

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tina VOGLAR

**VPLIV ULTRAVIJOLIČNEGA SEVANJA NA  
PREŽIVETJE IZ SOLIN IZOLIRANIH  
HALOFILNIH / HALOTOLERANTNIH  
ČRNIH KVASOVK**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tina VOGLAR

**VPLIV ULTRAVIJOLIČNEGA SEVANJA NA PREŽIVETJE IZ SOLIN  
IZOLIRANIH HALOFILNIH / HALOTOLERANTNIH ČRNIH  
KVASOVK**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**ULTRAVIOLET RADIATION EFFECT ON SURVIVAL OF  
HALOPHILIC / HALOTOLERANT BLACK YEASTS FROM  
SALTERNS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2006

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

Študijska komisija Oddelka za biologijo je potrdila temo in naslov diplomskega dela ter za mentorico imenovala prof. dr. Nino Gunde - Cimerman.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:           prof. dr. Alenka Gaberščik  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica:                prof. dr. Ana Plemenitaš  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Članica:                dr. Martina Turk  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 29.12.2006

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Tina Voglar

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

- ŠD Dd
- DK UDK 581.526.52: 582.28 (043.2) = 863
- KG ultravijolično sevanje/črne kvasovke/soline
- AV VOGLAR, Tina
- SA GUNDE - CIMERMAN, Nina (mentorica) / TURK, Martina (somentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2006
- IN VPLIV ULTRAVIJOLIČNEGA SEVANJA NA PREŽIVETJE IZ SOLIN  
IZOLIRANIH HALOFILNIH/HALOTOLERANTNIH ČRNIH KVASOVK
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP IX, 53 str., 1 tab., 17 sl., 12 pril., 50 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AL Različni mikroorganizmi se različno odzivajo na UV-sevanje. Melanin v celični steni črnih kvasovk verjetno predstavlja zaščito pred UV-sevanjem in tudi pred drugimi stresnimi dejavniki iz okolja. Namen naloge je bil ugotoviti ali sta melanizirani črni kvasovki, halofilna *Hortaea werneckii* in halotolerantna *Aureobasidium pullulans*, bolj odporni na ultravijolično sevanje v primerjavi z nemelanizirano pivsko kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*. Ugotavljali smo vpliv vrste kvasovk, doze sevanja, faze rasti in slanosti gojišča na preživetje kvasovk. V petih samostojnih poskusih obsevanja z UV-svetlobo valovne dolžine 254 nm (UV-C) smo ugotovili značilen vpliv vrste, doze sevanja in faze rasti na preživetje celic, vpliv slanosti gojišča ni bil značilen. *H. werneckii* je bila najbolj odporna na sevanje UV-C, manj odporna je bila *A. pullulans*, po pričakovanjih pa je bila na sevanje najmanj odporna *S. cerevisiae*. Rezultati nakazujejo potencialno vlogo pigmenta melanina pri zaščiti črnih kvasovk pred škodljivimi učinki UV-svetlobe.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

DN Dd

DC UDC 581.526.52: 582.28 (043.2) = 863

CX ultraviolet radiation/black yeasts/salterns

AU VOGLAR, Tina

AA GUNDE - CIMERMAN, Nina (supervisor) / TURK, Martina (co-supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

PY 2006

TI ULTRAVIOLET RADIATION EFFECT ON SURVIVAL OF  
HALOPHILIC/HALOTOLERANT BLACK YEASTS FROM SOLAR SALTERNS

DT Graduation Thesis (University studies)

NO IX, 53 p., 1 tab., 17 fig., 12 ann., 50 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Different microorganisms respond in different ways to UV-radiation. Melanin in cell walls of black yeasts probably represents protection against UV-radiation and other stress factors in their environment. The present work was focused on the determination of ultraviolet radiation tolerance of melanized black yeasts, the halophilic *Hortaea werneckii* and the halotolerant *Aureobasidium pullulans*, in comparison to brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. We ascertained the influence of the species, growth phase, UV dose and salinity of the medium on the survival rate. In five independent experiments the cells of studied yeasts were irradiated with UV-C light (254 nm). After incubation the CFUs were counted and the survival rate was calculated. The survival rate was significantly affected by the species, growth phase, and the UV dose, but not by salinity of the medium. Among studied yeasts the halophilic *H. werneckii* showed the highest tolerance to UV-C, halotolerant *A. pullulans* had an intermediate tolerance, while *S. cerevisiae* as expected poorly tolerated even the lowest doses of radiation. The results indicate that melanin has a potential role in UV protection in black yeasts.

**KAZALO VSEBINE**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED LITERATURE	2
2.1 ČRNE KVASOVKE	2
2.1.1 Črne kvasovke iz Sečoveljskih solin	3
2.1.2 <i>Hortaea werneckii</i>	4
2.1.3 <i>Aureobasidium pullulans</i>	5
2.2 ULTRAVIJOLIČNO SEVANJE	6
2.2.1 Vpliv ultravijoličnega sevanja na biološke sisteme	7
2.3 MELANINI	10
2.3.1 Kaj so melanini?	10
2.3.1 Glivni melanini	11
2.3.2 Vloge melaninov	12
2.3.3 Melanin pri črnih kvasovkah iz Sečoveljskih solin	15
3 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA IN DELOVNE HIPOTEZE	17
3.1 NAMEN	17
3.2 DELOVNE HIPOTEZE	17
4 MATERIAL IN METODE	18
4.1 MIKROORGANIZMI IN POGOJI RASTI	18
4.1.1 Sevi	18
4.1.2 Gojišče	18
4.1.3 Gojenje	19
4.3 OBSEVANJE Z ULTRAVIJOLIČNO SVETLOBO	20
4.4 STATISTIČNE METODE OBDELAVE PODATKOV	21
5 REZULTATI	24
5.1 PREŽIVETJE HALOFILNE ČRNE KVASOVKE <i>Hortaea werneckii</i> PO OBSEVANJU Z ULTRAVIJOLIČNO SVETLOBO	24
5.2 PREŽIVETJE HALOTOLERANTNE ČRNE KVASOVKE <i>Aureobasidium pullulans</i> PO OBSEVANJU Z ULTRAVIJOLIČNO SVETLOBO	26
5.3 PREŽIVETJE KVASOVKE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PO OBSEVANJU Z ULTRAVIJOLIČNO SVETLOBO	27
5.4 PRIMERJAVA PREŽIVETIJ PROUČEVANIH KVASOVK PRI RAZLIČNIH POGOJIH RASTI PO OBSEVANJU Z ULTRAVIJOLIČNO SVETLOBO	28
5.5 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	30
6 RAZPRAVA IN ZAKLJUČKI	41
6.1 RAZPRAVA	41

6.1.1 Preživetje glive <i>Hortaea werneckii</i> po obsevanju z ultravijolično svetlobo	42
6.1.2 Preživetje glive <i>Aureobasidium pullulans</i> po obsevanju z ultravijolično svetlobo	43
6.1.3 Preživetje glive <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po obsevanju z ultravijolično svetlobo	44
6.2 ZAKLJUČKI	45
7 POVZETEK	46
8 VIRI	48

## **KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1: Parametri analize variance, izračunani s pomočjo programa SPSS za okolje Windows.

30



**KAZALO SLIK**

Slika 1: Krivulja preživetja za <i>H.werneckii</i> na gojiščih YNB in YNB s 17 % (m/v) NaCl v eksponentni in stacionarni fazi rasti. Prikazani rezultati so povprečje petih poskusov.	25
Slika 2: Krivulja preživetja za <i>A. pullulans</i> na gojišču YNB in YNB s 5 % (m/v) v eksponentni in stacionarni fazi rasti. Prikazani rezultati so povprečje petih poskusov.	26
Slika 3: Krivulja preživetja za <i>S. cerevisiae</i> na gojišču YNB in YNB s 5 % (m/v) v eksponentni in stacionarni fazi rasti. Prikazani rezultati so povprečje petih poskusov.	27
Slika 4: Preživetje <i>H. werneckii</i> in <i>A. pullulans</i> v primerjavi s <i>S. cerevisiae</i> na gojišču YNB v eksponentni fazi rasti.	28
Slika 5: Preživetje <i>H. werneckii</i> in <i>A. pullulans</i> v primerjavi s <i>S. cerevisiae</i> na gojišču YNB v stacionarni fazi rasti.	28
Slika 6: Preživetje <i>H. werneckii</i> in <i>A. pullulans</i> v primerjavi s <i>S. cerevisiae</i> na gojiščih YNB z dodanim NaCl (5 % (m/v) za <i>A. pullulans</i> in <i>S. cerevisiae</i> ter 17 % (m/v) za <i>H. werneckii</i> ) v eksponentni fazi rasti.	29
Slika 7: Preživetje <i>H. werneckii</i> in <i>A. pullulans</i> v primerjavi s <i>S. cerevisiae</i> na gojiščih YNB z dodanim NaCl (5 % (m/v) za <i>A. pullulans</i> in <i>S. cerevisiae</i> ter 17 % (m/v) za <i>H. werneckii</i> ) v stacionarni fazi rasti.	29
Slika 8: Ocenjene mejne vrednosti za delež preživetja vrste v odvisnosti od faze rasti in vrste glive, pridobljene z analizo variance.	31
Slika 9: Ocenjene mejne vrednosti za delež preživetja vrste v odvisnosti od tipa gojišča (YNB, YNB z dodanim NaCl), dobljene z analizo variance.	32
Slika 10: Ocenjene mejne vrednosti za delež preživetja vrste v odvisnosti od doze ultravijoličnega sevanja in vrste glive, dobljene z analizo variance. Doze sevanja so podane v ( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ).	33
Slika 11: Ocenjene mejne vrednosti za delež preživetja v odvisnosti od doze ultravijoličnega sevanja in tipa gojišča, pridobljene z analizo variance. Doze sevanja so podane v ( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ).	34
Slika 12: Ocenjene mejne vrednosti za delež preživetja v odvisnosti od doze ultravijoličnega sevanja in vrste glive, dobljene z analizo variance. Doze sevanja so podane v ( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ).	35
Slika 13: Ocenjene mejne vrednosti za delež preživetja v odvisnosti od vrste glive, dobljene z analizo variance. Na grafu ni prikazanih ločenih krivulj za posamezno fazo rasti.	36
Slika 14: Ocenjene mejne vrednosti za delež preživetja v odvisnosti od slanosti gojišča, dobljene z analizo variance.	37
Slika 15: Ocenjene mejne vrednosti za delež preživetja v odvisnosti od doze UV-sevanja, dobljene z analizo variance.	38
Slika 16: <i>H. werneckii</i> na gojišču YNB s 17 % (m/v) NaCl v eksponentni fazi rasti. Fotografija je bila slikana z mikroskopom pri 1000-kratni povečavi.	39
Slika 17: <i>A. pullulans</i> na gojišču YNB s 5 % (m/v) NaCl v stacionarni fazi rasti. Fotografija je bila slikana z mikroskopom pri 1000-kratni povečavi.	40

## **KAZALO PRILOG**

Priloga A	2
Priloga B	3
Priloga C	4
Priloga D	5
Priloga E	6
Priloga F	7
Priloga G	8
Priloga H	9
Priloga I	10
Priloga J	11
Priloga K	12
Priloga L	13

## 1 UVOD

Izjemno slana voda Sečoveljskih solin je naravna ekološka niša mnogih halofilnih in halotolerantnih mikroorganizmov, tudi črnih kvasovk. Soline veljajo za ekstremno okolje, kjer vladajo posebni okoljski faktorji, kot so visoka koncentracija v vodi raztopljenih soli, nizka koncentracija kisika, občasno visoke količine hranil, nevtralen pH in zelo visoko ultravijolično sevanje.

V solinskem skrajnem okolju mikroorganizmom preživetje omogočajo razne fiziološke prilagoditve, tako na morfološkem kot tudi na biokemijskem nivoju. Za vse iz solin izolirane črne kvasovke so značilne debele, melanizirane celične stene in počasna, najpogosteje meristematska rast. Večina se jih razmnožuje z endokonidiacijo.

Melanin ima pri mikroorganizmih različne vloge. Znana je njegova zaščitna vloga pred fizikalnimi (UV-sevanje, izsuševanje, prosti kisikovi radikali) in biološkimi stresnimi dejavniki okolja (litični encimi).

Halofilne črne kvasovke sintetizirajo DHN melanin, ki se kopiči v celični steni gliv.

Ugotovljeno je bilo, da se z naraščajočo slanostjo spreminja vzorec melanizacije v celičnih stenah halofilnih črnih kvasovk.

## 2 PREGLED LITERATURE

### 2.1 ČRNE KVASOVKE

Črne kvasovke so melanizirane glive, ki vsaj del svojega življenjskega cikla preživijo v kvasni, torej brsteči obliki. Počasna rast večine vrst in slaba kompetitivna sposobnost sta razlog, zaradi katerega je bilo znanje o črnih kvasovkah dolgo časa pomanjkljivo (de Hoog, 1999). Črne kvasovke so polifiletske (Sterflinger in sod., 1999), vendar skupaj tvorijo biološko skupino (de Hoog in Hermanides-Nijhof, 1977). Večinoma spadajo v deblo *Ascomycota* (de Hoog in McGinnis, 1987), kjer jih uvrščamo v dva reda razreda *Loculoascomycetes*: *Chaetothyriales* (*Herpotrichiellaceae*) in *Dothideales* (de Hoog in sod., 1997), dva reda pa se uvrščata v deblo *Basidiomycota* (Haase s sod., 1999).

Za črne kvasovke so značilni depoziti melanina v celični steni ter sposobnost tvorbe sinanamorfov z bogato septiranim micelijem. Pri mnogih vrstah je življenjski krog razdeljen na dva pomembna dela. Za zgodnje faze razvoja je značilno hitro povečevanje biomase s hidrofilnim brstitvenim stadijem. Kasneje se tvorijo hidrofobne hife, ki dvignejo konidiofore ločeno od substrata, kar omogoča razširjanje po zraku. V tej suhi fazi življenjskega kroga se tudi lahko pojavijo temne kvasne celice z debelo celično steno (de Hoog in McGinnis, 1987). Prisotnost kvasovkam podobne faze je odvisna od ekološke niše vrste. Nekatere vrste, ki zavzemajo dinamična vodna okolja, kot so bazeni izparevajoče morske vode, se z brstenjem razmnožujejo dokler je možna submerzna rast. Ko se razmere spremenijo, nastopi hifna, bolj hidrofobna faza. Sorodne vrste, ki pa zasedajo nevodna okolja, imajo hidrofoben talus v vseh stopnjah razvoja. Posledično so lahko predstavniki črnih kvasovk morfološko zelo raznoliki (de Hoog, 1993). Kompleksni življenjski krogi anamorfov nakazujejo prilagoditve na spremenljive ekološke niše (Uijthof, 1996, cit. po Zalar, 1999).

