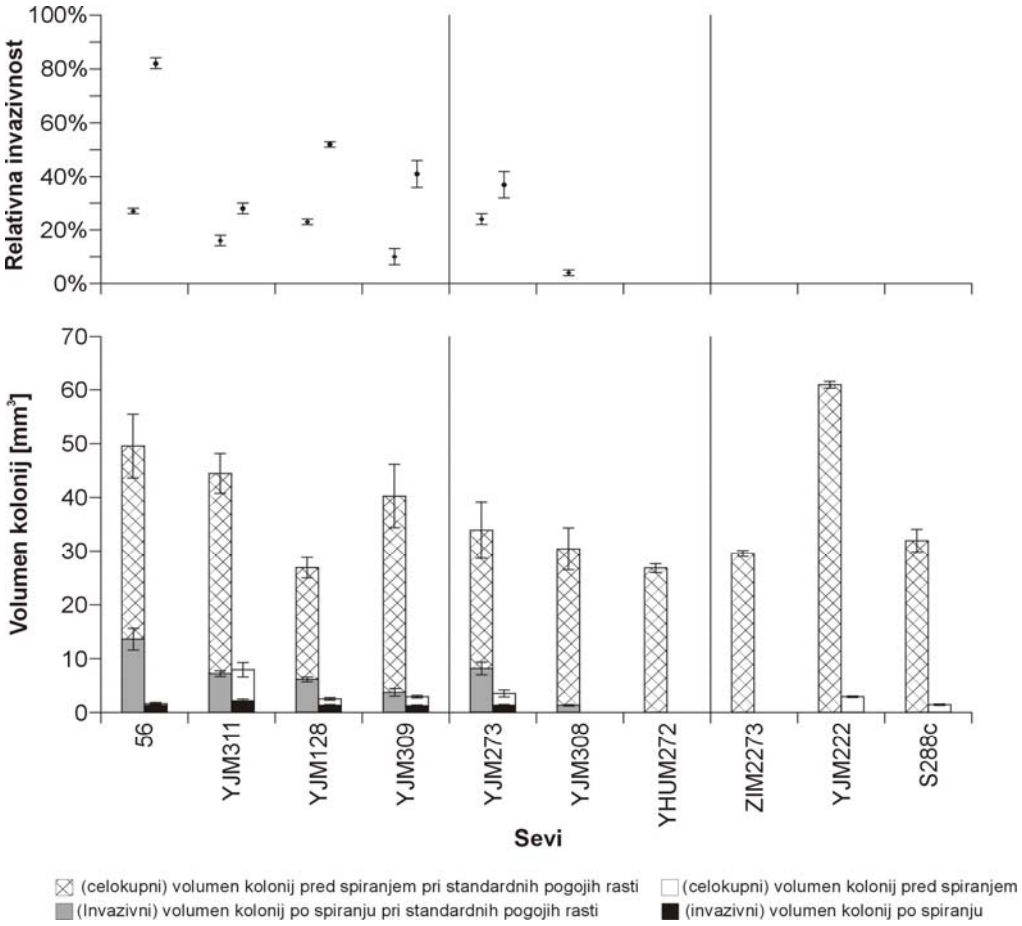
4.1.10 Volumni kolonij kvasovk inkubiranih na gojišču YPD, atmosfera s 15 % CO_2



Slika 12: Relativna invazivnost in celokupni ter invazivni volumni kolonij sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309), manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) in neinvazivne (ZIM2273, YJM222, S288c) inkubiranih 4 dni pri 30 °C na gojišču YPD v atmosferi s 15 % CO_2 v primerjavi z istimi sevi inkubiranimi pri standardnih pogojih rasti (4 dni pri 30 °C na gojišču YPD).

Največji volumen kolonij pred spiranjem znaša 18,9 mm^3 ± 0,9 mm^3 (56), najmanjši pa 2,8 mm^3 ± 0,9 mm^3 (ZIM2273). Povprečni koeficient variacije znaša 26 %, z maksimalno vrednostjo 37 % (YJM128) in minimalno vrednostjo 5 % (56).
Največji invazivni volumen kolonij po spiranju znaša 1,5 mm^3 ± 0,4 mm^3 (YJM311), najmanjši pa 0,0 mm^3 (YJM309, YJM308, YHUM272, ZIM2273, YJM222, S288c). Povprečni koeficient variacije za invazivne volumne po spiranju znaša 11 %, z maksimalno vrednostjo do 32 % (YJM128). Sevi YJM309, YJM308, YHUM272, ZIM2273, YJM222, S288c niso rasli invazivno pri izbranih eksperimentalnih pogojih.
Največja relativna invazivnost znaša 15 % ± 4 % (YJM311). Povprečni koeficient variacije za relativno invazivnost znaša 14 % z maksimalno vrednostjo do 68 % (YJM128).

4.1.11 Volumni kolonij kvasovk inkubiranih na gojišču SCLD



Slika 13: Relativna invazivnost in celokupni ter invazivni volumni kolonij sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309), manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) in neinvazivne (ZIM2273, YJM222, S288c) inkubiranih 4 dni pri 30 °C na gojišču SCLD v primerjavi z istimi sevi inkubiranimi pri standardnih pogojih rasti (4 dni pri 30 °C na gojišču YPD).

Največji volumen kolonij pred spiranjem znaša 7,9 mm^3 ± 1,3 mm^3 (YJM311), najmanjši pa 0 mm^3 (YJM308, YHUM272, ZIM2273). Povprečni koeficient variacije znaša 7 %, z maksimalno vrednostjo do 17 % (YJM273).
Največji invazivni volumen kolonij po spiranju znaša 2,1 mm^3 ± 0,3 mm^3 (YJM311), najmanjši pa 0,0 mm^3 (YJM308, YHUM272, ZIM2273, YJM222, S288c). Povprečni koeficient variacije za invazivne volumne po spiranju znaša 5 %, z maksimalno vrednostjo do 15 % (56). Največja relativna invazivnost znaša do 82 % ± 2 % (56). Povprečni koeficient variacije za relativno invazivnost znaša 4 % z maksimalno vrednostjo do 14 % (YJM273). Pri izbranih eksperimentalnih pogojih nista rasla invazivno seva YJM222 in S288c, sevi YJM308, YHUM272, ZIM2273 pa na gojišču SCLD niso rasli.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V nalogi smo preverili vpliv intrinzičnih oz. ekstrinzičnih faktorjev, ki nastopajo v okolju mikroorganizma. V ta namen smo uporabili "kvantitativni test invazivnosti na agarju" (Zupan in Raspor, 2008), ki omogoča kvantitativno opredelitev invazivne rasti v trdno gojišče. Izhajali smo iz delovne hipoteze in ugotavljali, ali imajo izbrani okoljski dejavniki različen vpliv na invazivno rast invazivnih sevov kot tudi na rast neinvazivnih sevov *S. cerevisiae*.

5.1 RAZPRAVA

V diplomskem delu so bili testirani sevi *S. cerevisiae* (Preglednica 1; 3.1.1), izbrani na osnovi stopnje invazivnosti in razdeljeni v tri skupine. V prvi skupini so bili sev 56, ki velja za zelo invazivnega in sevi YJM311, YJM128, YJM309, ki veljajo za zelo virulentne (Byron in sod., 1995; McCusker in sod., 1994a,b). V drugi skupini so bili sevi YJM273, YHUM272 in YJM308, ki veljajo za manj virulentne (Byron in sod., 1995; McCusker in sod., 1994a,b; Lo in Dranginis, 1998). V tretji pa seva YJM222 in S228c, ki veljata za nevirulentna/neinvazivna in sev ZIM2273, ki velja za neinvazivnega (McCusker in sod., 1994a,b; Lo in Dranginis, 1998; Liu in sod., 1996). Kot standardne pogoje rasti smo določili gojišče YPD in inkubacijo pri 30 °C. Pri tem pogoju je bila, kot je razvidno iz Slike 3, relativna invazivnost sevov v skladu s poročano invazivnostjo (Preglednica 1).

Izbrani virulentni sevi kvasovk se, glede na informacije objavljene v literaturi, lahko razmnožujejo v možganih imunokompetentnih laboratorijskih miši in tam 28 dni vztrajajo v znatnem številu (Clemons in sod., 1994). Invazivni sevi so tisti sevi, ki so bili sposobni prodiranja v agar na podlagi objavljenih rezultatov testa invazivne rasti v agar.

Izmerjene absolutne vrednosti celokupnega volumna oz. invazivnega dela kolonije seva nam dajejo informacije o intenziteti rasti oz. invazivni rasti seva pri izbranih pogojih kultivacije. Relativna invazivnost, ki je kvocient med invazivnim volumnom kolonij po spiranju in celokupnim volumnom kolonij pred spiranjem pa nam daje podatek o preferenci rasti seva v določen del gojišča. Pri določenem okoljskem dejavniku sevi s povečano relativno invazivnostjo, glede na standardne pogoje kultivacije, izražajo prednostno invazivno rast v gojišče, sevi z zmanjšano relativno invazivnostjo pa prednostno rast na površini gojišča.

5.1.1 Vpliv temperature na invazivno rast kvasovk

Glede na dobljene rezultate znižanje temperature rasti (26 °C) vpliva na zmanjšanje celokupnega volumna izbranih sevov. Nižja temperatura rasti je pri zelo invazivnih sevih povzročila različno stopnjo zmanjšanja celokupnih volumnov kolonij. Glede na standardne pogoje rasti se je pri treh sevih občutno zmanjšala invazivna rast – sev YJM309 ni rasel invazivno, pri sevu YJM128 pa se je invazivna rast povečala. Znižanje temperature je glede na standardne pogoje rasti imelo različen vpliv na relativno invazivnost sevov, saj se je znotraj skupine relativna invazivnost odražala različno – se je znižala ali pa zvišala. Iz rezultatov ne moremo sklepati o vplivu nižje temperature na relativno invazivnost vrste S. *cerevisiae* (glej Sliko 4).

Znižanje temperature rasti je v primeru manj invazivnih sevov prav tako vplivalo na različno stopnjo zmanjšanja celokupnih volumnov kolonij. Invazivna rast v gojišče se je v primerjavi s standardnimi pogoji zmanjšala pri sevu YJM273 in povečala pri sevu YJM308. Pri sevu YHUM272 invazivne rasti ni bilo. Spremembe v relativni invazivnosti pa so bile tako kot invazivna rast pri teh sevih različne; gre za zmanjšanje ali povečanje relativne invazivnosti (glej Sliko 4).

Izbrani neinvazivni sevi so izražali rast le na površini gojišča. Znižanje temperature rasti se je odrazilo v različni stopnji zmanjšanja celokupnih volumnov posameznih sevov (glej Sliko 4).