Glede na ekologijo črnih kvasovk ločimo tri glavne skupine. Prvo skupino tvorijo epifiti ter naseljevalci anorganskih materialov, ki naseljujejo naravne ali umetno ustvarjene osmotske

habitate. V drugo skupino spadajo tako imenovane mikrokolonialne glive, rastoče na kamninah vročih ter hladnih puščav, tretjo skupino pa predstavljajo glive, ki povzročajo mikoze pri ljudeh in živalih. Večina opisanih habitatov ima nekaj skupnih značilnosti, kot so omejena dostopnost vode, UV-sevanje, osmotski stres ter pogosto skrajne temperature (Zalar, 1999).

### 2.1.1 Črne kvasovke iz Sečoveljskih solin

Halofilne in halotolerantne črne kvasovke, izolirane leta 1997 iz slane vode v kristalizacijskem bazenu Sečoveljskih solin, sodijo v red askomicetnih gliv *Dothideales*. Na podlagi makroskopskih in mikroskopskih opazovanj morfoloških značilnosti in celičnih struktur, s pomočjo fizioloških testov asimilacije različnih virov ogljika in dušika, z ugotavljanjem tolerance na cikloheksimid, DNazne aktivnosti, halofilnosti in rasti pri različnih temperaturah, s primerjavo s tipskimi sevi in med izoliranimi vrstami na osnovi molekularno genetske metode ARDRA (pomnoženi in z restriktazami razrezani fragmenti ribosomalne DNA) in z določanjem zaporedja ITS-regije (regija notranjega distančnika) rDNA (v jedru kodirani geni za ribosomalno RNA), so določili, da izolati pripadajo že znanim vrstam *Hortaea werneckii*, *Phaeothea triangularis* in *Aureobasidium pullulans* ter novi vrsti *Trimmatostroma salinum*. Za vse iz solin izolirane črne kvasovke so značilne debele, melanizirane celične stene in počasna, najpogosteje meristematska rast. Večina se jih razmnožuje z endokonidiacijo. Sposobne so razgradnje velikega števila substratov. Optimalna temperatura za njihovo rast je okrog 24° C (Zalar, 1999). Izjemno slane vode solin so naravna ekološka niša za halofilne črne kvasovke (Gunde-Cimerman in sod., 2000).

### 2.1.2 *Hortaea werneckii*

Gliva *Hortaea werneckii* (Horta) Nishimura & Miyaji je askomicetna črna kvasovka, ki spada v red *Dothideales* (Zalar, 1999). Ima več imen, znana je tudi kot *Exophiala werneckii* (Horta) von Arx 1970. Najprej se je imenovala *Cladosporium werneckii* Horta, nato so jo McGinnis in sodelavci preimenovali v *Phaeoannellomyces werneckii* (Horta) McGinnis et Schell. To ime se je uporabljalo za kvasno obliko glive (Mittag, 1993).

V rodu *Exophiala* je več za človeka patogenih gliv, kar naj bi nakazovalo tudi potencialno patogenost *H. werneckii* (Zalar in sod., 1999a). *Hortaea werneckii* je bila v preteklosti poznana predvsem kot etiološki dejavnik neinvazivne kožne infekcije *tinea nigra* pri človeku. Glivo so izolirali tudi iz morske vode, morskih rib, soljenih sladkovodnih rib, zemlje ob plaži in vode v solinah, tudi z rastlinskih listov in z marmorja ob morski obali (Zalar in sod., 1999a). Naravna ekološka niša *H. werneckii* je bila neznana do izolacije iz slane vode v solinah Sečovlje (Gunde-Cimerman in sod., 2000). Glivo so izolirali iz slane vode tekom sezone proizvodnje soli (Zalar, 1999). V času kristalizacije soli, od avgusta do oktobra, je bila *H. werneckii* najpogosteje izolirana vrsta črnih kvasovk. Ekofiziološki testi so potrdili boljšo razgradnjo nekaterih snovi ob prisotnosti NaCl v gojiščih, dokazana je bila rast *H. werneckii* na gojiščih s 30 % NaCl (m/v) NaCl (Zalar, 1999), in že Sterflingerjeva (1998) je vrsto označila za resnično halofilno.

Življenjski cikel glive je sestavljen iz kvasne, filamentozne in meristematske rasti, ki jih sprožijo različne razmere v okolju. Kvasni in filamentozni del kažeta enakovredno reproduktivno vlogo, celice dozorevajo z debelitvijo in melanizacijo celične stene, sledi povečevanje celic in prehod v meristematsko (izodiametralno) rast. Nastanejo prečno vzdolžno in nepravilno septirane celice. Meristematske celice sproščajo hčerinske celice tako, da se "olušči" celična stena materinske celice. Hife kalijo skozi celično steno materinske celice. Interkalarne celice hif tvorijo konidije. Hidrofobne hife se pritrdijo na površine, hidrofilne kvasne celice pa se sproščajo. Pod ugodnimi pogoji iz kvasnih celic kalijo hife, ki

hitro naselijo substrat. V neugodnih pogojih okolja, kot so suša, odsotnost hranil in temperaturne spremembe, ki za glivo predstavljajo stres, nastanejo hidrofobne hife. V najbolj neugodnih pogojih gliva tvori dormantna sklerocijska telesa, ki ob ugodnih razmerah sprostijo konidije. Pri optimalnih pogojih, to je ob zmerni temperaturi in zalogi hranil, se gliva razmnožuje s hidrofilnimi kvasnimi celicami. Zračni hifni stadij je bolj odporen na skrajne pogoje v okolju zaradi močne sposobnosti pritrjanja, debelih in melaniziranih celičnih sten, endogene konidiacije in sposobnosti dormance; značilen naj bi bil za izsušene morske luže, ko se gliva razmnožuje z raznašanjem konidijev po zraku (de Hoog in Gerrits van den Ende, 1992). Glede na spremenljive pogoje v okolju solin, kjer poteka praznjenje in polnjenje bazenov s slano vodo, se življenjski krog *H. werneckii* v to okolje naravno vključuje (Zalar, 1999).

### **2.1.3 *Aureobasidium pullulans***

Gliva *Aureobasidium pullulans* (De Bary) G. Arnaud je črna kvasovka, ki spada v red *Dothideales*. Prvič je bila opisana leta 1866 kot *Dematium pullulans* de Bary (Hermanides-Nijhof, 1977). *A. pullulans* je kozmopolitska saprofitska vrsta, najdena tudi v rahlo osmotskih okoljih, kot so listi rastlin (filosfera), na vlažnem materialu, barvanem lesu in kamnih (Yurlova in sod., 1999), na steklu in v vlažilcih zraka (de Hoog in sod., 1997), na kovinski opremi, marmorju, rastlinah (hrast, trta), na okenskih okvirjih in kopalniških oknih (de Hoog in sod., 1999), izolirana pa je bila tudi iz solinske vode (Zalar, 1999). Poškodbe materialov, na katerih gliva raste so majhne, kar nakazuje njeno oligotrofno naravo (Yurlova in sod., 1999).

*A. pullulans* je polimorfna vrsta, večina raziskav pa je bila usmerjena v kvasno-hifni in kvasno-hlamidosporni dimorfizem. Oblika rasti pri *A. pullulans* je odvisna od vrste vira dušika; na amoniakalni obliki dušika raste v hifni obliki, na raznih drugih virih (sukcinamid, urea, nitrat, nitrit) pa v kvasni obliki (Griffin, 1994). Gliva sintetizira številne ekstracelularne encime, ki so potrebni za razgradnjo delno razgrajenih rastlinskih materialov (amilaze,

proteaze, pektinaze, esteraze, hemicelulaze, ksilanaze, manaze). Je znan potencialni rastlinski patogen, večinoma na grozdju (Leathers, 2003).

Različni sevi *A. pullulans* izločajo eksopolimere, najbolj poznan med njimi je pululan (Yurlova in de Hoog, 1997). Njegova fiziološka funkcija še ni povsem razjasnjena, vendar ne služi kot rezervni material, saj ga gliva ni sposobna razgraditi. Najverjetneje sodeluje pri pritranju glive na različne substrate (Leathers, 2003).

Vrsta je precej prilagodljiva, kar dokazuje tudi njena kozmopolitska narava, poleg tega je halotolerantna (Zalar, 1999), zato je lahko pri pogojih nižjih slanosti naselila tudi skrajno okolje solin. Verjetno pri nizki slanosti naseljuje tudi vodo, s pomočjo katere se razširja, pri višji slanosti pa se zaščiti s pomočjo kompleksno zgrajenih kapsul, ki uspešno zadržujejo vodo in varujejo celice pred izsušitvijo. Encimske aktivnosti nakazujejo, da je pri pogojih višjih slanosti eden redko razpoložljivih virov hrane odpadlo rastlinje ter da *A. pullulans* preživi le s težavo pri slanostih, pri katerih se razmnožujejo halobakterije in alge, ki so vir dušika drugim halofilnim črnim kvasovkam (Kocuvan, 2002).

## 2.2 ULTRAVIJOLIČNO SEVANJE

Ultravijolično sevanje je del širokega spektra sevanja, ki ga sonce oddaja proti Zemlji. Ultravijolično sevanje delimo v spektre UV-C (200- 290 nm), UV-B (290- 320 nm), UV-AI in UV-AII (320-400 nm) ter spekter vakumskega UV sevanja (<200 nm). Od valovne dolžine 400 nanometrov naprej je vidna svetloba. Večino sončnega sevanja, vključno s kratkovalovnim spektrom UV-C in večino spektra UV-B, zadrži naša atmosfera, pretežno ozonska plast (Cockell in Knowland, 1999).

Spektralno sevanje UV-svetlobe na površini Zemlje se spreminja s trenutnimi (del dneva, sezona), geografskimi (zemljepisna širina, nadmoska višina) in meteorološkimi (oblaki) dejavniki (Diffey, 1990).



## 2.2.1 Vpliv ultravijoličnega sevanja na biološke sisteme

Učinki UV-sevanja na biološke sisteme kažejo močno odvisnost od valovnih dolžin (Diffey, 1990). UV-sevanje ima škodljive učinke na vse žive organizme, segajoč od prokariontov do evkariontskih nižjih in višjih rastlin, gliv, živali in ljudi (Huges in sod., 2003). UV-C sevanje ekološko ni pomembno, saj ga absorbirata kisik in ozon v atmosferi, UV-B in UV-A sevanji pa lahko imata pomembne učinke na živ svet, četudi večino zunajzemeljskega UV-B sevanja absorbira stratosferski ozon (Sinha in Häder, 2002). Ultravijolična svetloba je visokoenergetska in, ker jo biološke makromolekule (proteini, nukleinske kisline, lipidi) učinkovito absorbirajo, je za mikroorganizme najbolj nevarna komponenta sončnega sevanja (Nicholson s sod. 2005).

Razne učinke sončnega sevanja je moč pripisati majhni količini UV-B sevanja, ki ga absorbira celična DNA. Valovne dolžine UV-A dela sevanja manj učinkovito povzročajo poškodbe DNA, ker jih nativna makromolekula ne absorbira, še vedno pa lahko povzročajo sekundarne fotoreakcije obstoječih fotoproduktov DNA ali jo poškodujejo preko posrednih reakcij (Sinha in Häder, 2002).

### 2.2.1.1 Absorpcijske značilnosti pomembnih biomolekul

Biološko pomembne molekule s fotokemijsko absorpcijo sprožijo biološke učinke, ki so posledica ultravijoličnega sevanja. Najpomembnejše so nukleinske kisline, manj proteini in druge molekule (Diffey, 1990).

- Nukleinske kisline

Kromofori (absorpcijski centri) so dvojne vezi nukleotidne baze znotraj nukleotidnih kislin. V DNA so te baze purinska derivata adenin in gvanin ter pirimidinska derivata timin in citozin. Četudi se absorpcijski spektri med bazami rahlo razlikujejo, imajo skupen absorpcijski maksimum med 260 in 265 nm s hitrim zmanjšanjem absorpcije pri daljših valovnih dolžinah

(Diffey, 1990). DNA je ena ključnih tarč za poškodbe z UV-svetlobo pri bakterijah, cianobakterijah, fitoplanktonu, makroalgah, rastlinah, glivah, živalih in ljudeh (Sinha in Häder, 2002).

- Proteini

Kot DNA tudi proteini najmočneje absorbirajo v UV-B in UV-C delu, z absorpcijskim vrhom okoli 280 nm. Absorbanca proteinov je nižja kot pri raztopinah nukleinskih kislin istih koncentracij (Diffey, 1990).

- Druge molekule

Absorpcija UV-svetlobe z drugimi molekulami ima lahko biološke posledice. Te molekule vključujejo porfirine, karotenoide, steroide in kinone (Diffey, 1990).

#### 2.2.1.2 Učinki UV-sevanja

Kratkovalovno UV-sevanje je biološko najbolj škodljiv del elektromagnetnega spektra za mnoge rastline, alge in glive (Huges in sod., 2003).

Med biološkimi učinki sončne UV-svetlobe lahko zasledimo:

- poškodbe DNA

Glavni fotoprodukti, ki sledijo po absorpciji UV-sevanja z DNA, so ciklobutan-pirimidinski dimeri (CPD) ter 6-4 fotoprodukti in njihovi Dewar valenčni izomeri (Sinha in Häder, 2002). Dewar izomeri nastanejo s fotoizomerizacijo 6-4 fotoproduktov pri valovnih dolžinah, daljših od 290 nm. Po obsevanju z UV-svetlobo so ciklobutan-pirimidinski dimeri najštevilčnejši fotoprodukti in verjetno najbolj citotoksični, čeprav imajo lahko 6-4 fotoprodukti resnejše, potencialno smrtne mutagene učinke. Tako lahko celice in viruse inaktiviramo z izpostavitvijo UV-sevanju, po katerem izgubijo sposobnost razmnoževanja (Diffey, 1990).