Višja temperatura rasti (37 °C) je imela različen vpliv na celokupni in na invazivni volumen kolonij močno invazivnih sevov. V primerjavi s standardnimi pogoji se je pri določenih sevih celokupni volumen povečal, pri drugih pa zmanjšal. Kjer se je celokupni volumen povečal, se je povečal tudi invazivni volumen kolonij, kjer pa je bil celokupni volumen manjši, se je zmanjšal tudi invazivni volumen kolonij. Višja temperatura rasti je v primerjavi s standardnimi pogoji rasti povzročila znižanje relativne invazivnosti zelo invazivnih sevov razen pri sevu YJM128, kjer je relativna invazivnost ostala enaka. Sevom, ki so bili izolirani iz človeškega telesa, razen sevu YJM309, ki je bil izoliran iz krvi, se je pri 37 °C povečal celokupni volumen kolonij (glej Tabelo 1 in Sliko 5).

V primeru sevov, ki veljajo za manj invazivne, je povišana temperatura rasti povzročila različno stopnjo povečanja celokupnega volumna kolonij. Kjer je bila prisotna invazivna rast, se je invazivni volumen zmanjšal (sev YJM273) ali pa je ostal nespremenjen. V primerjavi z rastjo pri 30 °C se je tudi relativna invazivnost zmanjšala (sev YJM273) ali pa je ostala enaka (glej Sliko 5). Manjša relativna invazivnost ob zvišanju temperature kaže na manjšo preferenco rasti sevov v agar ob tovrstni spremembi v okolju.

Znotraj skupine neinvazivnih sevov je zvišanje temperature rasti sevno specifično vplivalo na spremembo celokupnega volumna in sicer na zmanjšane oz. na zvišanje celokupnega volumna. Sevi so rasli le na površini gojišča. Dva seva (YJM222 in S288c) sta pri teh pogojih tvorila večje kolonije kot pri 30 °C, sev (ZIM2273) pa manjše (glej Sliko 5).

5.1.2 Vpliv pH na invazivno rast kvasovk

Glede na dobljene rezultate je nižji pH gojišča vplival na zmanjšanje celokupnih volumnov večine (devetih) sevov in večinoma zniževal invazivno rast. Sev YJM311, ki je bil izoliran iz človekovega žolčevoda, je bil ob nižjem pH edini s povečanim celokupnim volumnom kolonij (glej Sliko 6 in Tabelo 1).

Vsi invazivni volumni kolonij zelo invazivnih sevov so se različno zmanjšali, sev YJM311 (izoliran iz človeškega žolčevoda) pa ni več rasel invazivno. Iz rezultatov ugotavljamo, da ima pri zelo invazivnih sevih nizek pH gojišča neenoten vpliv na relativno invazivnost teh sevov, saj se le-ta zniža oz. zviša (glej Sliko 6).

Kisel pH gojišča je povzročil različno stopnjo zmanjšanja celokupnih volumnov kolonij in prekinitev invazivne rasti manj invazivnih sevov - seva YJM273 in YJM308 (oba sta bila izolirana iz človeka) nista več rasla invazivno v agar (glej Sliko 6 in Tabelo 1).

Neinvazivni sevi so na gojišču s pH 4 tvorili kolonije z zmanjšanim celokupnim volumnom in niso rasli invazivno (glej Sliko 6).

V primeru gojišča s pH 8 so se, glede na standardne pogoje rasti, celokupni volumni kolonij zelo invazivnih sevov spreminjali različno glede na sev ter so se povečali oz. zmanjšali. Prav tako so bile različne tudi spremembe v invazivnih volumnih, ki so se povečali oz. zmanjšali. Enako kot se je spremenil invazivni volumen se je pri istih sevih spremenila (povečala ali zmanjšala) tudi relativna invazivnost. Iz rezultatov ne moremo sklepati o vplivu gojišča s pH 8 na rast zelo invazivnih sevov kvasovk, kajti celokupni volumen, invazivni volumen in relativna invazivnost so se odražali različno, odvisno od seva (glej Sliko 7).

Na bazičnem gojišču se je v primerjavi s standardnimi pogoji rasti celokupni volumen in invazivni volumen manj invazivnih sevov spreminjal različno, odvisno od seva se je zmanjšal pri enih in povečal pri drugih. Vsi sevi so rasli invazivno v agar. Tudi sev YHUM272, ki pri standardnih pogojih ni rasel invazivno, je pri višjem pH začel rasti invazivno v gojišče. Relativna invazivnost je sevno specifična, saj se je povečala oz. pri nekaterih sevih zmanjšala. V primeru seva YJM308 je bila relativna invazivnost višja kot pri standardnih pogojih rasti, pri sevu YJM273 pa se je relativna invazivnost zmanjšala (glej Sliko 7).

Neinvazivni sevi so tvorili kolonije le na površini bazičnega gojišča. Celokupni volumen je bil v primerjavi s standardnimi pogoji rasti pri različnih sevih različen in se je pri sevu S288c povečal, pri ostalih dveh pa zmanjšal (glej Sliko 7).

5.1.3 Vpliv NaCl na invazivno rast kvasovk

Na zelo invazivne seve je dodatek NaCl v koncentraciji 0,1 % v gojišče neenotno vplival na celokupni in invazivni volumen kolonij ter na relativno invazivnost sevov, saj so se izmerjeni parametri povečali oz. zmanjšali odvisno od seva. Pri sevu YJM128 je dodatek NaCl vplival na drastično povečanje celokupnega volumna. V primerjavi s standardnimi pogoji so trije sevi rasli invazivno v gojišče, sev YJM309 pa ni rasel v gojišče. Enako kot so se ob dodatku soli spremenili (povečali ali zmanjšali) celokupni volumni, so se pri istih sevih spremenili tudi invazivni volumni kolonij. Relativna invazivnost se je v primerjavi s standardnimi pogoji rasti znotraj te skupine sevov odražala različno, odvisno od seva: pri nekaterih se je povečala, pri drugih sevih pa zmanjšala. Sevu 56, ki je bil izoliran iz danskega sira s plemenito plesnijo (halofilni pogoji), so se celokupni in invazivni volumen ter relativna invazivnost povečali (glej Sliko 8 in Tabelo 1).

V primeru manj invazivnih sevov se je v primerjavi s standardnimi pogoji rasti pod vplivom NaCl v gojišču celokupni volumen sevov YJM308 in YHUM272 močno povečal – slednjemu se je celokupni volumen kolonij povečal do štirikrat – in zmanjšal pri sevu YJM273. Invazivni volumen kolonij se je v primerjavi s standardnimi pogoji spreminjal

različno in sicer se je povečal, zmanjšal ali pa ostal nespremenjen. Prav tako tudi relativna invazivnost, ki se je v primerjavi s standardnimi pogoji rasti pri nekaterih sevih zvišala, pri drugih znižala, ali pa ostala nespremenjena (glej Sliko 8).

NaCl v gojišču je vplival na različno stopnjo zmanjšanja celokupnega volumna kolonij vseh neinvazivnih sevov. Na površini so tvorili manjše kolonije od ostalih sedmih sevov, kar kaže, da so ti sevi verjetno najbolj občutljivi na prisotnost NaCl in spremenjeno vodno aktivnost gojišča (glej Sliko 8).

Za boljše sklepe bi potrebovali razširjen eksperiment z različnimi koncentracijami soli. Predhodni poskusi so pokazali, da sol v višjih koncentracijah preprečuje invazivno rast, kar nakazuje zelo invaziven sev YJM309, ki v našem primeru ni več rasel invazivno v agar.

5.1.4 Vpliv v gojišču prisotnih konzervansov na invazivno rast kvasovk

Glede na dobljene rezultate je dodatek K-sorbata v gojišče vplival na zmanjšanje celokupnega volumna večine (osmih) sevov. Na gojiščih s K-sorbatom se je pod vplivom konzervansa celokupni volumen kolonij zelo invazivnih sevov v primerjavi s standardnimi pogoji spreminjal tako, da se je pri sevu YJM128 volumen povečal, pri ostalih treh pa zmanjšal. Invazivni volumen kolonij se je glede na standardne pogoje povečal pri treh sevih in zmanjšal pri sevu 56. Prav tako je v primerjavi z rastjo pri standardnih pogojih K-sorbat na relativno invazivnost sevov deloval različno glede na sev; relativna invazivnost nekaterih se je povečala, drugih zmanjšala (glej Sliko 9).

Pri manj invazivnih sevih se je pod vplivom dodanega K-sorbata celokupni volumen vseh kolonij različno zmanjšal. V primerjavi s standardnimi pogoji rasti se je invazivni volumen kolonij pri dveh manj invazivnih sevih (YJM273 in YJM308) znižal, sev YHUM272, ki pri standardnih pogojih rasti ni rasel v agar, pa je v teh pogojih rasel invazivno v gojišče. Pod vplivom K-sorbata se je pri istih sevih enako spremenila tudi relativna invazivnost (glej Sliko 9).

Na celokupni volumen kolonij neinvazivnih sevov je dodatek K-sorbata vplival različno, odvisno od seva; nekateri volumni so se povečali in drugi zmanjšali. Povečana rast je bila prisotna pri neinvazivnemu sevu ZIM2273 (glej Sliko 9).

Dodatek Na-benzoata (0,1 %) je precej močneje kot dodatek K-sorbata (0,01%) vplival na zmanjšanje rasti devetih izbranih sevov. Celokupni volumen kolonij vseh zelo invazivnih sevov se je na gojiščih z Na-benzoatom v primerjavi s standardnim pogojem rasti za različno stopnjo zmanjšal. Prav tako se je zmanjšal tudi invazivni volumen kolonij. Prisotnost Na-benzoata v gojišču je imela na relativno invazivnost sevov, ki veljajo za zelo invazivne različen vpliv v primerjavi s standardnimi pogoji rasti. Ne glede na zmanjšanje celokupnih in invazivnih volumnov se je relativna invazivnost pri dveh sevih znižala (56 in YJM128), pri sevu YJM311 zvišala in ostala nespremenjena pri sevu YJM309 (glej Sliko 10).

Tudi pri vseh manj invazivnih sevih je Na-benzoat vplival na različno zmanjšanje celokupnega volumna kolonij. Dodatek konzervansa v gojišče je imel različen učinek na

invazivne volumne sevov; volumni so se povečali ali zmanjšali. Na invazivno rast seva YJM273 je imel dodatek konzervansa zaviralni učinek, pri sevu YJM308 se je invazivna rast v gojišče povečala, pri sevu YHUM272 pa je dodatek Na-benzoata povzročil invazivno rast. Relativna invazivnost se je spreminjala na enak način (povečala, zmanjšala) kot invazivni volumen kolonij (glej Sliko 10).

V primerjavi s standardnimi pogoji rasti je pri neinvazivnih sevih dodatek Na-benzoata močno zaviral rast, sevu S228c pa se je celokupni volumen kolonij zvečal (glej Sliko 10).

Dodatek Na-bisulfita je vplival na zmanjšanje rasti in popolno odsotnost invazivne rasti vseh izbranih sevov, kar kaže na veliko učinkovitost konzervansa pri surpresiji invazivne rasti. Celokupni volumni kolonij so se v primerjavi s standardnimi pogoji rasti zmanjšali za različne stopnje. Najmanj se je pod vplivom Na-bisulfita zmanjšala rast sevu YJM128. Konzervans je popolnoma inhibiral rast kolonij v gojišče. Podoben učinek je konzervans imel na manj invazivne seve in na neinvazivne seve, katerim se je zmanjšal celokupni volumen kolonij. Dodatek Na-bisulfita v gojišče je preprečil rast sevu ZIM2273, ki se genetsko razlikuje od ostalih sevov (glej Sliko 11 in Preglednico 1).