- zmanjšanje rasti in preživetja celic;

Visokoenergetski kratkovalovni fotoni, ki jih absorbirajo kromoforne molekule, lahko vodijo v tvorbo singlet kisika ali prostih radikalov, ki uničujejo membrane in druge celične komponente (Sinha in Häder, 2002). "Far-UV" (200–320 nm) sevanje regulira reproduktivni razvoj pri rastlinah in glivah, pri glivah preko indukcije mikosporinov stimulira spolno in nespolno morfogenezo (Ensminger, 1993). Izpostavitve sončnemu sevanju, posebej biološko škodljivemu UV-B, lahko zmanjša rast gliv (Huges in sod., 2003),

- uničenje proteinov;
- razbarvanje pigmentov;
- fotoinhibicija fotosinteze.

Učinek UV-sevanja na inaktivacijo mikroorganizmov je odvisen od doze, ki jo določata intenziteta sevanja in čas izpostavitve. Bunsen-Roscoe recipročni zakon pravi, da za učinkovitost sevanja ni pomembno, kako je dosežena neka doza sevanja; ali gre za visoke intenzitete in kratek čas izpostavljanja, ali za nizke intenzitete in dolgotrajno izpostavitve sevanju (Sommer in sod., 1996). Pri *S. cerevisiae* so nižje intenzitete UV-sevanja in daljše izpostavitve sevanju povzročile pospešeno uničenje, tako pri haploidnih kot tudi pri diploidnih sevih (Sommer in sod., 1996).

Toleranca na UV-sevanje je povezana s stopnjo UV-sevanja v naravnem habitatu organizma. Organizmi so lahko tolerantni na UV-svetlobo zaradi prisotnosti mnogih popravljalnih mehanizmov, ki encimsko popravljajo poškodovano DNA (Arrage in sod., 1993), lahko zaradi prisotnosti pigmentov (Kawamura in sod., 1998; Durrell, 1964; Turkovskii in Yurlova, 2002; Wang in Casadevall, 1994).

## 2.3 MELANINI

### 2.3.1 Kaj so melanini ?

Melanini so črnorjavi do rjavi pigmenti pri živalih, rastlinah in mikroorganizmih (Bell in Wheeler, 1986). Spadajo med najbolj stabilne, netopne in odporne biokemijske materiale (Jacobson, 2000). So biološke makromolekule, ki jih gradijo različni tipi fenolnih ali indolnih monomerov, večinoma povezani s proteini, pogosto tudi z ogljikovimi hidrati (Butler in Day, 1998).

Melanini predstavljajo razred snovi in po Nicolausu (1968, cit. po Blois, 1978) ločimo tri skupine melaninov:

**-evmelanini** so rjavi do črni pigmenti višjih organizmov, so netopne, polimerne snovi, nastale iz tirozina po pretvorbi v dihidroksifenilalanin (DOPA) in so najbolj poznani;

**-feomelanini** so rdečkasti pigmenti človeških las in perja, so modifikacija evmelaninov (cistein je vključen v kopolimerizacijo DOPA in njenih derivatov);

**-alomelanini** so skupina črnih pigmentov, ki jih najdemo pri nižjih organizmih in so netopni polimeri, podobni DOPA-melaninom, a nastanejo iz kateholov, 1,8,-dihidroksinaftalena (DHN) ali scitalona po pretvorbi v polihidroksinaftalene, morda tudi iz drugih prekurzorjev, ki ne vsebujejo dušika.

Melanini nimajo bistvenega pomena za rast in razvoj, vendar povečajo preživetje in kompetitivne sposobnosti vrst v določenih okoljih (Bell in Wheeler, 1986). Melanini so slabo topni v bazah, netopni v vodi, vodnih kislinah in običajnih organskih topilih (Fogarty in Tobin, 1996; Bell in Wheeler, 1986).

## 2.3.1 Glivni melanini

### 2.3.1.1 Citologija sinteze glivnih melaninov

Melanini se pojavljajo v celičnih stenah ali kot zunajcelični polimeri v gojišču okrog glivnih celic (Bell in Wheeler, 1986). V citoplazmi gliv melanina niso našli. Vzorec melaninskih zrn v celičnih stenah naj bi bil posledica izločanja melaninskih prekurzorjev iz citoplazme v steno, kjer oksidirajo v melanin. Zunajcelični melanini se sintetizirajo popolnoma ločeno od celične stene, kar so opazili pri aktinomicetah, bakterijah in pri za človeka patogenih glivah. Nastanejo lahko na dva načina: fenoloksidaze, ki jih glive sprostijo v zunanje okolje, lahko oksidirajo fenolne komponente različnega izvora v kulturi, lahko pa fenoli, sproščeni v zunanje okolje avtooksidirajo ali jih oksidirajo encimi, ki se med avtolizo pogosto sproščajo iz gliv. V stresanih kulturah se z avtooksidacijo nastali zunajcelični melanin lahko pritrdi na površino stene glive ali matriksa, kar lahko da lažni vtis *na steno vezanega melanina*. Tako se imenujejo melaninska zrna nitastega matriksa in tista zrna, ki se s fibril matriksa odtrgajo in sprostijo v okolje. Zunajcelični melanini, nastali s sekrecijo fenolov, predstavljajo precejšen delež biomase gliv v zemlji in so pomemben vir humusa (Bell in Wheeler, 1986).

### 2.3.1.2 Kemijske in fizikalne lastnosti melaninov

Otežena ekstrakcija in čiščenje naravnih melaninov omejujeta podrobno kemijsko karakterizacijo teh polimerov in njihovih povezav z drugimi biološkimi in anorganskimi molekulami. Sestava "čistega" melanina še ni povsem jasna, saj ekstrakcijske metode z uporabo vročih topil ali kislin lahko melanin spremenijo in uničijo biološke molekule, ki so nanj vezane v naravi (Henson in sod., 1999).

Barva melaninov je različna zaradi valovne dolžine in količine absorbirane svetlobe, kar je odvisno od strukture in velikosti polimera, prečnih povezav, oksidacijskega stanja, položaja v celici in povezav z drugimi celičnimi komponentami (Butler in Day, 1998). Črna barva melaninov je posledica absorpcije vseh vidnih valovnih dolžin svetlobe. Delež absorpcije je

največji v UV-delu spektra in upada z naraščanjem valovne dolžine proti oddaljenemu infrardečem delu spektra (Bell in Wheeler, 1986).

Melanin je eden izmed redkih poznanih stabilnih prostih radikalov in lahko deluje kot nevtralizacijsko sito za druge proste radikale, ki so posledica stresa v okolju (UV-sevanje, visoke temperature). Suspendiranje melanina v vodi, obsevanje z UV- ali gama žarki, inkubacija pri povišani temperaturi ali reakcije s kemičnimi reducenti povzročijo začasno povišanje koncentracij prostih radikalov v melaninu, povišanju pa sledi upad koncentracij. Oksidacija zmanjša vsebnost prostih radikalov v melaninu. Vsebnost prostih radikalov se določa z elektronsko spinsko resonanco (ESR), ki radikale zazna kot paramagnetne delce (Bell in Wheeler, 1986). Intenziteta ESR-signala je proporcionalna s koncentracijo neparnih elektronov v melaninu in narašča z vsebnostjo melanina (Wang in sod., 1996).

Zaradi svoje fenolne narave lahko melanini in njihovi prekurzorji inhibirajo encime in delujejo citotoksično (Henson in sod., 1999). Aromatski obroči in proste hidroksilne skupine omogočajo melaninu ionske, kovalentne in hidrofobne vezave z drugimi organskimi in anorganskimi molekulami, kot so proteini, polisaharidi, kovinski ioni, pesticidi, antibiotiki in onesnaževalci.

DOPA melanini pretvorijo energijo oddaljene vidne, UV- in IR-svetlobe v toploto. Melanin tako zaščiti celico pred škodljivimi učinki sevanja in elektronske energije s tem, ko ju pretvori v vibracijsko in rotacijsko aktivnost v lastni molekularni strukturi, kjer se izgubljata kot toplota (Butler in Day, 1998).

### **2.3.2 Vloge melaninov**

- Odpornost proti mikrobnemu stresu

Pri nevretenčarjih so melanini del imunskega odgovora na mikroorganizme. Podobno obrambno vlogo imajo melanini pri rastlinah (Bell in Wheeler, 1986). Melanini gliv so prav

tako pomembni za odpornost na napad mikrobov. Hialine (prosojne) spore ali hife v zemlji hitro lizirajo, melanizirane pa lahko preživijo več let. Večina glivne biomase v zemlji je zato melanizirana (Bell in Wheeler, 1986). Včasih imajo melanin in stranski produkti antibiotični učinek na antagonistične mikroorganizme (Bloomfield in Alexander, 1967).

- Patogenost in virulentnost

Odsotnost melanina v rastlinskih in za človeka patogenih glivah pogosto vodi do zmanjšanja virulentnosti. Močno melanizirana celična stena ščiti za človeka patogene glive pred obrambnimi sistemi gostiteljskega organizma (Langfelder in sod., 2003).

- Odpornost proti fungicidom

Naravni DOPA melanini vežejo zdravila, kot sta klorpromazin in klorokin. Možni sta tudi vezava in inaktivacija fungicidov (Henson in sod., 1999).

- Interakcije s kovinami

Melanini vsebujejo karboksilne, fenolne, hidroksilne in amino skupine, ki predstavljajo številna potencialna vezavna mesta za kovinske ione. Z vezavo toksičnih kovinskih ionov melanin nudi zaščito melaniziranim glivam, kar jim omogoča boljšo rast v toksičnih okoljih, ščiti lahko tudi pred antagonističnimi mikrobi (Fogarty in Tobin, 1996).

- Diferenciacija celic

Določene glive imajo hialine hife ali kvasovkam podobne celice, tvorijo pa melanizirane hlamidospore, sklerocije, razmnoževalne strukture in spolne spore (askospore in bazidiospore). Sinteza melanina in pojav aktivne lakaze ali tirozinaze sta pogosto povezana s celično diferenciacijo teh gliv. Melanin lahko nudi strukturno togost kompleksnim strukturam, kot so sklerociji in askokarpi, a ni potreben za diferenciacijo posameznih specializiranih celic (Bell in Wheeler, 1986).

- Odpornost proti stresu v okolju:

#### Zaščita celic pred izsušitvijo in skrajnimi temperaturami

Le-tej so posvečali malo pozornosti. Vsi tipi melaninov, naravni in sintetični, vsebujejo velike količine vode, ki je bistvena za ohranjanje strukture pigmenta. Zaradi sposobnosti vezave vode so možni kandidati za materiale, ki preprečujejo izsušitev celice (Butler in Day, 1998).

Melanin naj bi ščitil tudi pred visokimi in nizkimi temperaturami v *Cryptococcus neoformans* (Rosas in Casadevall, 1997, cit. po Nosanchuk in Casadevall, 2003).

#### Zaščita pred ultravijoličnim sevanjem

Bistvena biološka vloga melaninov je zaščita celic pred škodljivimi učinki različnih tipov sevanja. Povezana je s specifično kemijsko strukturo melanina, ki jo določajo konjugirane dvojne vezi in sposobnost tvorbe paramagnetnih centrov, zaradi katerih lahko melanin pretvori energijo UV- in IR-sevanja v toploto in odstranjuje citotoksične proste radikale (Turkovskii in Yurlova, 2002).

Melanini izražajo odpornost proti UV-svetlobi s svojo sposobnostjo absorpcije obsežnega dela elektromagnetnega spektra in tako preprečujejo s svetlobo inducirane poškodbe (Nosanchuk in Casadevall, 2003). Melanizirane kvasne celice glive *C. neoformans* so bolj odporne proti fungicidnim učinkom UV-sevanja kot nemelanizirane celice, katerih delež preživetja je upadal s starostjo kulture (Wang in Casadevall, 1994). Tudi Tsimako in sodelavci (2002) poročajo, da je preživetje naraščalo sorazmerno s pigmentiranostjo sevov *Cryptococcus* sp. Glive z melaniziranimi sporami so bolj odporne proti uničenju z UV-sevanjem ali sončnim žarčenjem kot glive s hialinimi sporami (Kawamura in sod., 1998; Durrell, 1964). Ustavitev sinteze melanina s heksakloroacetonom poveča uničenje glivnih celic z UV-svetlobo (Durrell, 1964). Stopnja zaščite je sorazmerna s koncentracijo (Zhdanova in Pokhodenko, 1973) in lokacijo melanina v stenah spor (Durrell, 1964). Podobno velja za odpornost spor na rentgensko in  $\gamma$ -žarčenje, kjer je stopnja odpornosti direktno povezana s količino melanina, merjenega z ESR. Največ spor preživi žarčenje pri srednji (40 % - 60 %) relativni zračni vlažnosti (Zhdanova in Pokhodenko, 1973).



### 2.3.3 Melanin pri črnih kvasovkah iz Sečoveljskih solin

Melanin so pri črnih kvasovkah določali s transmisijsko elektronsko mikroskopijo, kjer so preparate pripravili z dvema tehnikama histološkega barvanja pigmenta (Nile blue in Fontana-Masson), z encimsko inhibicijo melaninske sinteze s triciklazolom, specifičnim inhibitorjem sintezne poti DHN-melanina ter analizo intermediatov melaninske sinteze s tankoplastno kromatografijo (Kogej, 2002).

Vrste *H. werneckii*, *T. salinum* in *P. triangularis* sintetizirajo DHN-melanin po pentaketidni poti. Isti tip melanina sintetizirajo tudi ob prisotnosti 10 % NaCl (w/v) v gojišču (Kogej, 2002; Kogej in sod., 2004). Iz literature je znano, da tudi vrsta *A. pullulans* sintetizira DHN-melanin (Siehr, 1981; Wheeler in Bell, 1988, cit. po Kogej, 2002), vendar sev B-802 v izbranih pogojih rasti ni počrnel, razen po daljšem času, ko se je kultura postarala in najbrž tvorila hlamidospore, ki so melanizirane. Vegetativna oblika glive je le redko postala rahlo temno obarvana. Opažena je bila le povečana melanizacija celic ob znižanju temperature v okolju (Kogej, 2002). Sinteza melanina pri *A. pullulans* je povezana s suboptimalnimi pogoji rasti, zato na gojišču, bogatem z amonijakalno obliko dušika sinteza melanina poteka zelo počasi ali pa sinteze sploh ni (Siehr, 1981).

Melanizacija gliv se spreminja s starostjo celic, z morfologijo in slanostjo gojišča. Najprej so prisotne kvasne celice; pri *T. salinum* so takoj črne, pri *P. triangularis* in *H. werneckii* pa so najprej prozorne, potem olivno zelene do rjave (Kogej, 2002). Sledi razvoj hif, pravih pri *H. werneckii* in meristematskih pri *T. salinum*, ki so večinoma obarvane, razen na koncih (*T. salinum*, *H. werneckii*), ali pa so zelo dolgo neobarvane in potemniijo šele pri starih kolonijah (*P. triangularis*). Zračne hife so neobarvane, izjema so pri *T. salinum* na gojišču z 2 % NaCl, kjer so rumene, in pri *H. werneckii*, kjer s staranjem posivijo. Kolonije *A. pullulans* šele s staranjem melanizirajo, na nižjih slanostih najprej oblikujejo temnejše sektorje in sčasoma potemniijo, so svetleče, pri višjih slanostih pa postanejo rjave (Kogej, 2002).

Melanin je v celicah *T. salinum* prisoten v obliki pravilno kroglastih melaninskih zrn, kadar gliva raste v okolju brez soli, oziroma oblikuje strnjen, enoten melaninski sloj v zunanji plasti celične stene pri 10 in 20 % (m/V) NaCl. Podoben vzorec odlaganja sicer redkejših melaninskih zrn je prisoten tudi pri *H. werneckii* in *P. triangularis*. Pri višjih slanostih se prav tako oblikuje sloj melanina, ki pa je na zunanji strani celične stene, včasih kot del ekstracelularnega matriksa. Pri *H. werneckii* je celična stena melanizirana predvsem pri nižjih slanostih. Pri najvišjih koncentracijah (20 % NaCl) je strnjen sloj prisoten le še pri *T. salinum*, pri *P. triangularis* in *H. werneckii* je moč zaslediti le posamezna melaninska zrna. Konidiji *H. werneckii* imajo različne stopnje melanizacije celične stene. Pri enoceličnih konidijih stena ni melanizirana, pri večjih dvoceličnih konidijih, ki so verjetno starejši, se na posameznih delih zunanjega dela celične stene kopičijo melaninska zrna, ki pri še starejših konidijih verjetno ustvarijo enoten strnjen melaniziran sloj na površini celične stene.

S poviševanjem slanosti se melaninska zrna v celični steni halofilnih črnih kvasovk pomaknejo proti zunanji slojem celične stene in oblikujejo bolj strnjen sloj. Spremeni se organiziranost melaninskih zrn v celični steni v odvisnosti od slanosti (Kogej, 2002).

### 3 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

#### 3.1 NAMEN

Cilji naše raziskave so bili:

- (i) pri halofilni črni kvasovki *Hortaea werneckii* in halotolerantni *Aureobasidium pullulans* ugotoviti, kolikšno dozo fungicidnega UV-C-sevanja preživita;
- (ii) ugotoviti, katera od preiskovanih črnih kvasovk je bolj odporna na sevanje UV-C v primerjavi z nemelanizirano pivsko kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*;
- (iii) ter ugotoviti, v kateri fazi rasti in pri kateri slanosti gojišča so črne kvasovke najbolj odporne na UV-C-sevanje.

#### 3.2 DELOVNE HIPOTEZE

Naravna ekološka niša halofilnih in halotolerantnih črnih kvasovk je izjemno slana voda solin. Tam so izpostavljene številnim stresnim dejavnikom, od nihajočih koncentracij NaCl do visokega UV-sevanja. Ker imajo črne kvasovke pri povišani slanosti v stacionarni fazi rasti strnjeno melaninsko plast v zunanji plasti celične stene, pričakujemo, da bodo take celice po obsevanju z UV-C svetlobo preživele v večji meri kot celice, ki so rasle na gojišču brez dodane soli (NaCl).

## 4 MATERIAL IN METODE

### 4.1 MIKROORGANIZMI IN POGOJI RASTI

#### 4.1.1 Sevi

Proučevali smo seva črnih kvasovk iz redu *Dothideales*, izolirana iz Sečoveljskih solin: *Hortaea werneckii* (MZKI B-736) in *Aureobasidium pullulans* (MZKI B-802), kot primerjalni organizem pa smo uporabili sev pivske kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (K-86). Vsi trije sevi se nahajajo v Mikrobiološki zbirki Kemijskega inštituta ter v mikrobiološki zbirki EX Katedre za biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete.

#### 4.1.2 Gojišče

Pri vseh postopkih gojenja smo uporabili sintetsko definirano gojišče YNB (Yeast Nitrogen Base):

- YNB (BIO 101) 1,7 g (0,17 % (m/v))
- CSM (BIO 101) 0,8 g (0,08 % (m/v))
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Merck) 5 g (0,5 % (m/v))
- glukoza (Kemika) 20 g (20 % (m/v))
- destilirana voda do 1000 ml
- pH uravnan na 7,0 z 2 M NaOH.
- različna koncentracija NaCl (0 %, 5 %, 17 % (m/v)), za trdna gojišča dodan še 2-odstotni agar (Biolife).

Gojišča smo avtoklavirali 15 minut pri 121° C.

### 4.1.3 Gojenje

Iz zamrznjene založne kulture smo posamezno glivo nacepili na trdna gojišča YNB brez in z dodanim NaCl in ploščo aerobno inkubirali pri 28° C do pojava kolonij. Za predkulturo smo kolonijo s plošče nacepili v 20 ml ustreznega tekočega gojišča in ga inkubirali na rotacijskem stresalniku pri 28° C in 180 vrtljajih na minuto, dokler celična kultura ni dosegla primerne števila celic. Prirast celic smo spremljali z merjenjem optične gostote (OD) s spektrofotometrom pri valovni dolžini 600 nm proti sterilnemu gojišču ustrezne slanosti in tako določili rastne krivulje. Ko so celice predkulture dosegle logaritemsko oz. eksponentno fazo ( $OD_{600}=1$ ), smo 0,5 ml vzorca nacepili v 100 ml tekočega gojišča YNB (v pollitrskih steklenicah Erlenmeyer) in inkubirali na enak način kot predkulture. Kulture smo uporabili za obsevanje z UV-svetlobo, ko so dosegle eksponentno ( $OD_{600} = 1$ ) oziroma stacionarno fazo rasti ( $OD_{600} = 2,5$ ).

Za ugotavljanje odpornosti preučevanih organizmov na ultravijolično sevanje in za določitev rastnih krivulj smo *A. pullulans* in *S. cerevisiae* gojili na gojišču brez soli in na gojišču z dodano 5-odstotno koncentracijo kemijsko čistega NaCl, za gojenje halofilne črne kvasovke *H. werneckii* pa smo uporabili gojišče brez soli in gojišče z dodano 17-odstotno koncentracijo NaCl.

## 4.2 PRIPRAVA KULTUR ZA OBSEVANJE Z ULTRAVIJOLIČNO SVETLOBO

Celice v tekoči kulturi smo prešteli v eksponentni in stacionarni fazi rasti in tako določili ustrezno redčitev kulture, ki smo jo nacepili na plošče. Kulturo smo redčili v 0,01-odstotni vodni raztopini detergenta Tween 80 (Sigma), da smo preprečili lepljenje celic v skupke. Celice smo šteli pod mikroskopom s pomočjo števne komore Petrof-Hauser in njihovo število v 1 ml vzorca določili po naslednji enačbi:

$$N = n \times 25 \times 10^4 \times \text{redčitev}$$

N= število celic v ml vzorca

n= povprečno število celic v 5 prešteti kvadratih

Suspenzijo celic smo razredčili do števila 1000 – 4000 celic/ml. Na sterilne petrijevke z gojiščem ustrezne slanosti smo nanесли po 0,1 ml celične suspenzije, tako smo zagotovili števno plošč.

### 4.3 OBSEVANJE Z ULTRAVIJOLIČNO SVETLOBO

Poskusi so potekali v zaprtem laminariju, plošče z vzorcem smo nameščali na stojalo z nastavljivo višino, kar nam je v preliminarnih testih s spreminjanjem časa obsevanja in razdalje od vzorca do vira germicidnega sevanja omogočilo določitev štirih doz sevanja. Doza ultravijoličnega sevanja je določena z jakostjo sevanja in trajanjem izpostavitve sevanju, pri čemer je jakost sevanja izražena kot energija na enoto površine:

$$D = I \cdot t ; [mJ/cm^2] \quad \dots(1)$$

Določili smo štiri doze sevanja: 4, 8, 16 in 24 mJ/cm<sup>2</sup>. Za fungicidno smo določili dozo sevanja z 90-odstotnim uničenjem celic.

Vir ultravijoličnega sevanja je predstavljala žarnica tipa Sylvania (30 W, 220 V, λ=254 nm), ki smo jo namestili na strop laminarija. Germicidne žarnice emitirajo UV-svetlobo valovne dolžine 253,7 nm v UV-C delu UV-spektra. Ta tarčna valovna dolžina je najbolj učinkovita za sterilizacijo raznih površin, materialov, zraka in vode.

Za vsako glivo smo izvedli 5 neodvisnih poskusov, ki so potekali v obeh fazah rasti, na dveh tipih gojišč, z različnimi dozami sevanja in vsakič v treh ponovitvah kontrolnih in obsevanih plošč. Po obsevanju smo plošče inkubirali v temi na temperaturi 28° C do pojava kolonij.

Stopnjo preživetja smo določili s primerjavo števila kolonij (enot, ki tvorijo kolonije - CFU), zraslih na kontrolnih in obsevanih ploščah. Podatke smo statistično obdelali z analizo povprečja in analizo variance (ANOVA) ter rezultate prikazali v krivuljah preživetja. Za primerjavo nam je služila nemelanizirana pivska kvasovka *S. cerevisiae*.

#### 4.4 STATISTIČNE METODE OBDELAVE PODATKOV

##### 4.4.1 Statistični parametri

- **aritmetična sredina**  $\bar{X}$

Je mera srednje vrednosti. Nanjo vpliva vrednost statističnega znaka vsake enote. Predstavlja nam nekakšno težišče podatkov, saj je vsota vseh odklonov od aritmetične sredine vedno enaka nič. Formula za izračun je:

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{N} \quad \dots(2)$$

- **standardna napaka aritmetične sredine**  $SE_{\bar{X}}$

Je mera odstopanja aritmetične sredine vzorca od aritmetične sredine populacije. Večji kot je vzorec in manjša njegova variabilnost, boljša je ocena aritmetične sredine in manjša njena napaka. Formula za izračun je:

$$SE_{\bar{X}} = \frac{s}{\sqrt{N}} \quad \dots(3)$$

- **standardna deviacija (s)**

Je opisni parameter variacije in predstavlja kvadratni koren variance. Varianca je osnovna mera variacije in predstavlja povprečje kvadratov odklonov posameznih vrednosti od aritmetične sredine. Formula za izračun je:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(X-\bar{X})^2}{N-1}} \quad \dots(4)$$

- **interval zaupanja**

Interval zaupanja, ki ga določata njegova spodnja in zgornja meja, je interval, v katerem se z dano gotovostjo (ponavadi določimo 95-odstotno) nahaja ocenjevani parameter.

Na osnovi slučajnega vzorca lahko ob izbrani stopnji zaupanja  $p= 1-\alpha$  določimo interval zaupanja za izbrani parameter. Ker se podatki vzorcev razlikujejo, se razlikujejo vzorčne ocene parametrov in zato tudi izračunane meje intervala zaupanja za ocenjevani parameter. Z intervalom zaupanja torej s stopnjo zaupanja  $1-\alpha$  določimo meje, za katere velja, da z verjetnostjo  $1-\alpha$  vključujejo izbrani parameter. V primeru t-porazdelitve, ki je zvonasta, simetrična, definirana na celotnem intervalu  $[-\infty, \infty]$  in z enojnimi stopnjami prostosti  $df$ , je formula za izračun:

$$\bar{X} \pm t_p SE \quad \dots(5)$$



- **Analiza variance**

Analizo variance smo izvedli s pomočjo statističnega programa SPSS za Windows okolje. Analiza variance primerja varianco posameznega parametra med vzorci z varianco znotraj vzorca. Z njo preverjamo ničelno hipotezo, ki predvideva, da se povprečni parameter posameznega vzorca ne razlikuje od povprečja istega parametra vseh vzorcev oz. od skupnega povprečja. Posledica potrditve ničelne hipoteze je dejstvo, da obravnavani vzorci pripadajo isti populaciji. Alternativna hipoteza pa pravi, da razlike med povprečji posameznih vzorcev niso zgolj naključne, čemur sledi, da so vzorci odvzeti iz različnih populacij.

Izračunano vrednost  $F$  (razmerje med medvzorčno in znotrajvzorčno variabilnostjo) primerjamo s teoretično v  $F$ -porazdelitvi pri stopinjah prostosti  $df_1=a-1$  in  $df_2=N-a$  ter vrednosti  $a$ , ki predstavlja število obravnavanih vzorcev. Če empirični  $F$  preseže kritično vrednost, z določenim tveganjem privzamemo, da vsaj en obravnavani vzorec ne spada k povprečju ostalih.