5.1.5 Vpliv CO_2 na invazivno rast kvasovk

Želeli smo preveriti, kako na invazivnost kvasovk vpliva atmosfera s povečanim deležem CO_2, zato smo nacepljene seve med rastjo prepihovali s plinom – sintetični zrak iz jeklenke s 15 % deležem CO_2. Rezultati kažejo, da je pri vseh sevih CO_2 vplival na zmanjšanje invazivne rasti v agar.

Glede na dobljene rezultate je povišana vsebnost CO_2 v atmosferi vplivala na zmanjšanje celokupnega volumna vseh izbranih sevov in na zmanjšano invazivno rast sevov. Povišana vsebnost CO_2 v atmosferi se je pri zelo invazivnih sevih v primerjavi s standardnimi pogoji rasti odražala kot zmanjšanje invazivnega volumna kolonij do različne stopnje. Sev YJM309, ki je bil izoliran iz človeške krvi, v taki atmosferi ni rasel invazivno v gojišče. Relativna invazivnost zelo invazivnih sevov se je do različne stopnje zmanjšala in sicer pri vseh, ki so rasli invazivno v agar (glej Sliko 12).

Pri manj invazivnih sevih je povečan delež CO_2 v atmosferi povzročil zmanjšanje celokupnega volumna in invazivnega volumna kolonij. Nižja invazivna rast - v primerjavi z rastjo pri standardnih pogojih - je bila prisotna le pri enem od manj invazivnih sevov (YJM273). Sev YJM308, ki je bil izoliran iz pankreasne tekočine človeka, pa ni več rasel invazivno v agar, za razliko od rasti pri standardnih pogojih. Pod vplivom večjega deleža CO_2 se je pri sevih, kjer je bila prisotna, v primerjavi s standardnimi pogoji rasti, relativna invazivnost znižala. Kaže, da povišana vsebnost CO_2 v atmosferi vpliva na zmanjšano preferenco rasti sevov v agar (glej Sliko 12).

Tudi pri neinvazivnih sevih je atmosfera s CO_2 povzročila drastično zmanjšanje celokupnega volumna kolonij v primerjavi s standardnimi pogoji (glej Sliko 12).

5.1.6 Vpliv pomanjkanja hranil v gojišču na invazivno rast kvasovk

Z gojiščem SCLD smo želeli ugotoviti, kako pomanjkanje ogljika vpliva na rast kvasovk.

Glede na dobljene rezultate je pomanjkanje vira ogljika v gojišču povzročilo močno zmanjšanje rasti vseh izbranih sevov. Prav tako je pomanjkanje hranila vplivalo na slabšo invazivno rast v gojišče, oziroma jo je popolnoma zavrlo. Pomanjkanje vira ogljika v gojišču je zaviralo invazivno rast zelo invazivnih sevov. Celokupni in invazivni volumni kolonij vseh sevov te skupine so se v primerjavi s standardnimi pogoji zelo zmanjšali in sicer za različno stopnjo. Pomanjkanje ogljika v gojišču je pri zelo invazivnih oz. invazivnih sevih vplivalo na močno povečano relativno invazivnost., najbolj v primeru seva 56, ki je tvoril na površini gojišča najmanjše kolonije, kar kaže na to, da v primerjavi z rastjo sevov pri standardnih pogojih rasti pomanjkanje ogljika v gojišču vpliva na povečano relativno invazivnost. Sevi prednostno rasejo v agar in ne na površini agarja (glej Sliko 13).

Pomanjkanje vira ogljika je pri manj invazivnih sevih zaviralo rast kolonij. Dva seva na tem gojišču nista rasla, celokupni volumen seva YJM273 se je zelo zmanjšal. Zmanjšal se je tudi invazivni volumen istega seva, a se je relativna invazivnost v primerjavi s standardnimi pogoji povečala (glej Sliko 13).

Pri neinvazivnih sevih je pomanjkanje vira ogljika preprečevalo rast sevu ZIM2273 in vplivalo na zmanjšan celokupni volumen pri ostalih dveh sevih (glej Sliko 13).

5.1.7 Relativna invazivnost izstopajočih sevov

Preglednica 2: Relativne invazivnosti sevov *S. cerevisiae*, ki veljajo za zelo invazivne (56, YJM311, YJM128, YJM309) in manj invazivne (YJM273, YJM308, YHUM272) pri vseh 11 testiranih pogojih rasti.

Pogoji rasti	Sevi						
	56	YJM311	YJM128	YJM309	YJM273	YJM308	YHUM272
YPD 30 °C	**27%**	16%	23%	10%	24%	4%	0%
YPD 26 °C	11%	19%	**32%**	0%	12%	16%	0%
YPD 37 °C	13%	15%	**23%**	5%	13%	4%	0%
YPD pH 4	18%	0%	**26%**	13%	0%	0%	0%
YPD pH 8	23%	15%	**37%**	15%	17%	9%	4%
YPD 0,1 % NaCl	**32%**	13%	30%	0%	13%	5%	0%
YPD+0,01 % K-sorbat	16%	**28%**	21%	15%	17%	3%	4%
YPD+0,1 % Na-benzoat	22%	**44%**	12%	10%	23%	11%	12%
YPD+0,1 % Na-bisulfit	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
YPD 15 % CO_2	5%	**15%**	5%	0%	10%	0%	0%
SCLD	**82%**	28%	52%	41%	37%	0%	0%

V Preglednici 2 so predstavljene relativne invazivnosti pri 11 različnih pogojih rasti in sicer za 4 seve, ki veljajo za zelo invazivne in za 3 seve, ki veljajo za manj invazivne. Krepko so zapisani podatki o relativni invazivnosti za sev, ki je pri danem eksperimentalnem pogoju rasti imel najvišjo relativno invazivnost izmed vseh sevov. Za seve, ki so največkrat imeli najvišjo relativno invazivnost, so se izkazali sev 56, izoliran iz danskega sira s plemenito plesnijo, sev YJM311 izoliran iz pljuč človeka z AIDS-om in sev YJM128 izoliran iz človeške krvi.

5.2 SKLEPI

Preveriti smo želeli, kako izbrani okoljski dejavniki vplivajo na invazivno rast invazivnih (virulentnih) sevov kot tudi na rast neinvazivnih sevov *S. cerevisiae*. Glede na dobljene rezultate lahko podamo naslednje sklepe:

- Znižanje temperature rasti, dodatek Na-bisulfita v gojišče, povišana vsebnost CO_2 v atmosferi in pomanjkanje vira ogljika v gojišču vplivajo na zmanjšanje celokupnih volumnov vseh izbranih sevov.

- Ostali testirani pogoji rasti imajo različen učinek na spremembo celokupnih volumnov testiranih sevov, ki se odraža kot povečanje ali zmanjšanje volumnov.

- Vsi pogoji rasti imajo različne učinke na invazivno rast in s tem na invazivni volumen testiranih sevov, kjer je invazivna rast prisotna se v primerjavi s standardnimi pogoji rasti odraža kot povečanje ali zmanjšanje relativne invazivnosti, v nekaterih primerih pa ta ostane nespremenjena.

- Dodatek 0,1 % Na-bisulfita gojišču popolnoma inhibira invazivno rast vseh testiranih sevov.

- Sevi, ki veljajo za neinvazivne pričakovano v nobenem primeru niso rasli v gojišče.

- Najvišje relativne invazivnosti imajo izmed 10 testiranih sevov pri posameznih pogojih rasti sevi 56, YJM311 in YJM128.

6 POVZETEK

V pričujoči nalogi smo ugotavljali, kako vplivajo različni okoljski dejavniki na celokupno in invazivno rast v gojišče ter na relativno invazivnost desetih sevov *S. cerevisiae* v gojišče. Rast sevov pri posameznem testiranem okoljskem dejavniku smo primerjali s standardnim pogojem rasti - z inkubacijo na gojišču YPD pri 30 °C. Testirani dejavniki so bili različne temperature rasti, pH vrednosti gojišča, nizka a_w vrednost gojišča, pomanjkanje vira ogljika v gojišču, vpliv prisotnosti K-sorbata, Na-benzoata, Na-bisulfita v gojišču in vpliv atmosfere z večjim deležem CO_2. Za preučevanje omenjenih dejavnikov smo uporabili test invazije kvasnih celic v agar. Kvasne seve smo s pomočjo cepilne zanke nacepili na trdna gojišča in 4 dni inkubirali pri ustreznih eksperimentalnih pogojih. Nadalje smo s pomočjo videosistema posneli različne makromorfološke dele kolonij: najprej smo ugotavljali celokupne volumne kolonij kvasovk, ki so rasle na agarju, po spiranju z destilirano vodo pa še invazivne dele kolonij, če so bile prisotne v gojišču. S slednjim smo ugotavljali invazivne volumne. Dobljene posnetke smo obdelali z računalniško programsko opremo in jih z grafi predstavili posebej za vsak eksperimentalni dejavnik skupaj s standardnim pogojem rasti. Glede na podatke iz literature smo izbrali skupine zelo invazivnih, manj invazivnih in neinvazivnih sevov kvasovk. Glede na standardni pogoj rasti smo ugotovili, da je na stopnjo invazivne rasti sevov v agar vsak eksperimentalni pogoj vplival drugače in sicer kot povečanje ali zmanjšanje invazivne rasti. V skladu s poročano invazivnostjo so najbolj invazivno v gojišče rasli zelo invazivni sevi, manj invazivni sevi so slabo rasli invazivno v gojišče, neinvazivni sevi pa v nobenem primeru niso rasli invazivno v gojišče. Znižanje temperature rasti, dodatek Na-bisulfita v gojišče, povišana vsebnost CO_2 v atmosferi in pomanjkanje vira ogljika v gojišču so vplivali na zmanjšanje celokupnih volumnov izbranih sevov, ostali testirani pogoji rasti pa so imeli različen učinek na spremembo celokupnih volumnov, ki se je odražal kot povečanje ali zmanjšanje volumnov. Testirani pogoji rasti so na invazivno rast imeli različne učinke, v primeru, ko smo gojišču dodali Na-bisulfit, pa pri nobenem sevu ni bilo invazivne rasti v agar. Kjer je bila prisotna invazivna rast se v primerjavi s standardnimi pogoji rasti odražala kot povečanje ali zmanjšanje relativne invazivnosti (RI), v nekaterih primerih pa je ta ostala nespremenjena. Relativna invazivnost se je pri znižanju temperature pri zelo invazivnih in manj invazivnih sevih znižala oz. zvišala. Zvišanje temperature rasti je povzročilo znižanje RI pri zelo invazivnih sevih in pri nekaterih manj invazivnih sevih. Nizek pH je vplival na znižanje oz. zvišanje RI pri zelo invazivnih sevih, pri manj invazivnih sevih pa je vplival na odsotnost invazivne rasti. Visoka vrednost pH je vplivala na znižanje oz. zvišanje RI zelo invazivnih in manj invazivnih sevov. Dodatek NaCl v gojišče je vplival na povečanje oz. zmanjšanje RI pri zelo invazivnih oz. invazivnih sevih in pri manj invazivnih sevih. K-sorbat in Na-benzoat sta vplivala na zvišanje oz. znižanje RI zelo invazivnih sevov in manj invazivnih sevov. Povišana vsebnost CO_2 v atmosferi se je pri zelo invazivnih oz. zelo invazivnih sevih odrazila kot znižanje RI, eden od sevov pa ni rasel invazivno v agar. Pri manj invazivnih sevih je večji delež CO_2 v atmosferi podobno vplival na znižanje RI, eden od sevov pa ni rasel invazivno v agar. Pomanjkanje ogljika v gojišču je pri zelo invazivnih sevih vplivalo na večjo RI, prav tako pri enem izmed manj invazivnih sevov, ostalima sevoma pa je pomanjkanje vira ogljika preprečilo rast.