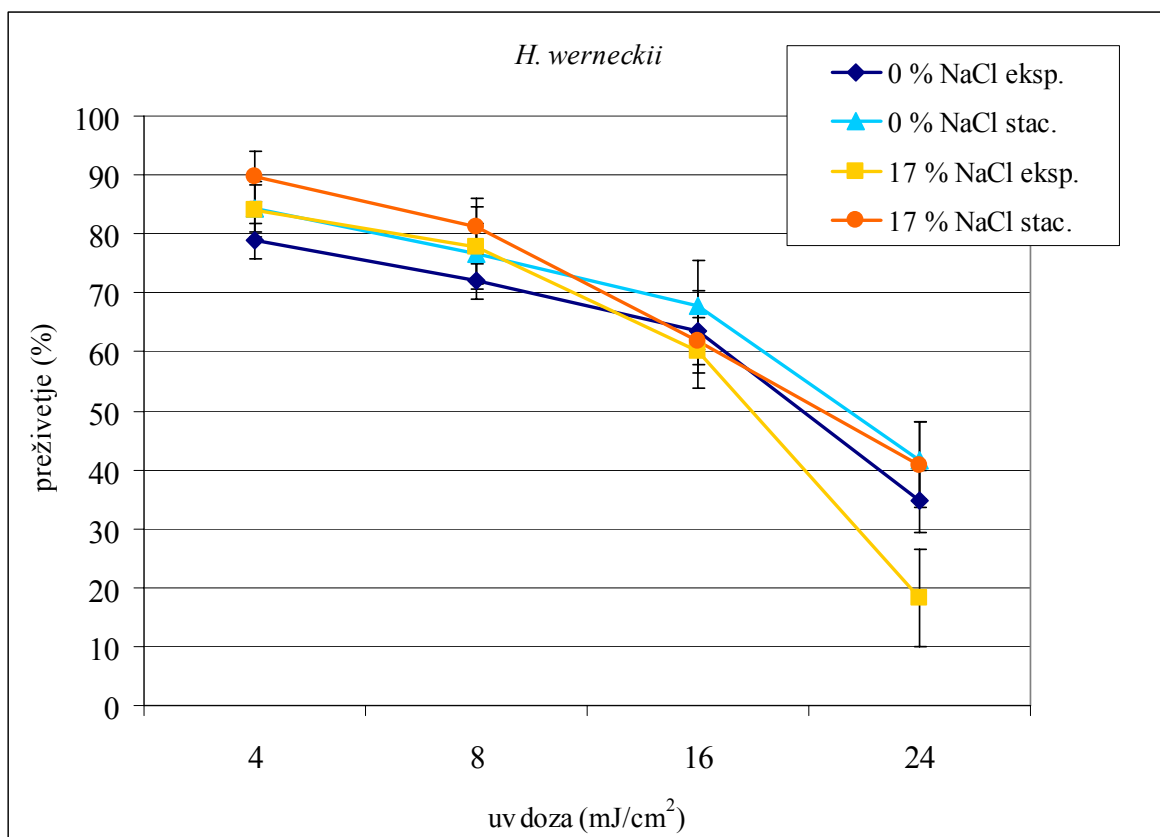
## 5 REZULTATI

Preiskovane kvasovke smo ultravijoličnemu sevanju izpostavili na trdnih gojiščih YNB brez in z dodatkom NaCl pri štirih različnih dozah sevanja, v eksponentni in stacionarni fazi rasti. *S. cerevisiae* smo uporabili kot kontrolni organizem. Preživetje smo določili s primerjavo števila zraslih kolonij (enot, ki tvorijo kolonije - CFU) na obsevanih in kontrolnih ploščah ter izračunali odstotke preživetja z intervali zaupanja (95 % CI). Rezultate predstavlja povprečje petih neodvisnih poskusov. Za fungicidno dozo sevanja smo določili dozo z 90-odstotnim uničenjem celic. Podatke smo analizirali s pomočjo statističnega programa SPSS. Izvedli smo univariatno analizo variance, pri čemer smo kot faktorje vpliva na preživetje gliv analizirali vrsto glive (Vrsta), uporabljeno dozo sevanja (Doza), slanost gojišča (Slanost) in fazo rasti (Fazarasti).

### 5.1 PREŽIVETJE HALOFILNE ČRNE KVASOVKE *Hortaea werneckii* PO OBSEVANJU Z ULTRAVIJOLIČNO SVETLOBO

*H. werneckii* smo sevanju izpostavili na trdnih gojiščih YNB in YNB s 17 % NaCl v eksponentni in stacionarni fazi rasti. Vrednosti so prikazane z intervali zaupanja pri 95-odstotni stopnji zaupanja.

Preživetje *H. werneckii* je največje v stacionarni fazi na obeh tipih gojišča. Fungicidne doze UV-C sevanja nismo dosegli z uporabljenimi UV-dozami.

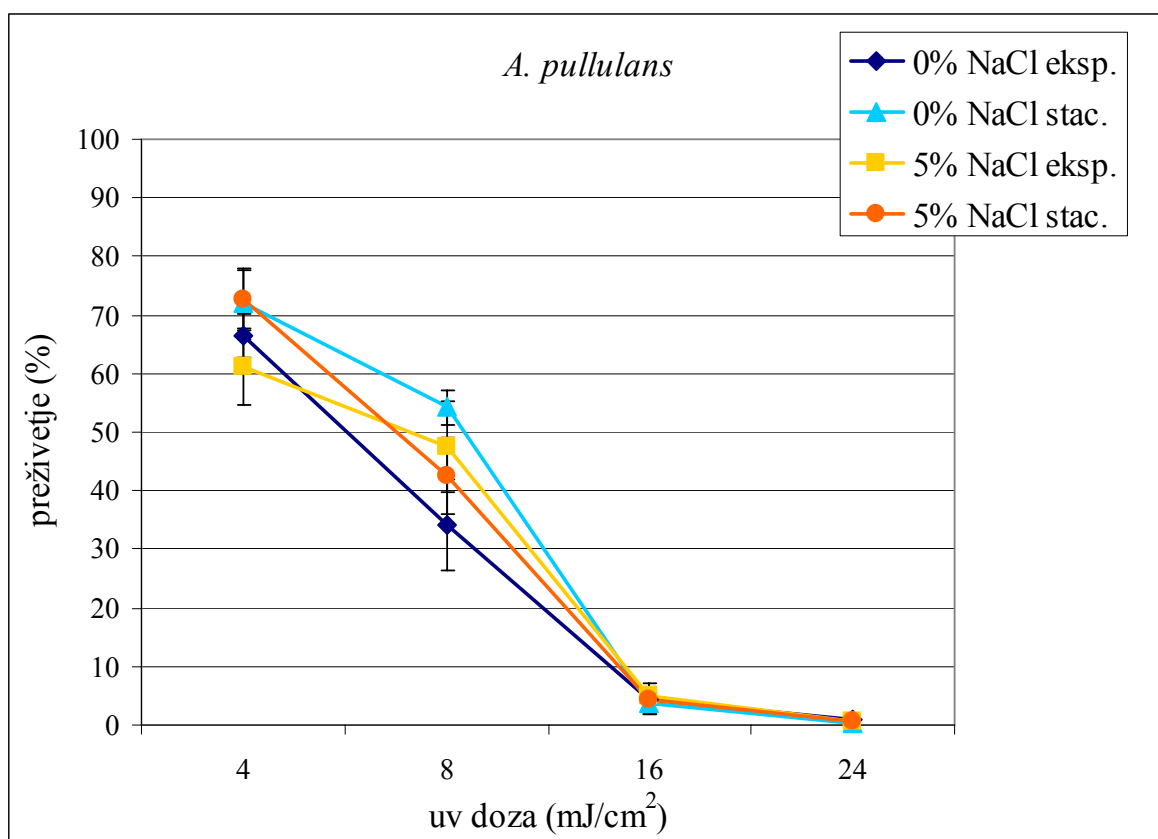


**Slika 1:** Krivulja preživetja za *H.werneckii* na gojiščih YNB in YNB s 17 % (m/v) NaCl v eksponentni in stacionarni fazi rasti. Prikazani rezultati so povprečje petih poskusov.

## 5.2 PREŽIVETJE HALOTOLERANTNE ČRNE KVASOVKE *Aureobasidium pullulans* PO OBSEVANJU Z ULTRAVIJOLIČNO SVETLOBO

*A. pullulans* smo sevanju izpostavili na trdnih gojiščih YNB in YNB s 5 % (m/v) NaCl. Vrednosti so prikazane z intervali zaupanja pri 95 % stopnji zaupanja.

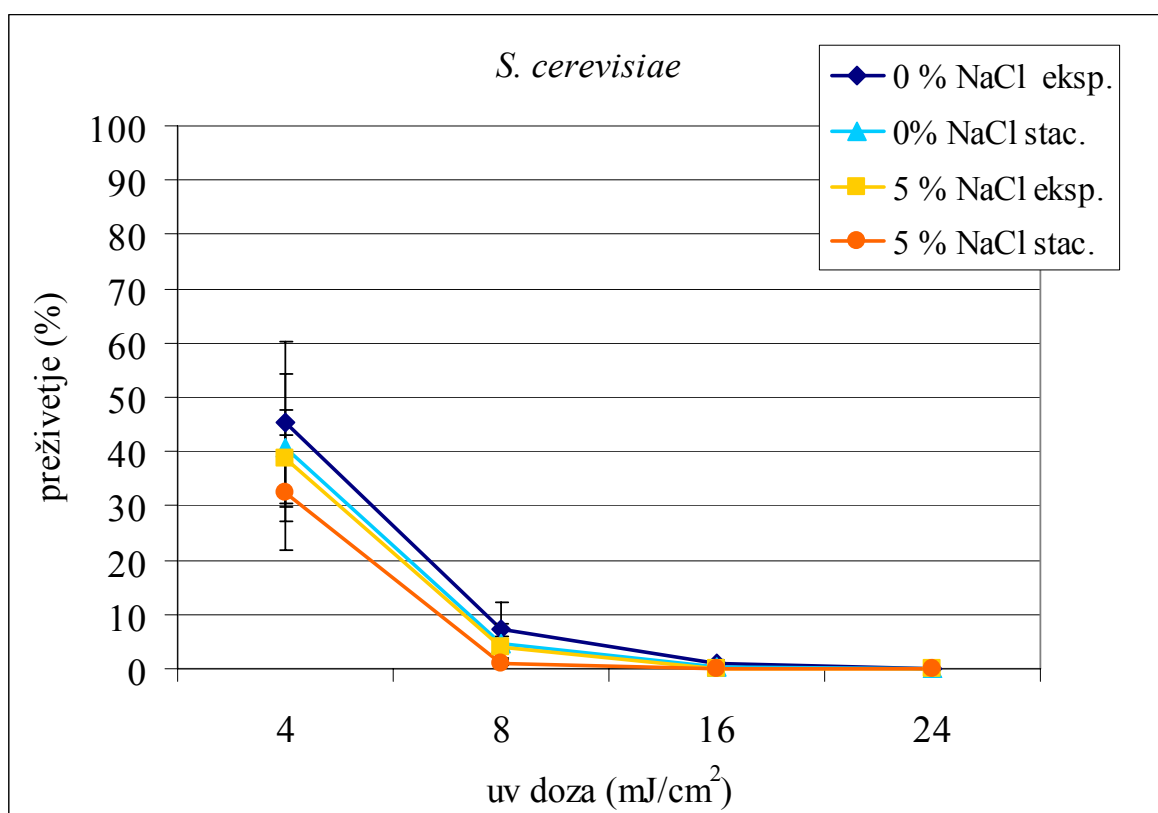
Preživetje *A. pullulans* je največje v stacionarni fazi na gojišču YNB. Kot fungicidna se je pokazala že doza UV-C sevanja 16 mJ/cm<sup>2</sup>.



**Slika 2:** Krivulja preživetja za *A. pullulans* na gojišču YNB in YNB s 5 % (m/v) v eksponentni in stacionarni fazi rasti. Prikazani rezultati so povprečje petih poskusov.

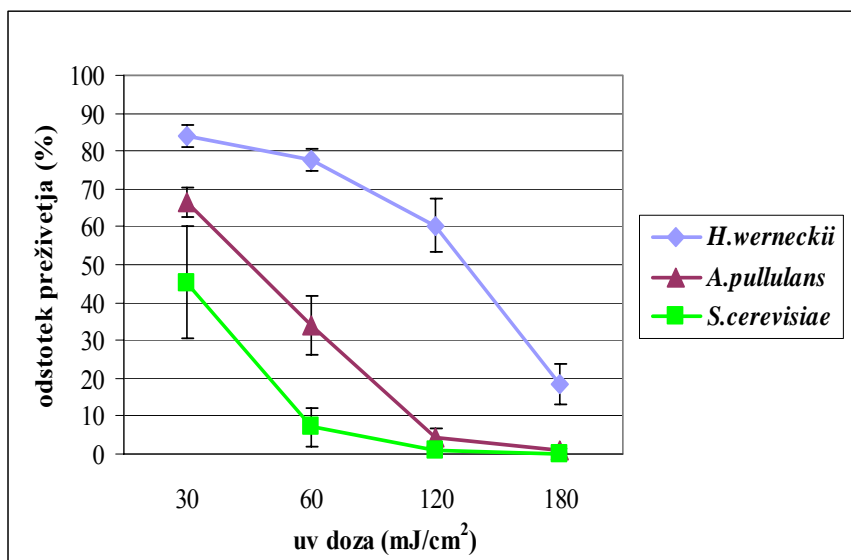
### 5.3 PREŽIVETJE KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae* PO OBSEVANJU Z ULTRAVIJOLIČNO SVETLOBO

*S. cerevisiae* UV-sevanje najbolje preživi v eksponentni fazi na gojišču YNB, slanostni stres in večja starost celic zmanjšujejo preživetje te kvasovke. Fungicidna je zanjo že doza 8 mJ/cm<sup>2</sup>.

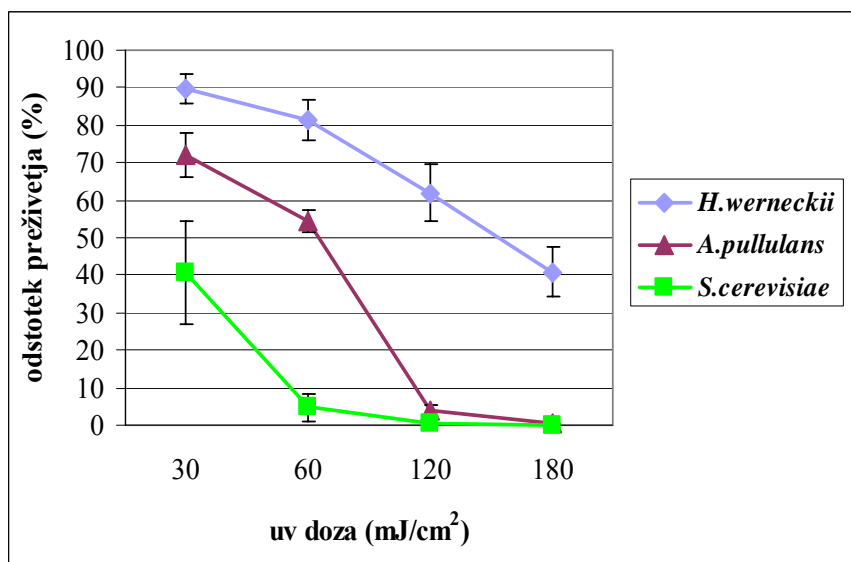


**Slika 3:** Krivulja preživetja za *S. cerevisiae* na gojišču YNB in YNB s 5 % (m/v) v eksponentni in stacionarni fazi rasti. Prikazani rezultati so povprečje petih poskusov.

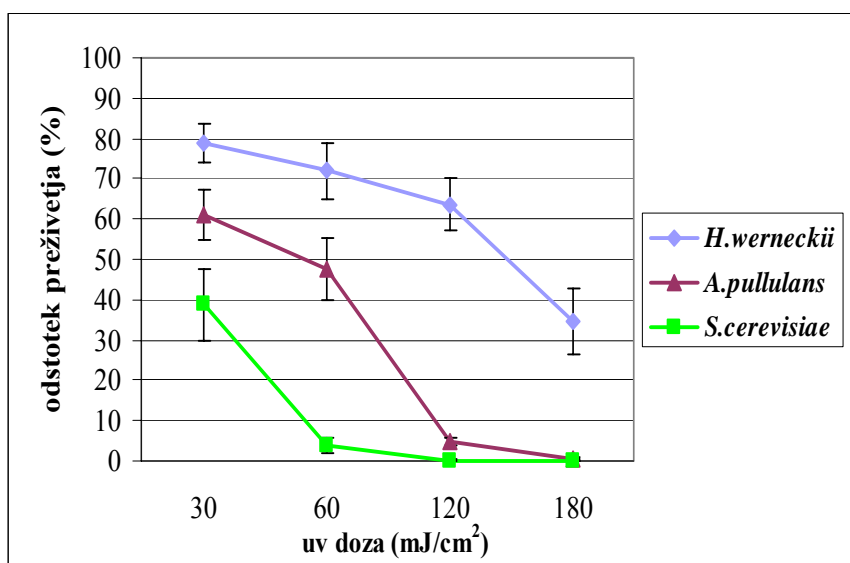
#### 5.4 PRIMERJAVA PREŽIVETIJ PROUČEVANIH KVASOVK PRI RAZLIČNIH POGOJIH RASTI PO OBSEVANJU Z ULTRAVIJOLIČNO SVETLOBO



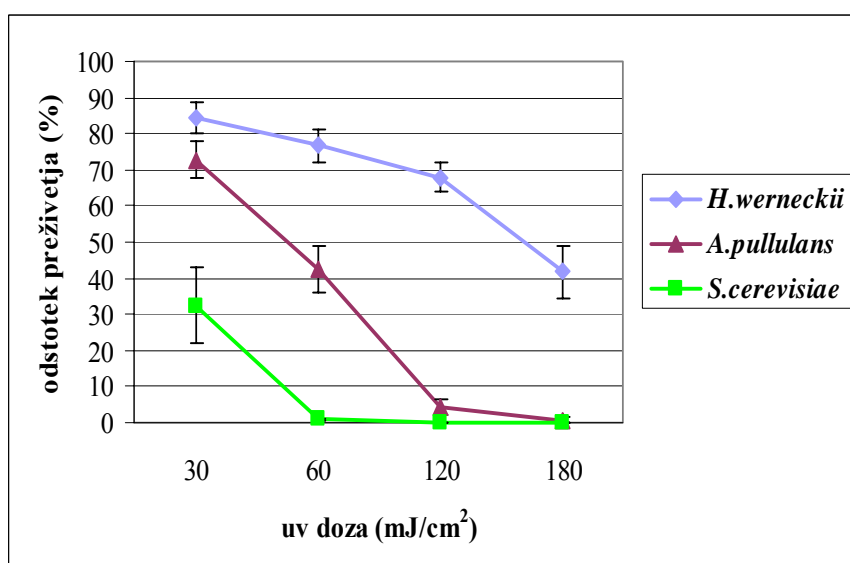
Slika 4: Preživetje *H. werneckii* in *A. pullulans* v primerjavi s *S. cerevisiae* na gojišču YNB v eksponentni fazi rasti.



Slika 5: Preživetje *H. werneckii* in *A. pullulans* v primerjavi s *S. cerevisiae* na gojišču YNB v stacionarni fazi rasti.



Slika 6: Preživetje *H. werneckii* in *A. pullulans* v primerjavi s *S. cerevisiae* na gojiščih YNB z dodanim NaCl (5 % (m/v) za *A. pullulans* in *S. cerevisiae* ter 17 % (m/v) za *H. werneckii*) v eksponentni fazi rasti.



Slika 7: Preživetje *H. werneckii* in *A. pullulans* v primerjavi s *S. cerevisiae* na gojiščih YNB z dodanim NaCl (5 % (m/v) za *A. pullulans* in *S. cerevisiae* ter 17 % (m/v) za *H. werneckii*) v stacionarni fazi rasti.

## 5.5 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Podatke smo analizirali s pomočjo statističnega programa SPSS. Izvedli smo univariatno analizo variance, pri čemer smo kot faktorje vpliva (neodvisne spremenljivke) na preživetje gliv analizirali vrsto glive (Vrsta), uporabljeno dozo sevanja (Doza), slanost gojišča (Slanost) in fazo rasti (Fazarasti) ter kombinacije teh faktorjev. Odvisna spremenljivka je preživetje celic. Vrednost F predstavlja razmerje med medvzorčno in znotrajvzorčno variabilnostjo, df so stopinje prostosti. Pomembne so vrednosti Sig (signifikantnost). Kjer je vrednost manjša od 0,01, rečemo, da je vpliv faktorja značilen, kar trdimo z 1-odstotnim tveganjem.

**Preglednica 1:** Parametri analize variance, izračunani s pomočjo programa SPSS za okolje Windows.

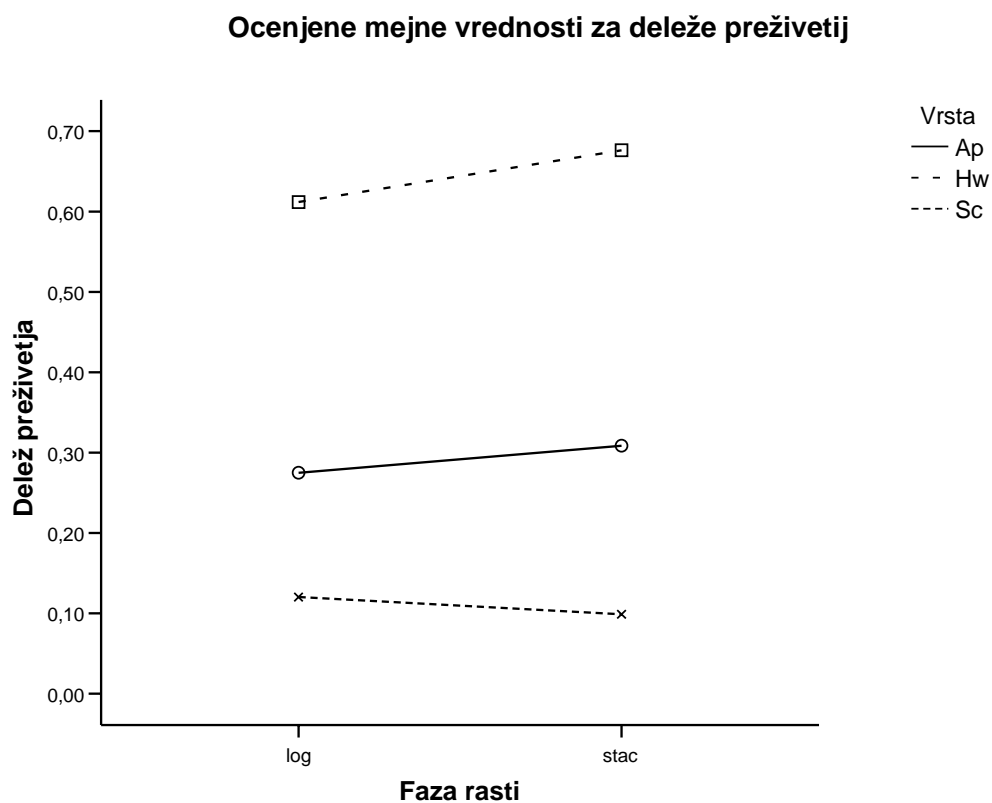
Faktor / kombinacija	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
Corrected Model	23.573(a)	24	.982	345.321	.000	.975
Intercept	29.136	1	29.136	10243.490	.000	.979
<b>Vrsta</b>	11.810	2	5.905	2075.969	<b>.000</b>	.951
<b>Doza</b>	9.554	3	3.185	1119.615	<b>.000</b>	.940
<b>Fazarasti</b>	.039	1	.039	13.753	<b>.000</b>	.060
Slanost	.004	1	.004	1.473	.226	.007
<b>Vrsta * Doza</b>	1.983	6	.331	116.215	<b>.000</b>	.764
<b>Vrsta * Fazarasti</b>	.076	2	.038	13.326	<b>.000</b>	.110
Vrsta * Slanost	.016	2	.008	2.808	.063	.025
Doza * Fazarasti	.010	3	.003	1.167	.323	.016
<b>Doza * Slanost</b>	.071	3	.024	8.307	<b>.000</b>	.104
Fazarasti * Slanost	.011	1	.011	3.709	.055	.017
Error	.612	215	.003			
Total	53.321	240				
Corrected Total	24.185	239				

a R Squared = .975 (Adjusted R Squared = .972)



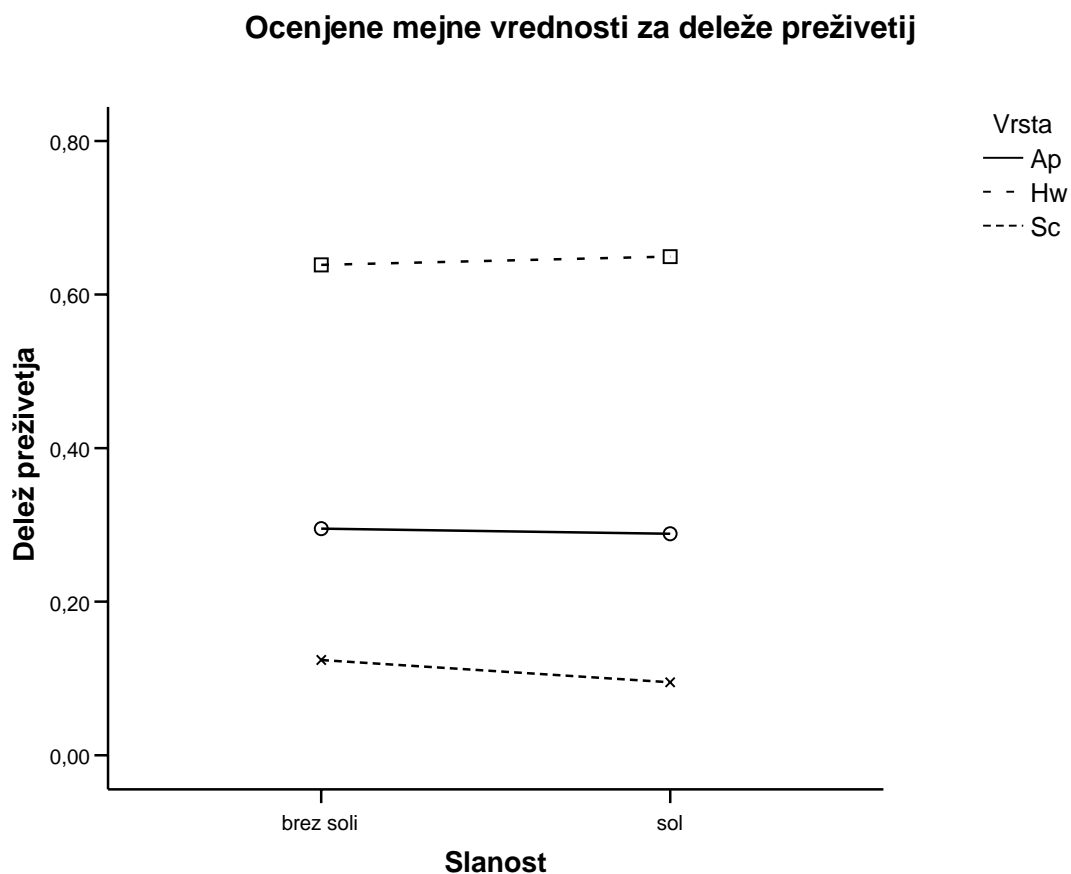
Pokazalo se je, da so značilni vplivi vrste, doze UV sevanja, faze rasti in kombinacij vrste – doze sevanja, vrste – faze rasti ter doze – slanosti.

Na naslednjih slikah so grafično predstavljene ocenjene mejne vrednosti za deleže preživetja v odvisnosti od uporabljenih faktorjev vpliva (neodvisnih spremenljivk) oz. njihovih kombinacij pri preučevanih kvasovkah.



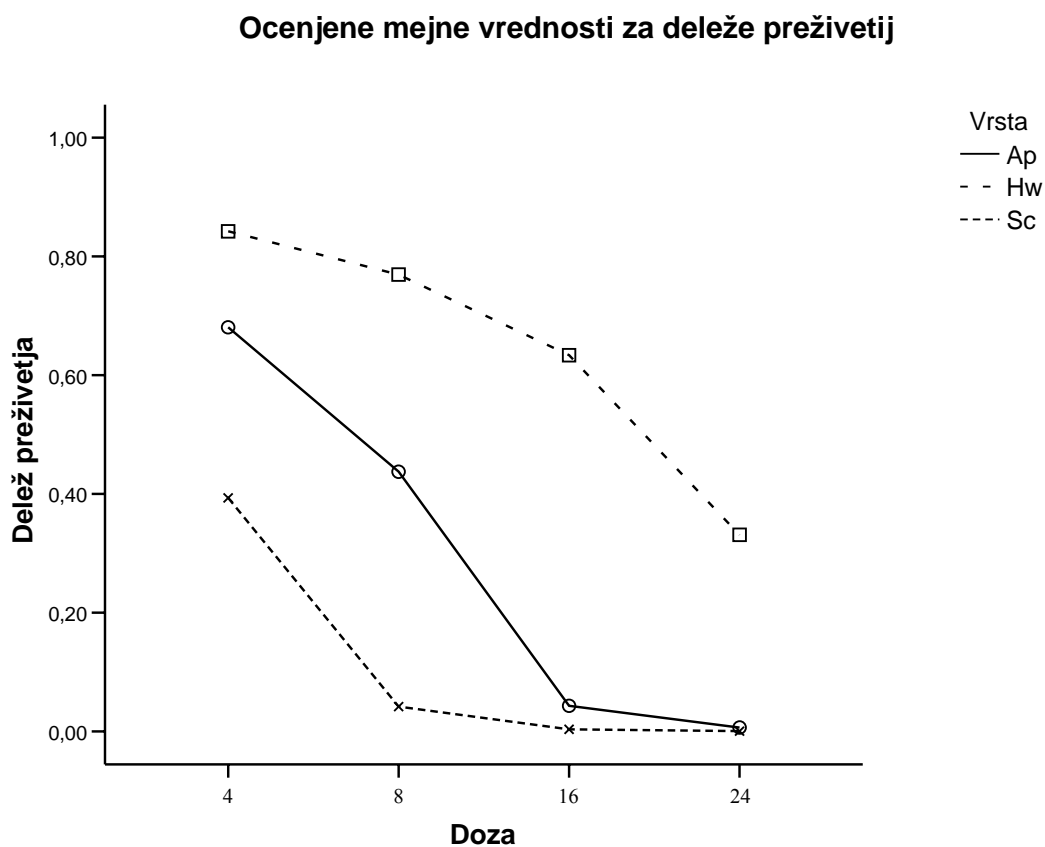
**Slika 8:** Ocenjene mejne vrednosti za delež preživetja vrste v odvisnosti od faze rasti in vrste glive, pridobljene z analizo variance.