7 VIRI

Barrales R. R., Jimenez J., Ibeas J. I. 2007. Identification of novel activation mechanisms for FLO11 regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 178, 1: 145 – 156.

Bony M., Thines-Sempoux D., Barre P., Blondin B. 1997. Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. Journal of Bacteriology, 179, 15**:** 4929 – 4936.

Breitkreutz A., Boucher L., Breitkreutz B.-J., Sultan M., Jurisica I., Tyers M. 2003. Phenotypic and transcriptional plasticity directed by a yeast mitogen-activated protein kinase network. Genetics, 165, 3: 997 – 1015.

Byron J. K., Clemons K. V., McCusker J. H., Davis R. W., Stevens D. A. 1995. Pathogenicity of *Saccharomyces cerevisiae* in complement factor five-deficient mice. Infection and Immunity, 63, 2: 478 – 485.

Cassone M., Serra P., Mondello F., Girolamo A., Scafetti S., Pistella E., Venditti M. 2003. Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* subtype boulardii fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism. Journal of Clinical Microbiology, 41, 11: 5340 – 5343.

Clemons K. V., McCusker J. H., Davis R. W., Stevens D. A. 1994. Comparative pathogenesis of clinical and nonclinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Infectous Diseases, 169, 4: 859 – 867.

Cullen P. J., Sprague G. F. 2000. Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97, 25: 13619 – 13624.

Dickinson J. R. 1994. Irreversible formation of pseudohyphae by haploid *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Letters, 199, 1-2: 99 – 103.

Dickinson J. R. 1996. "Fusel" alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeasts. Microbiology, 142, 6: 1391–1397.

Enache-Angoulvant A., Hennequin C. 2005. Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review. Clinical Infectious Diseases, 41, 11: 1559 – 1568.

Fichtner L., Schulze F., Braus G. H. 2007. Differential Flo8p-dependent regulation of *FLO1* and *FLO11* for cell–cell and cell–substrate adherence of *S. cerevisiae* S288c. Molecular Microbiology,, 66, 5: 1276 – 1289.

Fidalgo M., Barrales R. R., Ibeas J. I., Jimenez J. 2006. Adaptive evolution by mutations in the FLO11 gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103, 30: 11228 – 11233.

Gagiano M., Bauer F.F., Pretorius I.S. 2002. The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research, 2, 4: 433 – 470.

Gimeno C. J., Ljungdahl P. O., Styles C. A., Fink G. R. 1992. Unipolar cell divisions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. Cell, 68, 6: 1077 – 1090.

Govender P., Domingo J. L., Bester M. C., Pretorius I. S., Bauer F.F. 2008. Controlled expression of the dominant flocculation genes *FLO1*, *FLO5*, and *FLO11* in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology, 74, 19: 6041 – 6052.

Guilliermond A. 1920. The yeasts. New York, John Wiley and Sons: 424 str.

Guo B., Styles C. A., Feng Q., Fink G. R. 2000. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97, 22: 12158 – 12163.

Halme A., Bumgarner S., Styles C., Fink G. R. 2004. Genetic and epigenetic regulation of the *FLO* gene family generates cell-surface variation in yeast. Cell, 116, 3: 405 – 415.

Jansen G., Bühring F., Hollenberg C. P., Ramezani R. M. 2001. Mutations in the SAM domain of STE50 differentially influence the MAPK-mediated pathways for mating, filamentous growth and osmotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Genetics and Genomics, 265, 1: 102 – 117.

Kopecka M., Gabriel M. 1992. The influence of congo red on the cell wall and (1,3)-β-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Archives of Microbiology, 158, 2, 115 – 126.

Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 249 str.

Kron S. J. 1997. Filamentous growth in budding yeast. Trends in Microbiology, 5, 10: 450 – 454.

Lengeler K. B., Davidson R. C., D'souza C., Harashima T., Shen W.-C., Wang P., Pan X., Waugh M., Heitman J. 2000. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64, 4: 746 – 785.

Likar M. 1987. Mikrobiologija. Ljubljana, Cankarjeva založba: 390 str.

Liu H., Styles C. A., Fink G. R. 1996. *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in FLO8, a gene required for filamentous growth. Genetics, 144, 3: 967 – 978.

Lo W.-S., Dranginis A. M. 1998. The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Biology of the Cell, 9, 1: 161 – 171.

Lorenz M. C., Cutler N. S., Heitman J. 2000. Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae.* Molecular Biology of the Cell, 11, 1: 183 – 199.

Madhani H. D., Fink G. R. 1998. The control of filamentous differentiation and virulence in Fungi. Trends in Cell Biology, 8, 9: 348 – 353.

Madhani H. D., Galitski T., Lander E. S., Fink G. R. 1999. Effectors of a developmental mitogen-activated protein kinase cascade revealed by expression signatures of signaling mutants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96, 22: 12530 – 12535.

McCusker J. H., Clemons K. V., Stevens D. A., Davis R. W. 1994a. Genetic characterization of pathogenic *Saccharomyces cerevisiae* isolates. Genetics, 136, 4: 1261 – 1269.

McCusker J.H., Clemons K.V., Stevens D.A., Davis R.W. 1994b. *Saccharomyces cerevisiae* virulence phenotype as determined with CD-1 mice is associated with the ability to grow at 42 degrees C and form pseudohyphae. Infection and Immunity, 62, 12: 5447 – 5455.

Roberts R. L., Fink G. R. 1994. Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. Genes & Developement, 8, 24: 2974 – 2985.

Roberts C. J., Nelson B., Marton M. J., Stoughton R., Meyer M. R., Bennett H. A., He Y. D., Dai H., Walker W. L., Hughes T. R., Tyers M., Boone C., Friend S. H. 2000. Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. Science, 287, 5454: 873 – 880.

Sengupta N., Vinod P. K., Venkatesh K.V. 2007. Crosstalk between cAMP-PKA and MAP kinase pathways is a key regulatory design necessary to regulate FLO11 expression. Biophysical Chemistry, 125, 1: 59 – 71.

Stratford M. 1989. Evidence for two mechanisms of flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 5, sp. iss., 441 – 445.

Verstrepen K. J., Klis F. M. 2006. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. Molecular Microbiology, 60, 1: 5 – 15.

Walker G. M. 2000. Yeasts. V: Ecyclopedia of microbiology. Vol. 4. 2nd ed. Lederberg J. (ed.). San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Academic press: 939 – 953.

Yarrow D. 1984. *Saccharomyces* Meyen ex Reess. V: The Yeasts: A taxonomic study. 3rd ed. Kreger van Rij N.J.W. (ed.). Amsterdam, Elsevier: 397 – 395. Cit. po: Vaughan – Martini A., Martini A. 1998. *Saccharomyces* Meyen ex Reess. V: The yeasts: a taxonomic study. 4th ed. Kurtzman C.P., Fell J.W. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 358 – 371.

Zaragoza O., Gancedo J. M. 2000. Pseudohyphal growth is induced in *Saccharomyces cerevisiae* by a combination of stress and cAMP signalling. Antonie Van Leeuwenhoek, 78, 2:187 – 194.

Zupan J., Raspor P. 2008. Quantitative agar-invasion assay. Journal of Microbiological Methods, 73, 2: 100 – 104.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Petru Rasporju za vodenje in strokovne nasvete ter pregled diplomskega dela.

Somentorju dr. Janu Mavriju se zahvaljujem za pomoč pri izvedbi eksperimentov in za potrpljenje pri pregledovanju diplomskega dela.

Doc. dr. Blažu Cigiću se zahvaljujem za recenzijo diplomskega dela.

Posebej se zahvaljujem Juretu Zupanu, univ. dipl. mikr., za obilo pomoči pri izvedbi eksperimentov v laboratoriju in za vse koristne nasvete tako pri praktičnem delu, kot pri pisanju diplomske naloge.

Ga. Marković in ga. Pitako se zahvaljujem za pomoč pri birokratskih obveznostih.

Ga. Ivici Hočevar se zahvaljujem za pregled virov.

Za pomoč se zahvaljujem vsem ostalim zaposlenim na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil.

Končno se zahvaljujem tudi staršema za stalno in nesebično podporo ter pomoč v vseh oblikah med celotnim študijem.

PRILOGE

Priloga A: Podatki o volumnu, standardni deviaciji, koeficientu variacije in relativni invazivnosti za kvasovke na gojišču YPD, inkubacija pri 30 °C.

(celokupni) volumen kolonij pred spiranjem												
sevi	56	YJM311	YJM128	YJM309	YJM273	YJM308	YHUM272	ZIM2273	YJM222	S288c		
Volumen[mm^3]	49,5	44,4	26,9	40,2	33,8	30,3	26,8	29,5	60,9	31,9		
St. dev. [mm^3]	5,9	3,7	1,9	5,9	5,2	3,9	0,8	0,5	0,6	2,1	Povprečje	Mediana
Koef. variacije	12%	8%	7%	15%	15%	13%	3%	2%	1%	7%	8%	8%
(invazivni) volumen kolonij po spiranju												
Volumen[mm^3]	13,6	7,2	6,1	3,7	8,1	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0		
St. dev. [mm^3]	2,0	0,5	0,4	0,7	1,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	Povprečje	Mediana
Koef. variacije	15%	7%	7%	19%	15%	8%	0%	0%	0%	0%	7%	7%
Relativna invazivnost												
Povprečje	27%	16%	23%	10%	24%	4%	0%	0%	0%	0%		
St. dev.	1%	2%	1%	3%	2%	1%	0%	0%	0%	0%	Povprečje	Mediana
Koef. var.	4%	13%	4%	30%	8%	25%	0%	0%	0%	0%	8%	4%

Priloga B: Podatki o volumnu, standardni deviaciji, koeficientu variacije in relativni invazivnosti za kvasovke na gojišču YPD, inkubacija pri 26 °C.