Vidimo, da je preživetje *S. cerevisiae* boljše v eksponentni fazi, za črni kvasovki pa v stacionarni fazi.



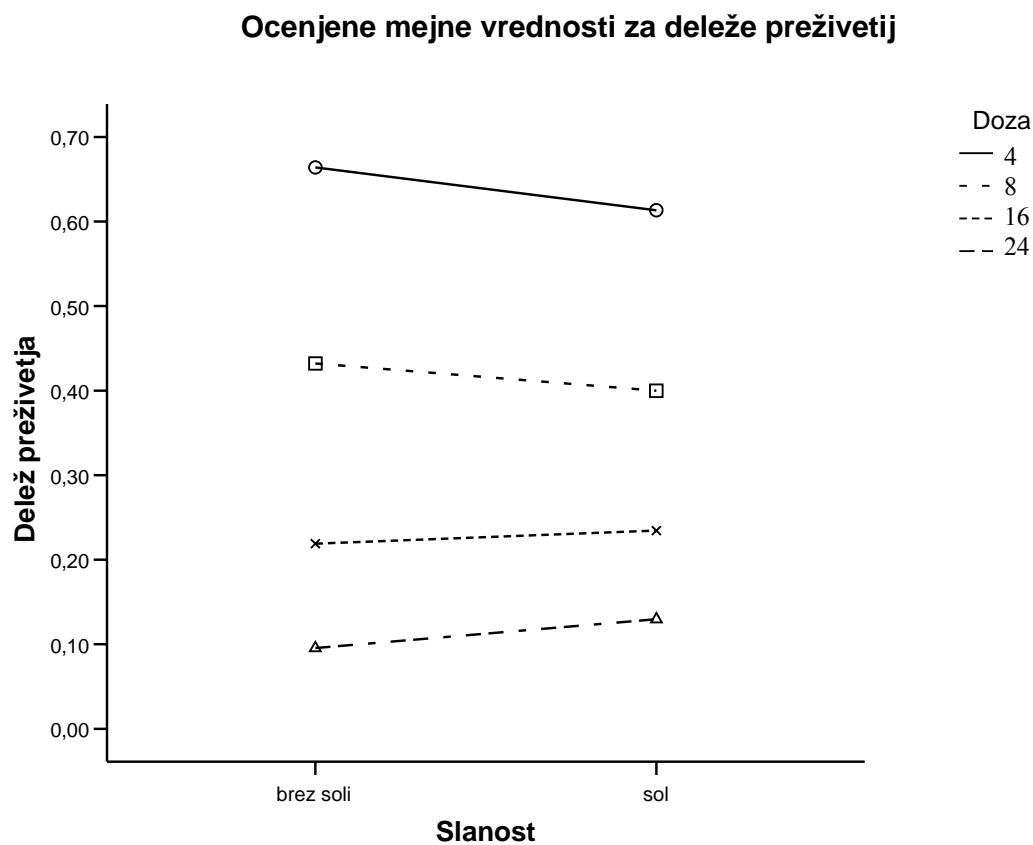
**Slika 9:** Ocenjene mejne vrednosti za delež preživetja vrste v odvisnosti od tipa gojišča (YNB, YNB z dodanim NaCl), dobljene z analizo variance.

Preživetje *H. werneckii* se pri višji slanosti poveča, pri ostalih dveh zmanjša, vendar pa razlike niso značilne.



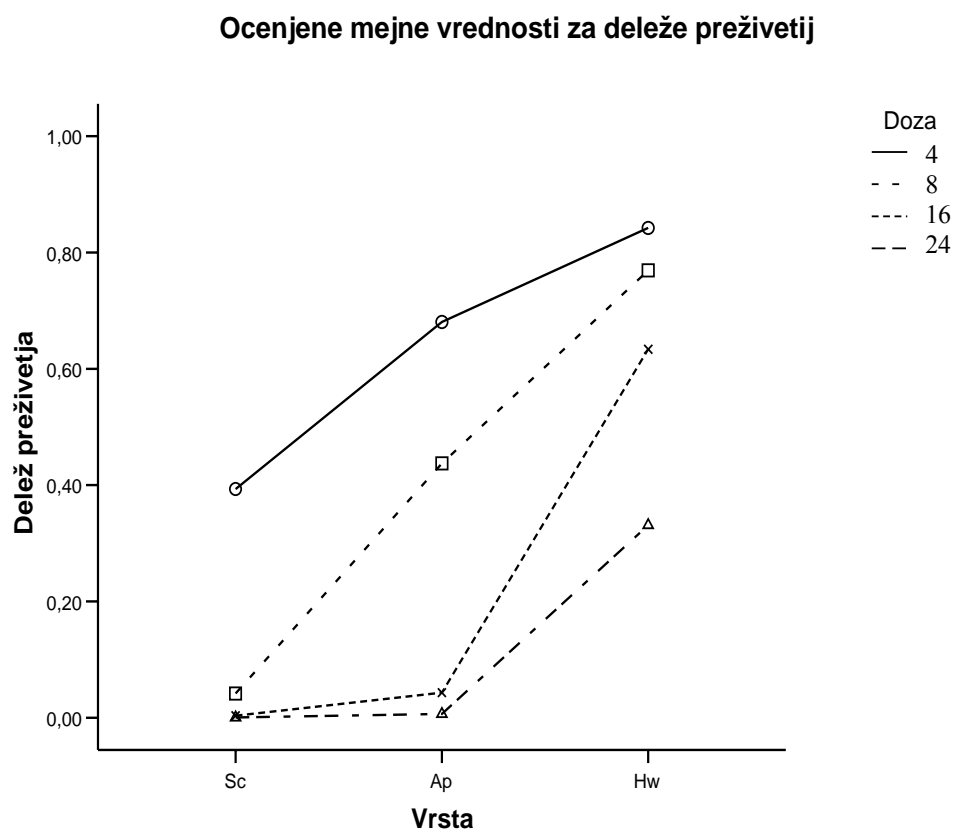
**Slika 10:** Ocenjene mejne vrednosti za delež preživetja vrste v odvisnosti od doze ultravijoličnega sevanja in vrste glive, dobljene z analizo variance. Doze sevanja so podane v (mJ/cm<sup>2</sup>).

*H. werneckii* je najbolj odporna proti UV-sevanju, fungicidne doze nismo v poskusu niti dosegli. *A. pullulans* je bolj odporen kot *S. cerevisiae*, vendar manj kot *H. werneckii*.



**Slika 11:** Ocenjene mejne vrednosti za delež preživetja v odvisnosti od doze ultravijoličnega sevanja in tipa gojišča, pridobljene z analizo variance. Doze sevanja so podane v (mJ/cm<sup>2</sup>).

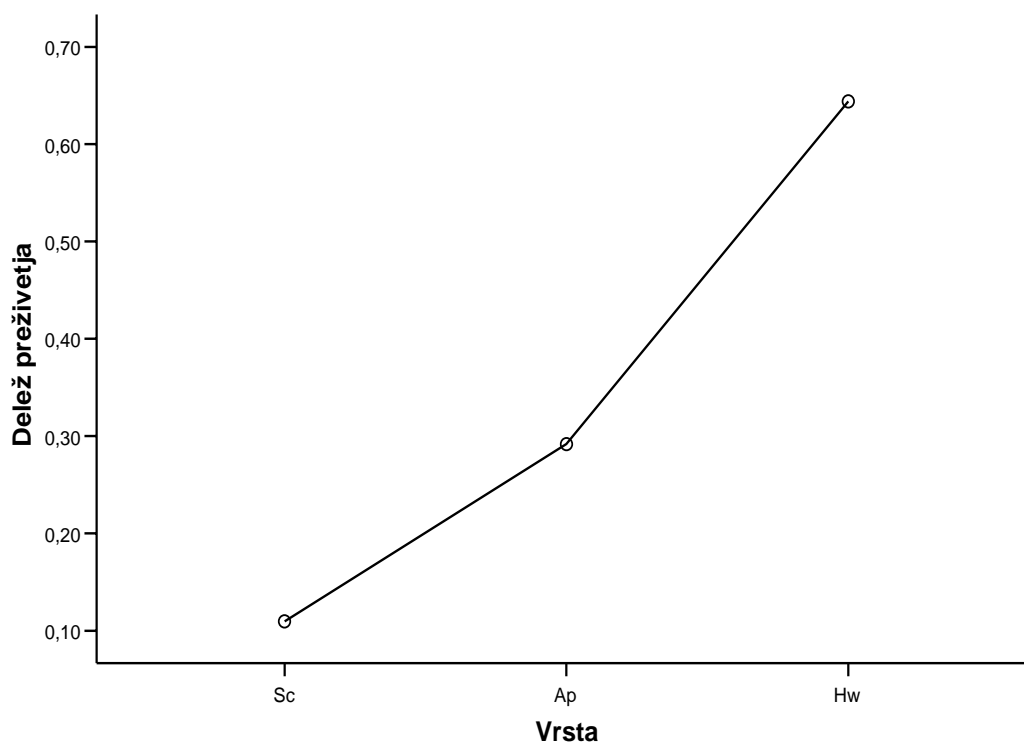
Pri nižjih dozah sevanja se preživetje proučevanih kvasovk na gojišču s soljo zmanjša, pri višjih dozah pa prisotnost soli preživetje poveča.



**Slika 12:** Ocenjene mejne vrednosti za delež preživetja v odvisnosti od doze ultravijoličnega sevanja in vrste glive, dobljene z analizo variance. Doze sevanja so podane v ( $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ).

Dobro so vidne razlike v odpornosti proti UV-sevanju med vrstami proučevanih kvasovk, od *H. werneckii* kot najbolj odporne, prek intermediarne *A. pullulans*, do najbolj občutljive *S. cerevisiae*.

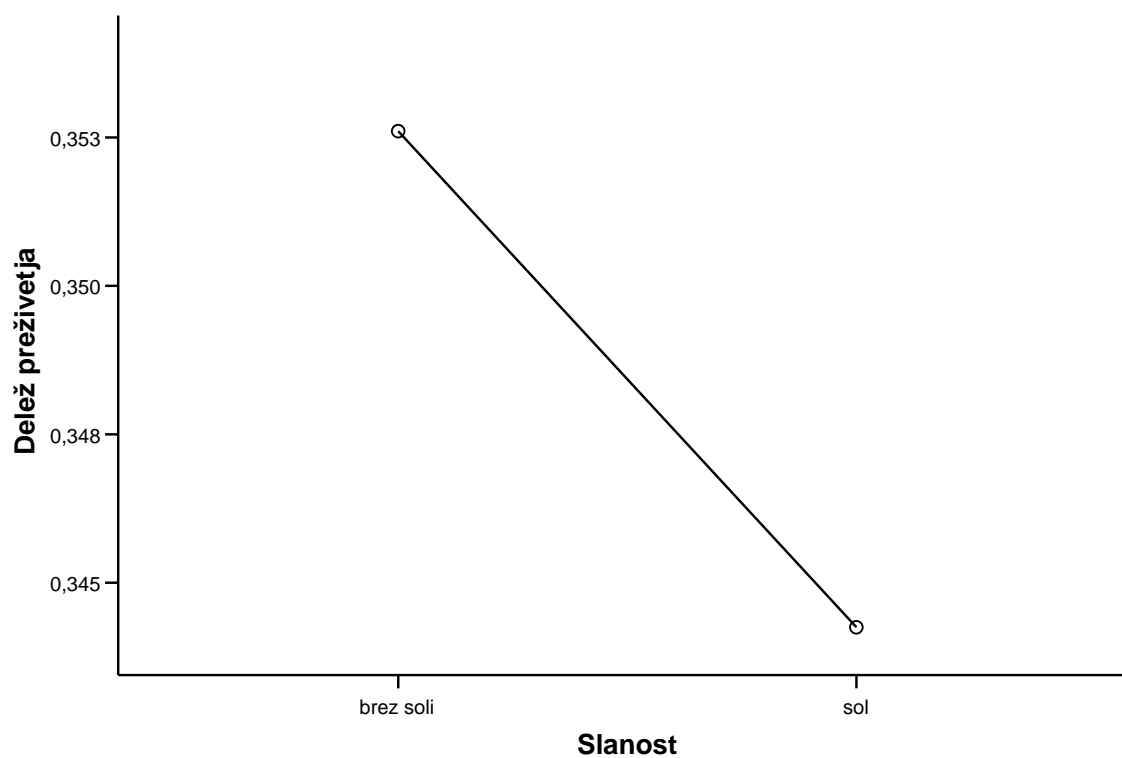
### Ocenjene mejne vrednosti za deleže preživetij



**Slika 13:** Ocenjene mejne vrednosti za delež preživetja v odvisnosti od vrste glive, dobljene z analizo variance. Na grafu ni prikazanih ločenih krivulj za posamezno fazo rasti.