(celokupni) volumen kolonij pred spiranjem												
sevi	56	YJM311	YJM128	YJM309	YJM273	YJM308	YHUM272	ZIM2273	YJM222	S288c		
Volumen[mm^3]	34,1	14,0	24,1	20,8	13,2	15,5	4,9	9,8	26,6	15,1		
St. dev. [mm^3]	6,1	2,9	5,4	3,7	2,5	2,5	0,8	3,1	0,8	3,2	Povprečje	Mediana
Koef. variacije	18%	21%	22%	18%	19%	16%	16%	32%	3%	21%	19%	18%
(invazivni) volumen kolonij po spiranju												
Volumen[mm^3]	3,7	2,6	7,7	0,0	1,6	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0		
St. dev. [mm^3]	0,8	0,4	1,5	0,0	0,4	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	Povprečje	Mediana
Koef. variacije	22%	17%	19%	0%	23%	33%	0%	0%	0%	0%	11%	8%
Relativna invazivnost												
Povprečje	11%	19%	32%	0%	12%	16%	0%	0%	0%	0%		
St. dev.	2%	5%	4%	0%	1%	6%	0%	0%	0%	0%	Povprečje	Mediana
Koef. var.	18%	26%	13%	0%	8%	38%	0%	0%	0%	0%	10%	4%

Priloga C: Podatki o volumnu, standardni deviaciji, koeficientu variacije in relativni invazivnosti za kvasovke na gojišču YPD, inkubacija pri 37 °C.

(celokupni) volumen kolonij pred spiranjem												
sevi	56	YJM311	YJM128	YJM309	YJM273	YJM308	YHUM272	ZIM2273	YJM222	S288c		
Volumen[mm^3]	32,5	59,2	44,4	38,0	38,0	31,8	36,8	29,2	61,4	35,4		
St. dev. [mm^3]	9,8	8,6	6,7	4,5	9,6	5,8	2,5	0,1	0,1	0,8	Povprečje	Mediana
Koef. variacije	30%	15%	15%	12%	25%	18%	7%	0%	0%	2%	12%	13%
(invazivni) volumen kolonij po spiranju												
Volumen[mm^3]	3,6	9,1	10,1	1,8	5,0	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0		
St. dev. [mm^3]	1,4	2,5	1,7	0,5	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	Povprečje	Mediana
Koef. variacije	39%	27%	17%	28%	26%	0%	0%	0%	0%	0%	14%	8%
Relativna invazivnost												
Povprečje	13%	15%	23%	5%	13%	4%	0%	0%	0%	0%		
St. dev.	3%	4%	2%	2%	2%	1%	0%	0%	0%	0%	Povprečje	Mediana
Koef. var.	23%	27%	9%	40%	15%	25%	0%	0%	0%	0%	14%	12%

Priloga D: Podatki o volumnu, standardni deviaciji, koeficientu variacije in relativni invazivnosti za kvasovke na gojišču YPD s pH 4.

(celokupni) volumen kolonij pred spiranjem												
sevi	56	YJM311	YJM128	YJM309	YJM273	YJM308	YHUM272	ZIM2273	YJM222	S288c		
Volumen[mm^3]	16,1	45,2	19,8	20,7	19,7	27,9	20,9	14,8	24,5	17,9		
St. dev. [mm^3]	3,8	11,3	2,4	1,7	2,9	6,0	2,1	0,2	1,7	1,4	Povprečje	Mediana
Koef. variacije	24%	25%	12%	8%	15%	22%	10%	1%	7%	8%	13%	11%
(invazivni) volumen kolonij po spiranju												
Volumen[mm^3]	2,3	0,0	5,1	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
St. dev. [mm^3]	0,5	0,0	0,6	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	Povprečje	Mediana
Koef. variacije	22%	0%	12%	31%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	6%	0%
Relativna invazivnost												
Povprečje	18%	0%	26%	13%	0%	0%	0%	0%	0%	0%		
St. dev.	4%	0%	5%	4%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	Povprečje	Mediana
Koef. var.	22%	0%	19%	31%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	7%	0%

Priloga E: Podatki o volumnu, standardni deviaciji, koeficientu variacije in relativni invazivnosti za kvasovke na gojišču YPD s pH 8.

(celokupni) volumen kolonij pred spiranjem												
sevi	56	YJM311	YJM128	YJM309	YJM273	YJM308	YHUM272	ZIM2273	YJM222	S288c		
Volumen[mm^3]	26,6	41,6	29,8	29,8	26,4	28,9	65,3	12,9	36,6	33,3		
St. dev. [mm^3]	4,0	6,2	4,3	0,8	1,6	3,1	0,0	4,5	0,9	1,0	Povprečje	Mediana
Koef. variacije	15%	15%	14%	3%	6%	11%	0%	34%	2%	3%	10%	9%
(invazivni) volumen kolonij po spiranju												
Volumen[mm^3]	6,0	5,5	11,1	4,4	4,4	2,7	2,4	0,0	0,0	0,0		
St. dev. [mm^3]	1,6	1,1	2,1	0,4	0,3	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	Povprečje	Mediana
Koef. variacije	26%	19%	19%	8%	6%	7%	0%	0%	0%	0%	9%	7%
Relativna invazivnost												
Povprečje	23%	15%	37%	15%	17%	9%	4%	0%	0%	0%		
St. dev.	6%	4%	5%	2%	2%	0%	0%	0%	0%	0%	Povprečje	Mediana
Koef. var.	27%	26%	13%	11%	11%	0%	0%	0%	0%	0%	9%	7%

Priloga F: Podatki o volumnu, standardni deviaciji, koeficientu variacije in relativni invazivnosti za kvasovke na gojišču YPD z nizko a_w vrednostjo (0,1 % dodatek NaCl).

(celokupni) volumen kolonij pred spiranjem												
sevi	56	YJM311	YJM128	YJM309	YJM273	YJM308	YHUM272	ZIM2273	YJM222	S288c		
Volumen[mm^3]	57,1	42,5	65,7	32,8	32,4	67,0	110,3	21,0	31,0	23,8		
St. dev. [mm^3]	4,8	2,8	7,3	0,0	10,4	0,0	5,6	0,0	0,4	0,7	Povprečje	Mediana
Koef. variacije	8%	7%	11%	0%	32%	0%	5%	0%	1%	3%	7%	4%
(invazivni) volumen kolonij po spiranju												
Volumen[mm^3]	18,5	5,7	17,5	0,0	3,5	3,4	0,0	0,0	0,0	0,0		
St. dev. [mm^3]	6,0	0,5	4,9	0,0	0,7	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	Povprečje	Mediana
Koef. variacije	32%	9%	28%	0%	20%	15%	0%	0%	0%	0%	10%	4%
Relativna invazivnost												
Povprečje	32%	13%	30%	0%	13%	5%	0%	0%	0%	0%		
St. dev.	9%	1%	6%	0%	4%	0%	0%	0%	0%	0%	Povprečje	Mediana
Koef. var.	28%	8%	20%	0%	31%	0%	0%	0%	0%	0%	9%	0%

Priloga G: Podatki o volumnu, standardni deviaciji, koeficientu variacije in relativni invazivnosti za kvasovke na gojišču YPD z 0,01 % K-sorbatom.

(celokupni) volumen kolonij pred spiranjem												
sevi	56	YJM311	YJM128	YJM309	YJM273	YJM308	YHUM272	ZIM2273	YJM222	S288c		
Volumen[mm^3]	28,9	30,3	46,1	33,0	26,1	29,9	24,9	33,0	36,8	22,0		
St. dev. [mm^3]	3,5	3,9	7,0	3,6	3,3	4,6	0,3	0,1	4,5	0,4	Povprečje	Mediana
Koef. variacije	12%	13%	15%	11%	13%	15%	1%	0%	12%	2%	9%	12%
(invazivni) volumen kolonij po spiranju												
Volumen[mm^3]	4,7	8,4	9,9	4,2	4,4	1,1	0,9	0,0	0,0	0,0		
St. dev. [mm^3]	1,5	1,3	2,3	1,4	0,2	0,4	0,3	0,0	0,0	0,0	Povprečje	Mediana
Koef. variacije	32%	15%	23%	33%	5%	36%	33%	0%	0%	0%	18%	19%
Relativna invazivnost												
Povprečje	16%	28%	21%	15%	17%	3%	4%	0%	0%	0%		
St. dev.	5%	5%	4%	3%	2%	1%	1%	0%	0%	0%	Povprečje	Mediana
Koef. var.	31%	18%	19%	20%	12%	33%	25%	0%	0%	0%	16%	18%

Priloga H: Podatki o volumnu, standardni deviaciji, koeficientu variacije in relativni invazivnosti za kvasovke na gojišču YPD z 0,1 % Na-benzoatom.

(celokupni) volumen kolonij pred spiranjem												
sevi	56	YJM311	YJM128	YJM309	YJM273	YJM308	YHUM272	ZIM2273	YJM222	S288c		
Volumen[mm^3]	16,2	14,9	17,3	27,6	12,2	22,3	11,8	7,1	15,9	33,9		
St. dev. [mm^3]	2,4	1,0	2,7	5,5	1,6	3,5	0,6	0,7	2,5	9,9	Povprečje	Mediana
Koef. variacije	15%	7%	16%	20%	13%	16%	5%	10%	16%	29%	15%	15%
(invazivni) volumen kolonij po spiranju												
Volumen[mm^3]	3,2	6,6	2,0	3,0	2,8	2,5	1,5	0,0	0,0	0,0		
St. dev. [mm^3]	1,2	0,6	0,5	0,7	0,4	0,4	0,2	0,0	0,0	0,0	Povprečje	Mediana
Koef. variacije	38%	9%	25%	23%	14%	16%	13%	0%	0%	0%	14%	14%
Relativna invazivnost												
Povprečje	22%	44%	12%	10%	23%	11%	12%	0%	0%	0%		
St. dev.	7%	3%	3%	2%	4%	3%	1%	0%	0%	0%	Povprečje	Mediana
Koef. var.	32%	7%	25%	20%	17%	27%	8%	0%	0%	0%	14%	13%

Priloga I: Podatki o volumnu, standardni deviaciji, koeficientu variacije in relativni invazivnosti za kvasovke na gojišču YPD z 0,1 % Na-bisulfitom.

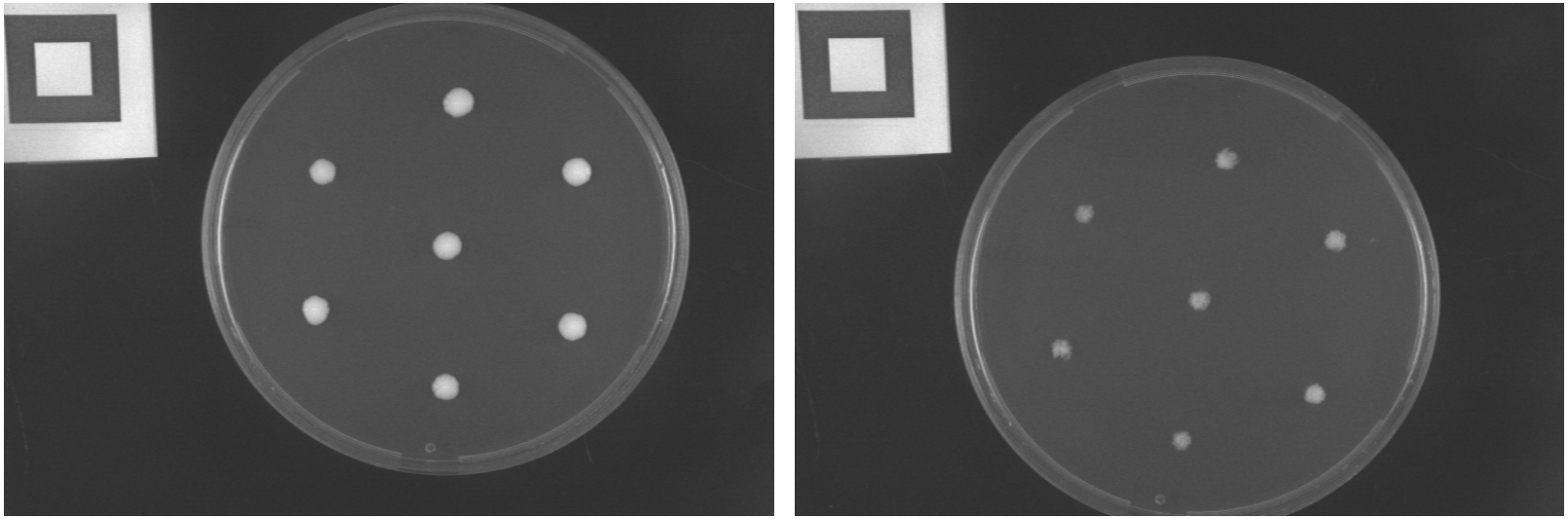
(celokupni) volumen kolonij pred spiranjem												
sevi	56	YJM311	YJM128	YJM309	YJM273	YJM308	YHUM272	ZIM2273	YJM222	S288c		
Volumen[mm^3]	10,0	7,5	26,0	26,5	13,5	15,5	10,2	0,0	10,7	17,9		
St. dev. [mm^3]	1,8	2,0	6,6	4,1	1,3	1,9	3,2	0,0	1,3	0,1	Povprečje	Mediana
Koef. variacije	18%	27%	25%	15%	10%	12%	31%	0%	12%	1%	15%	14%
(invazivni) volumen kolonij po spiranju												
Volumen[mm^3]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
St. dev. [mm^3]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	Povprečje	Mediana
Koef. variacije	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Relativna invazivnost												
Povprečje	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%		
St. dev.	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	Povprečje	Mediana
Koef. var.	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Priloga J: Podatki o volumnu, standardni deviaciji, koeficientu variacije in relativni invazivnosti za kvasovke na gojišču YPD, atmosfera s 15 % CO_2.

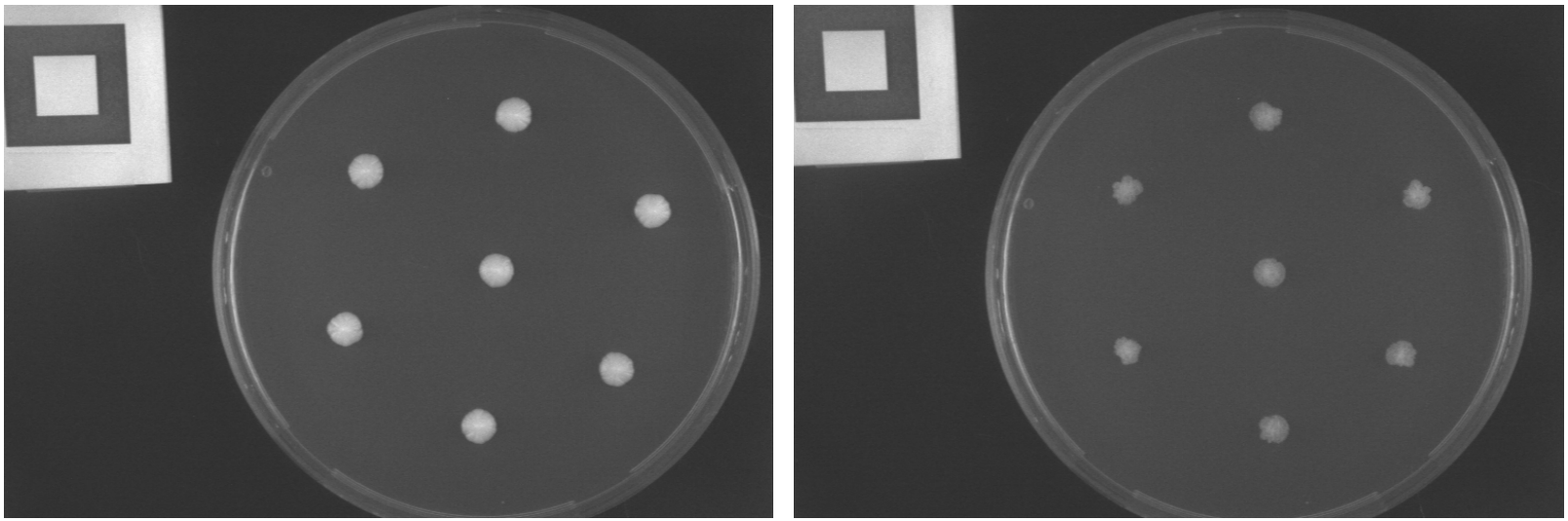
(celokupni) volumen kolonij pred spiranjem												
sevi	56	YJM311	YJM128	YJM309	YJM273	YJM308	YHUM272	ZIM2273	YJM222	S288c		
Volumen[mm^3]	18,9	11,8	9,7	11,6	8,0	12,4	4,7	2,8	13,8	10,7		
St. dev. [mm^3]	0,9	4,0	3,6	3,2	1,4	3,2	1,7	0,9	3,2	2,8	Povprečje	Mediana
Koef. variacije	5%	34%	37%	28%	18%	26%	36%	32%	24%	26%	26%	27%
(invazivni) volumen kolonij po spiranju												
Volumen[mm^3]	1,0	1,5	0,5	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
St. dev. [mm^3]	0,3	0,4	0,2	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	Povprečje	Mediana
Koef. variacije	29%	28%	32%	0%	25%	0%	0%	0%	0%	0%	11%	0%
Relativna invazivnost												
Povprečje	5%	15%	5%	0%	10%	0%	0%	0%	0%	0%		
St. dev.	2%	4%	4%	0%	2%	0%	0%	0%	0%	0%	Povprečje	Mediana
Koef. var.	29%	25%	68%	0%	20%	0%	0%	0%	0%	0%	14%	0%

Priloga K: Podatki o volumnu, standardni deviaciji, koeficientu variacije in relativni invazivnosti za kvasovke na gojišču SCLD.

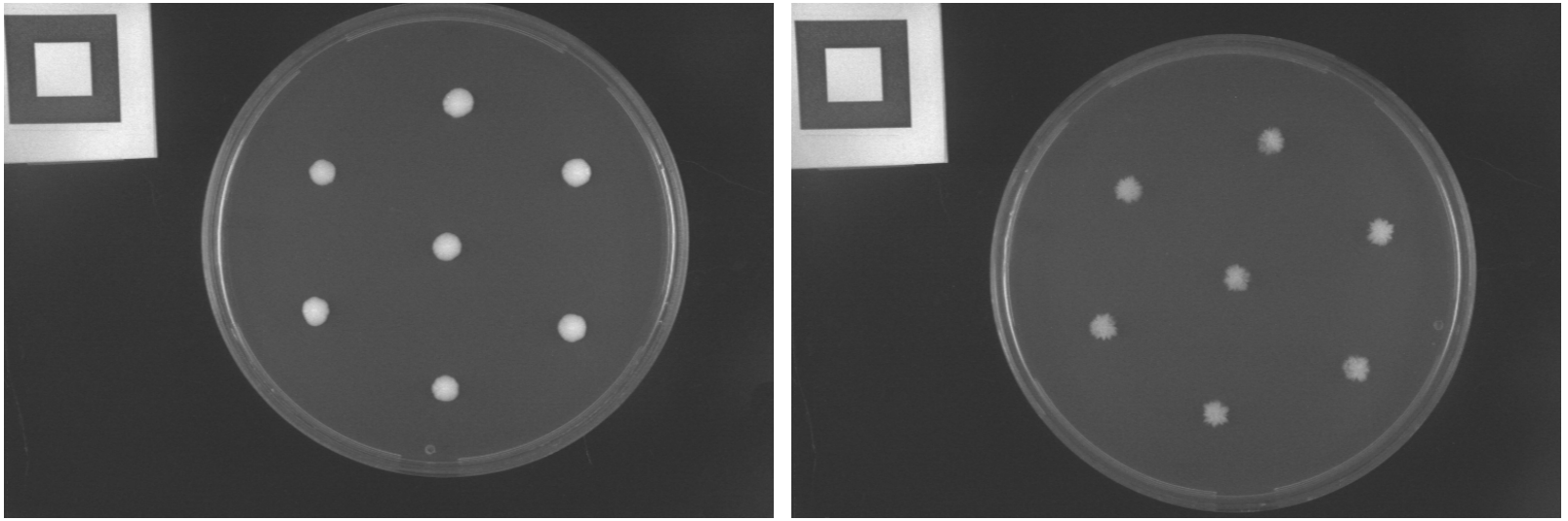
(celokupni) volumen kolonij pred spiranjem												
sevi	56	YJM311	YJM128	YJM309	YJM273	YJM308	YHUM272	ZIM2273	YJM222	S288c		
Volumen[mm^3]	1,6	7,9	2,5	2,9	3,5	0,0	0,0	0,0	2,9	1,4		
St. dev. [mm^3]	0,2	1,3	0,2	0,2	0,6	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	Povprečje	Mediana
Koef. variacije	13%	16%	8%	7%	17%	0%	0%	0%	3%	7%	7%	7%
(invazivni) volumen kolonij po spiranju												
Volumen[mm^3]	1,3	2,1	1,3	1,2	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
St. dev. [mm^3]	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	Povprečje	Mediana
Koef. variacije	15%	14%	8%	8%	8%	0%	0%	0%	0%	0%	5%	4%
Relativna invazivnost												
Povprečje	82%	28%	52%	41%	37%	0%	0%	0%	0%	0%		
St. dev.	2%	2%	1%	5%	5%	0%	0%	0%	0%	0%	Povprečje	Mediana
Koef. var.	2%	7%	2%	12%	14%	0%	0%	0%	0%	0%	4%	1%



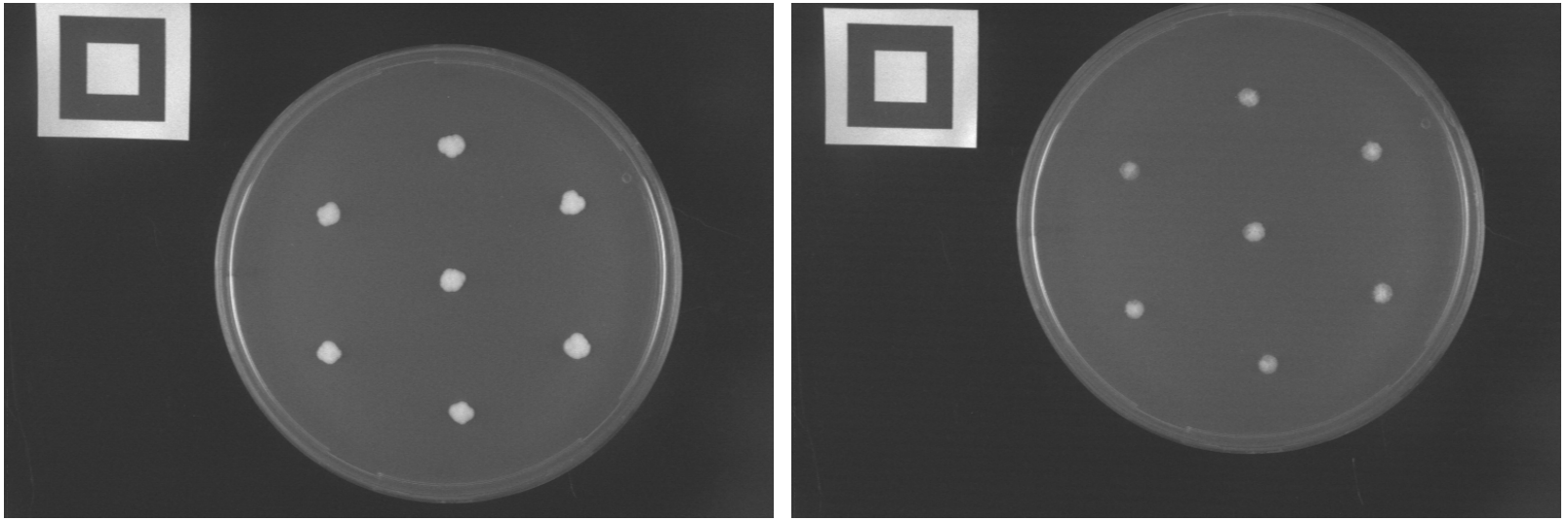
Priloga L: Fotografije petrijevk s kolonijami kvasovk na gojišču YPD, inkubacija pri 30 °C, pred spiranjem (levo) in po spiranju (desno). Primer seva YJM128.



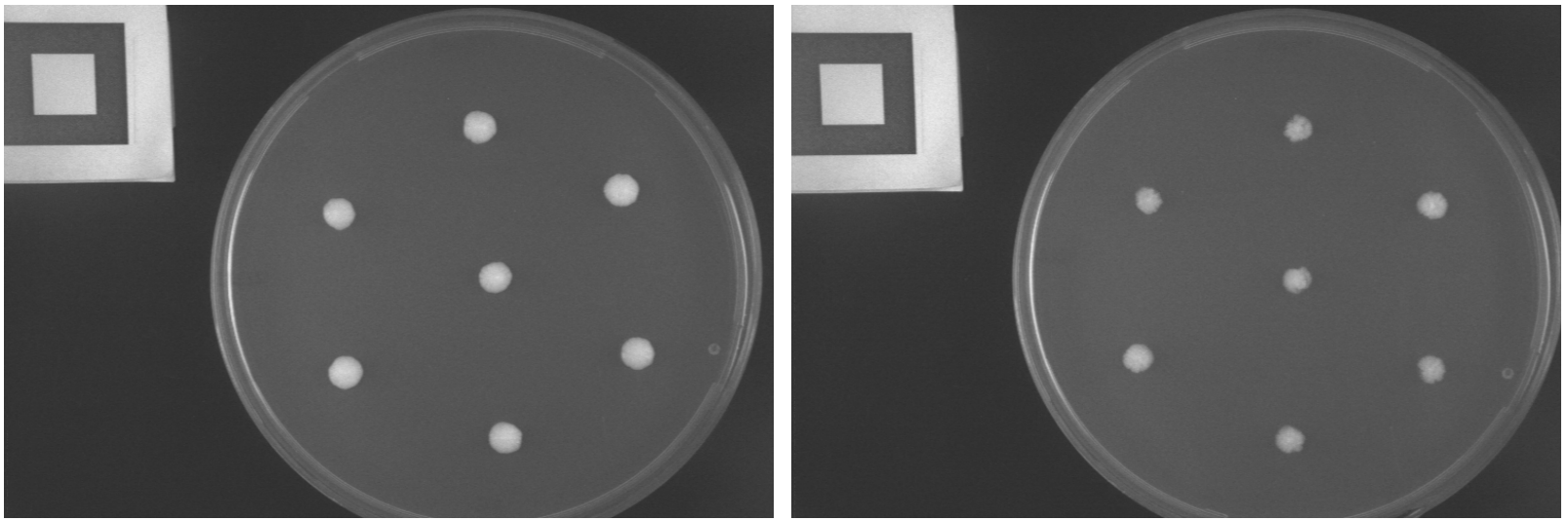
Priloga M: Fotografije petrijevk s kolonijami kvasovk na gojišču YPD, inkubacija pri 26 °C, pred spiranjem (levo) in po spiranju (desno). Primer seva YJM128.



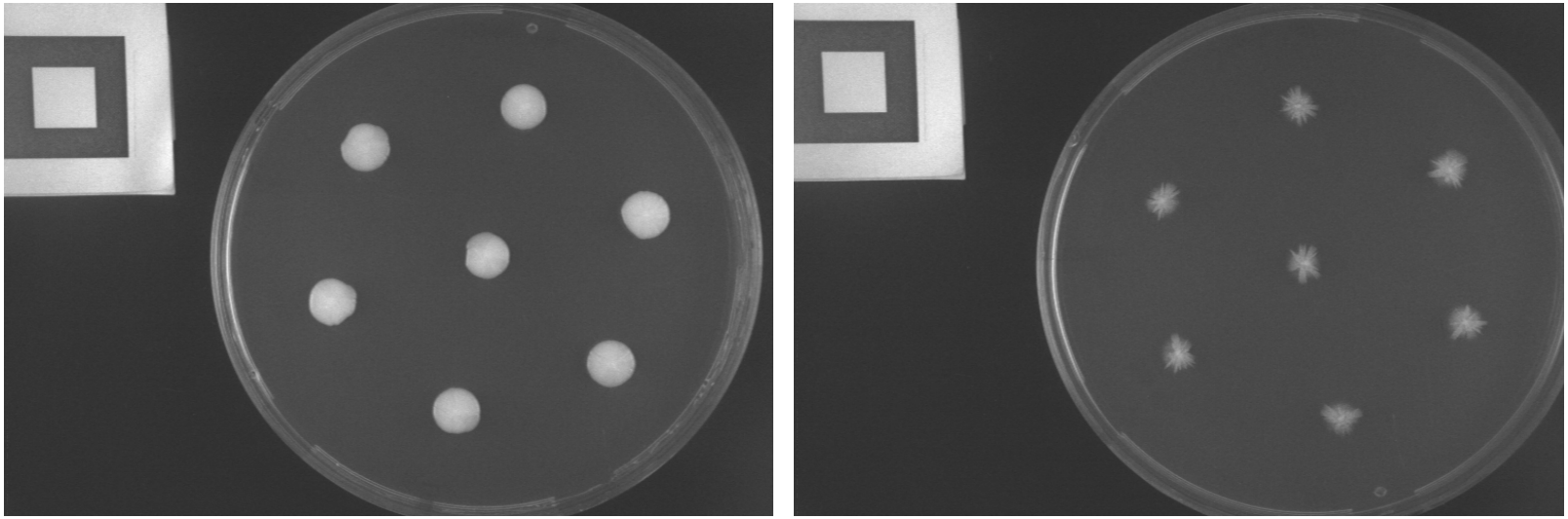
Priloga N: Fotografije petrijevk s kolonijami kvasovk na gojišču YPD, inkubacija pri 27 °C, pred spiranjem (levo) in po spiranju (desno). Primer seva YJM128.



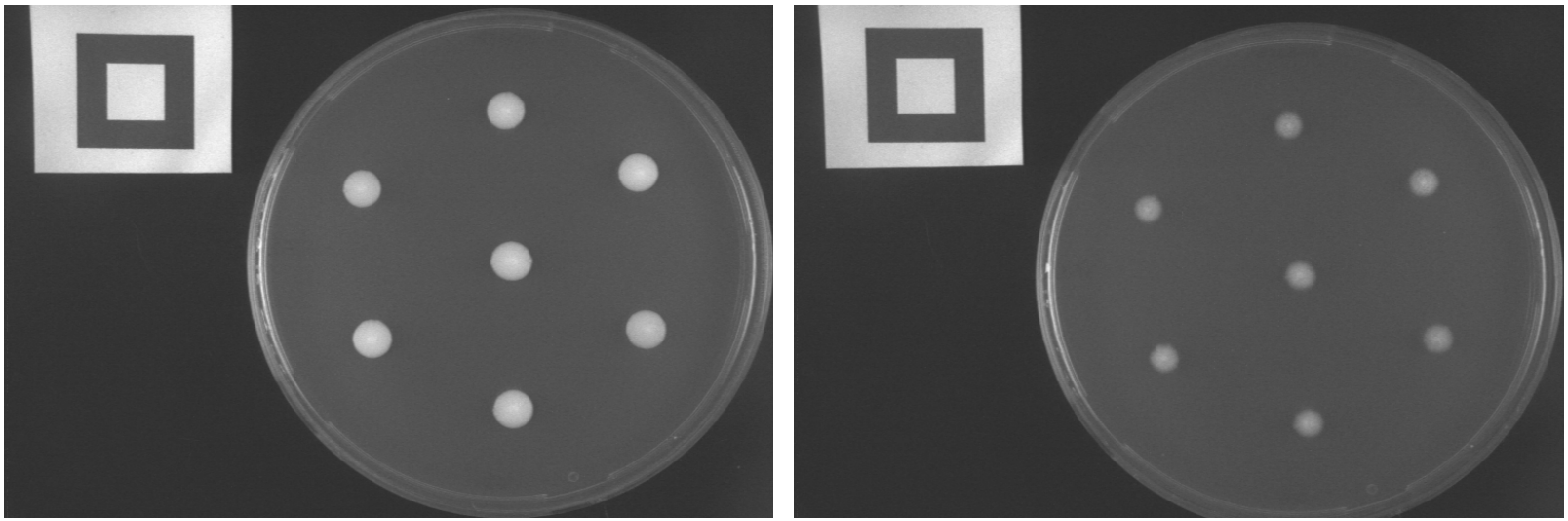
Priloga O: Fotografije petrijevk s kolonijami kvasovk na gojišču YPD s pH 4, pred spiranjem (levo) in po spiranju (desno). Primer seva YJM128.



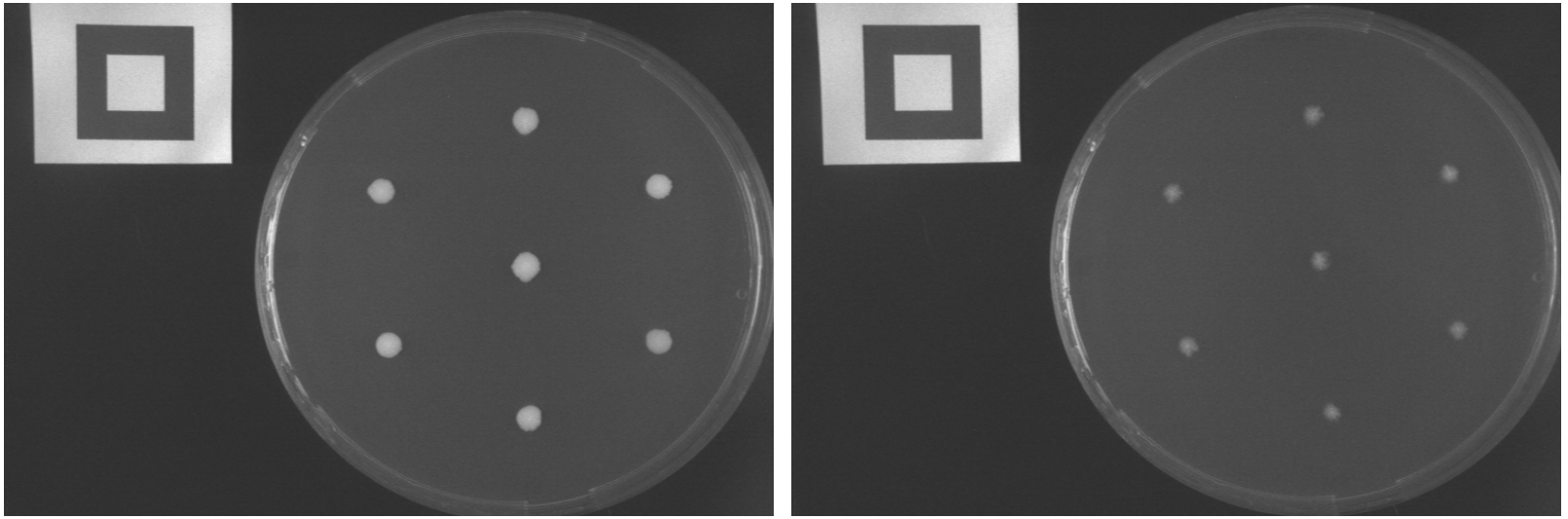
Priloga P: Fotografije petrijevk s kolonijami kvasovk na gojišču YPD s pH 8, pred spiranjem (levo) in po spiranju (desno). Primer seva YJM128.



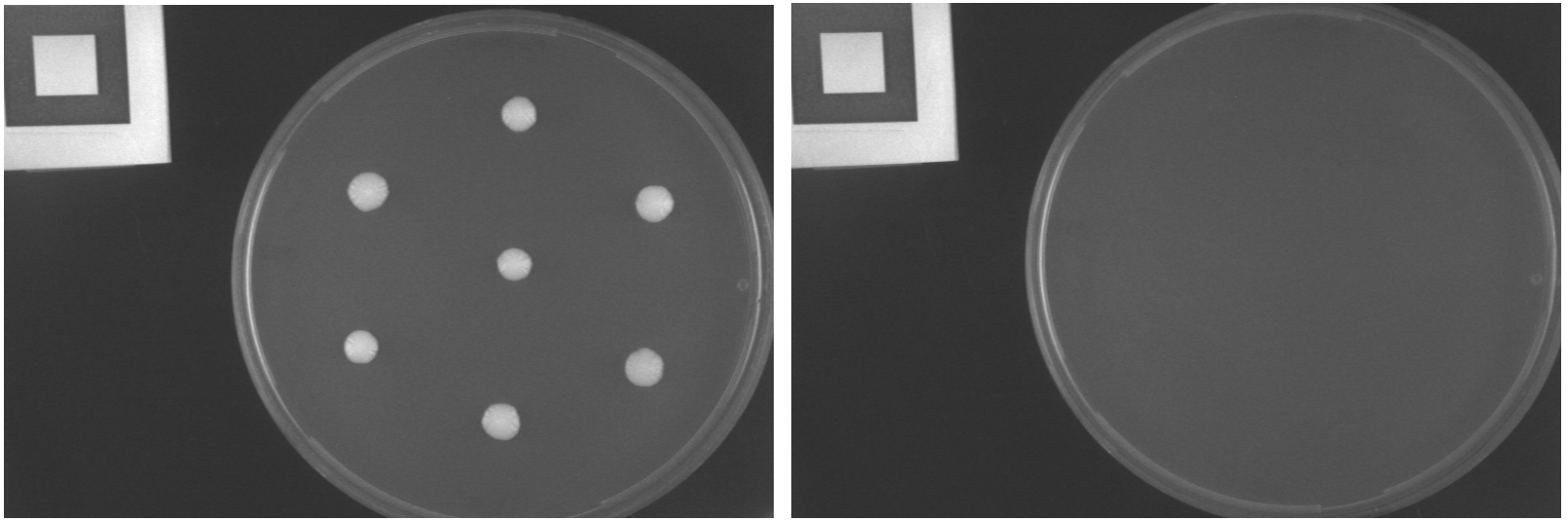
Priloga Q: Fotografije petrijevk s kolonijami kvasovk na gojišču YPD z nizko a_w vrednostjo (0,1 % dodatek NaCl), pred spiranjem (levo) in po spiranju (desno). Primer seva YJM128.



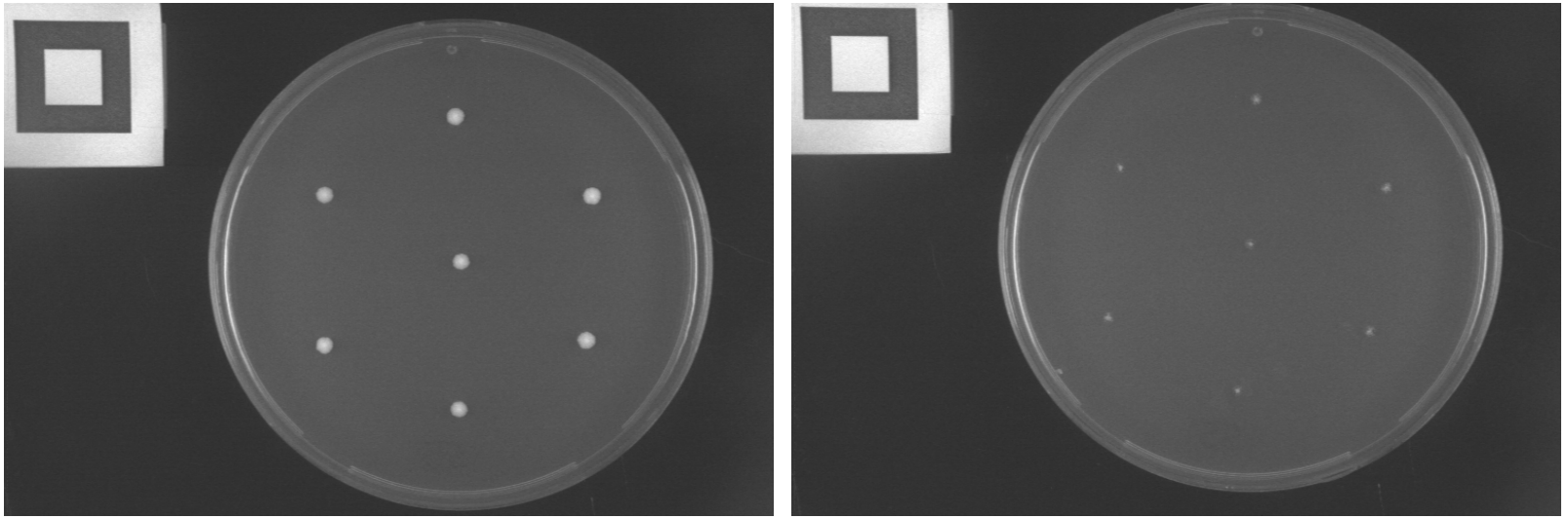
Priloga R: Fotografije petrijevk s kolonijami kvasovk na gojišču YPD z 0,01 % K-sorbatom, pred spiranjem (levo) in po spiranju (desno). Primer seva YJM128.



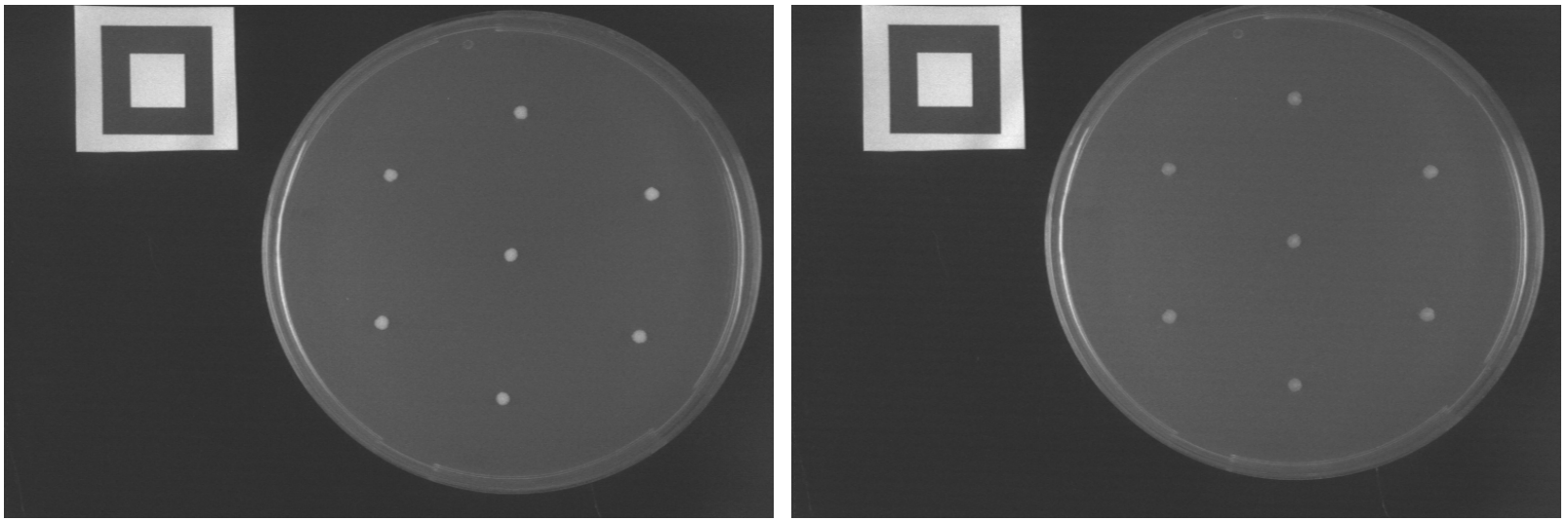
Priloga S: Fotografije petrijevk s kolonijami kvasovk na gojišču YPD z 0,1 % Na-benzoatom, pred spiranjem (levo) in po spiranju (desno). Primer seva YJM128.



Priloga T: Fotografije petrijevk s kolonijami kvasovk na gojišču YPD z 0,1 % Na-bisulfitom, pred spiranjem (levo) in po spiranju (desno). Primer seva YJM128.



Priloga U: Fotografije petrijevk s kolonijami kvasovk na gojišču YPD, atmosfera s 15 % CO_2, pred spiranjem (levo) in po spiranju (desno). Primer seva YJM128.



Priloga V: Fotografije petrijevk s kolonijami kvasovk na gojišču SCLD, pred spiranjem (levo) in po spiranju (desno). Primer seva YJM128.