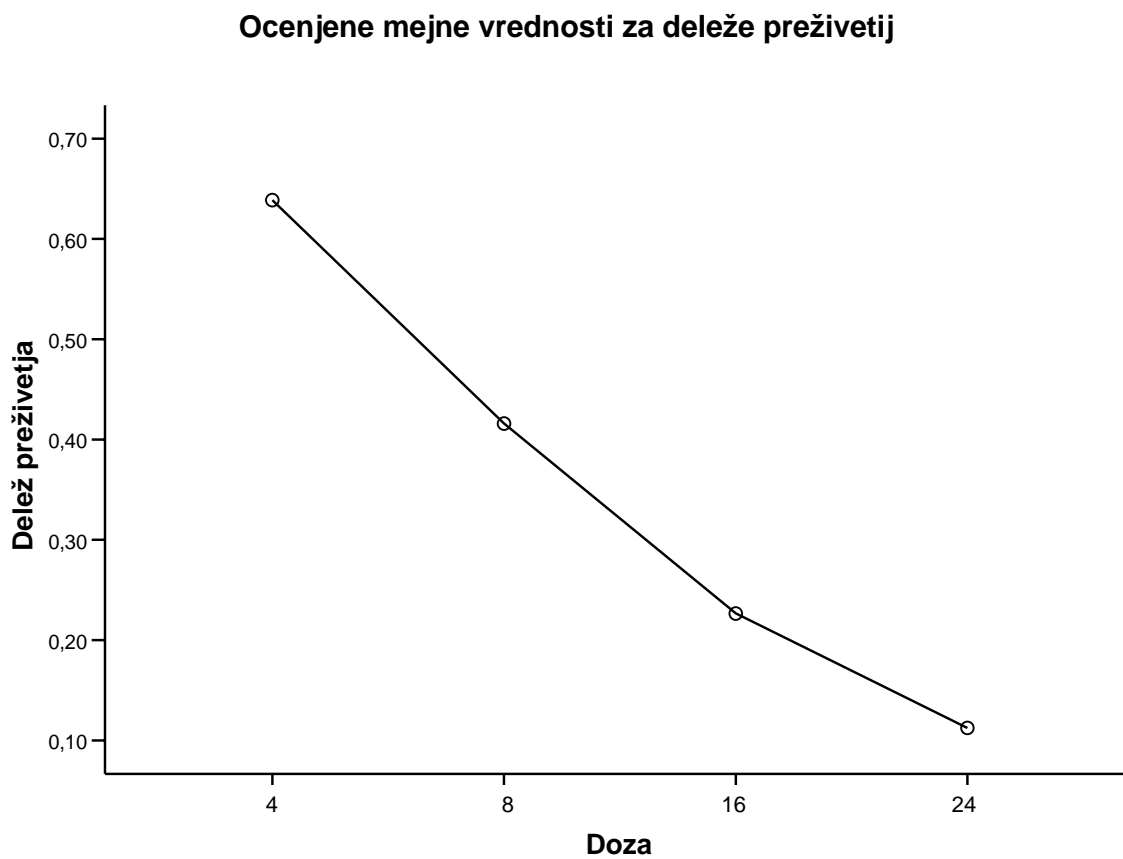
Najbolj odporna na UV-sevanje je *H. werneckii*, najmanj pa *S. cerevisiae*.

### Ocenjene mejne vrednosti za deleže preživetij



**Slika 14:** Ocenjene mejne vrednosti za delež preživetja v odvisnosti od slanosti gojišča, dobljene z analizo variance.

Z višanjem slanosti se preživetje v splošnem zmanjšuje, vendar razlike niso značilne.



**Slika 15:** Ocenjene mejne vrednosti za delež preživetja v odvisnosti od doze UV-sevanja, dobljene z analizo variance.

Preživetje se z višanjem doze sevanja v splošnem zmanjšuje.





**Slika 16:** *H. werneckii* na gojišču YNB s 17 % (m/v) NaCl v eksponentni fazi rasti. Fotografija je bila slikana s svetlobnim mikroskopom pri 1000-kratni povečavi.



**Slika 17:** *A. pullulans* na gojišču YNB s 5 % (m/v) NaCl v stacionarni fazi rasti. Fotografija je bila slikana svetlobnim mikroskopom pri 1000-kratni povečavi.

## 6 RAZPRAVA IN ZAKLJUČKI

### 6.1 RAZPRAVA

Pri mnogih organizmih, vključno z glivami, predstavlja biosinteza melanina nek splošen stresni odgovor na toksične razmere v okolju. Ultravijolično sevanje ali poškodbe DNA sprožijo melanogenezo v živalskih melanocitah ali melanoma celicah, kjer melanin tem celicam nudi zaščito (Henson in sod., 1999).

Ker melaninom pripisujejo zaščitno vlogo pred ionizirajočim sevanjem (Wang in Casadevall, 1994), smo postavili hipotezo o podobni vlogi melanina pri glivah *H. werneckii* in *A. pullulans*. V diplomski nalogi smo poskušali to hipotezo dokazati, namreč da je po obdelavi z UV-sevanjem preživetje melaniziranih celic črnih kvasovk večje v primerjavi s preživetjem nemelanizirane pivske kvasovke *S. cerevisiae*.

Za analizo rezultatov smo izvedli univariatno analizo variance, pri čemer smo kot faktorje vpliva na preživetje UV-sevanja analizirali vrsto glive (Vrsta), uporabljeno dozo sevanja (Doza), slanost gojišča (Slanost) in fazo rasti (Fazarasti). Kot slanost nismo določili treh različnih slanosti (0, 5 in 17 % NaCl (m/v)), ampak le razliko »brez soli« in »sol«. Glive se na slanostni stres odzivajo različno, zato enake koncentracije soli pri različnih vrstah niso primerljive.

V tabeli s parametri analize variance (Tabela 1) je predvsem pomemben stolpec Sig (signifikantnost, značilnost). Kjer je ta vrednost manjša od 0,01, lahko zaključimo, da je vpliv tistega faktorja (faktorjev) značilen, kar trdimo z 1-odstotnim tveganjem.

### 6.1.1 Preživetje glive *Hortaea werneckii* po obsevanju z ultravijolično svetlobo

*H. werneckii* je halofilna črna kvasovka (Zalar, 1999), ki konstitutivno sintetizira DHN-melanin, tudi v pogojih povišane slanosti (Kogej, 2002).

*H. werneckii* je UV-C-sevanje najbolje preživela v stacionarni fazi rasti, neodvisno od slanosti gojišča (Slika 1). Melanizacija *H. werneckii* je odvisna od starosti celic (Kogej, 2002). Melanizacija glive je bila v naših poskusih vidna že v eksponentni fazi (svetlo zelena barva) in je višek dosegla v pozni stacionarni fazi, kjer je bilo tekoče gojišče YNB obarvano temno zeleno do rjavo-zeleno. Na trdnih gojiščih YNB se je zelo stara kultura obarvala črno.

Preživetje *H. werneckii* po obsevanju z UV-svetlobo se pri višji slanosti sicer poveča, vendar razlike niso značilne, ker sta deleža preživetja zelo podobna na gojišču brez soli in pri povišani slanosti (Sliki 1 in 8, Tabela 1). Pri višjih slanostih se pri *H. werneckii* oblikuje sloj melanina iz redkejših melaninskih zrn, ki je na zunanji strani celične stene, včasih kot del ekstracelularnega matriksa (Kogej, 2002). Celice smo poželi v zgodnejši stacionarni fazi v tekočem gojišču YNB (po 5 dneh,  $OD_{600}=3$ ) in YNB z dodanim NaCl (po 7 dneh,  $OD=2,5$ ) (Račnik, 2003), ko melanizacija morda še ni dosegla vrhunca, kar bi lahko razložilo podobnost v deležih preživetja na obeh gojiščih.

*H. werneckii* je najbolj odporna proti UV-sevanju, saj fungicidne doze (90-odstotno uničenje celic) pri uporabljenih dozah UV-sevanja sploh nismo dosegli. Preživetje pri najvišji dozi  $24 \text{ mJ/cm}^2$  je bilo, neodvisno od faze rasti in gojišča, približno 30-odstotno (Slika 1), za razliko od *S. cerevisiae*, kjer že z dozo  $8 \text{ mJ/cm}^2$  dosežemo fungicidni učinek (Slika 3). Tako so tudi pri glivi *Cryptococcus neoformans* ugotovili, da so melanizirane kvasne celice bolj odporne proti fungicidnim učinkom UV-sevanja kot nemelanizirane celice, katerih delež preživetja je upadal s starostjo kulture (Wang in Casadevall, 1994). Rezultati preživetja *C. neoformans* po obsevanju z UV-svetlobo so dokaj primerljivi z rezultati preživetja *H. werneckii* v naši raziskavi; preživetje melanizirane *C. neoformans* v stacionarni fazi rasti po obsevanju z UV-C

(254 nm) je bilo pri dozi sevanja 20 mJ/cm<sup>2</sup> približno 30-odstotno (Wang in Casadevall, 1994). Durrell (1964) je ugotovil, da ustavitev sinteze melanina s heksakloroacetonom poveča uničenje glivnih celic z UV-svetlobo.

### 6.1.2 Preživetje glive *Aureobasidium pullulans* po obsevanju z ultravijolično svetlobo

*A. pullulans* je halotolerantna črna kvasovka (Zalar, 1999). Iz literature je znano, da vrsta *A. pullulans* sintetizira DHN-melanin (Siehr, 1981; Wheeler in Bell, 1988, cit. po Kogej, 2002), vendar sev B-802 v danih pogojih rasti ni počrnel, razen po daljšem času, ko se je kultura postarala in najbrž tvorila hlamidospore, ki so melanizirane. Vegetativna oblika glive je le redko postala rahlo temno obarvana (Kogej, 2002). Te ugotovitve se ujemajo z našimi opazovanji, da v času trajanja posameznega poskusa (največ 6 dni) sev B-802 ni melaniziral, zelo stara kultura se je rahlo rjavo obarvala.

Preživetje *A. pullulans* je tako kot pri *H. werneckii* večje v stacionarni fazi rasti (Slika 2). Pri pogojih povišane slanosti se preživetje *A. pullulans* zmanjša, vendar razlike niso značilne. Za razliko od *H. werneckii* prisotnost NaCl predstavlja morda še vedno tolikšen stres za celice, da je v kombinaciji s UV-stresom ter v odsotnosti sinteze melanina preživetje manjše.

Pri *A. pullulans* dosežemo fungicidni učinek sevanja z dozo 16 mJ/cm<sup>2</sup>, kar je enkrat večja doza, kot jo potrebujemo za enak učinek pri *S. cerevisiae*, vendar manj kot pri *H. werneckii* (Slike 3, 4, 5 in 6). Ni povsem jasno, kje tiči razlog, da *A. pullulans*, čeprav ni sintetiziral melanina, izraža toliko višjo odpornost proti UV-sevanju pri dozi, ki je za *S. cerevisiae* že fungicidna (Slike 10 in 12). Pri najvišji dozah sevanja je preživetje pri obeh vrstah približno enako (Slike 4, 5, 6 in 7). Morda ima *A. pullulans* bolj učinkovite mehanizme popravila poškodb DNA, morda drugačno (debelejšo) celično steno.

### 6.1.3 Preživetje glive *Saccharomyces cerevisiae* po obsevanju z ultravijolično svetlobo

*S. cerevisiae* je bila na UV-sevanje bolj odporna v eksponentni fazi rasti (Slika 3) za razliko od preučevanih črnih kvasovk. Odpornost proti UV-sevanju pri *S. cerevisiae* doseže višek pri celicah starih približno osem generacij (sredina eksponentne faze) in progresivno upada s starostjo celic (Sumner in Avery, 2002).

Tudi za *S. cerevisiae* razlike v preživetju v odsotnosti oziroma prisotnosti soli v gojišču niso značilne (Slika 3), četudi so rezultati ravno nasprotni tistim za *H. werneckii* (Slika 8). To kaže na dejstvo, da vpliv slanosti v splošnem nima vidnejšega učinka na preživetje UV-sevanja (Tabela 1).

V pogojih povišane slanosti in z večanjem doze sevanja se v splošnem preživetje zmanjša (Sliki 14 in 15). Najbolj odporna gliva med preiskovanimi je *H. werneckii* (Slike 10, 12 in 13), kar morda lahko pripisujemo prisotnosti melanina na površini celične stene. *A. pullulans*, sev B-802 pri danih pogojih ni sintetiziral melanina, kar je verjetno razlog za manjšo odpornost proti UV-sevanju kot pri *H. werneckii* (Slika 13). Najmanj odporna je pivska kvasovka *S. cerevisiae* (Slika 13), kar je bil pričakovan rezultat. Zanimiv fenomen smo opazili pri analizi kombinacije vplivov doze sevanja in slanosti gojišča na preživetje; pri nižjih dozah sevanja se preživetje pri pogojih povišane slanosti zmanjša, pri višjih dozah pa slanost gojišča preživetje poveča (Slika 11). Razlage za ta fenomen še nismo odkrili.

Ugotovili smo značilen vpliv (z 1-odstotnim tveganjem) **vrste, doze sevanja in faze rasti (Tabela 1)**. Značilen je bil tudi vpliv nekaterih kombinacij faktorjev. Tako smo ugotovili različen odziv posameznih vrst na določeno dozo sevanja (faktor vrsta-doza), prav tako je imela na preživetje posameznih vrst različen vpliv faza rasti (faktor vrsta-faza rasti). Pri nižjih dozah sevanja se je preživetje na gojiščih s soljo zmanjšalo, medtem ko je bil vpliv soli na preživetje pri višjih dozah sevanja ugoden (faktor doza-slanost).

Vrednosti doz UV-C-sevanja za doseg fungicidnega učinka pri črnih kvasovkah ne moremo učinkovito primerjati z drugimi rezultati, saj podobnih raziskav nismo zasledili. Tudi če bi obstajale, bi bile težko primerljive zaradi težav in različnih tehničnih prijemov pri merjenju UV-doz.

Za pomanjkanje primerljivosti so odgovorne predvsem nihajoče porazdelitve moči znotraj žarnic, neenakomerna geometrija žarčenja in delno senčenje UV-svetlobe. Nezanosljivost pri napovedovanju (računanju) UV-doz predstavljajo razlike v delovanju žarnice ("output"), predvsem pri nizkih intenzitetah. Da zagotovimo pravilne, ponovljive in primerljive rezultate, sta potrebna nenehno nadzorovanje in merjenje intenzitete sevanja med poskusi (Sommer in sod., 1996).

## 6.2 ZAKLJUČKI

- 1) Črna kvasovka *Hortaea werneckii* je med preučevanimi glivami najbolj odporna proti UV-C-sevanju.
- 2) Črni kvasovki *H. werneckii* in *A. pullulans* sta proti UV-C-sevanju najbolj odporni v stacionarni fazi rasti.
- 3) Halotolerantna *A. pullulans* pri danih pogojih nima melaniziranih struktur, ki jih je moč opaziti pri halofilni *H. werneckii*.
- 4) Fungicidne doze za *H. werneckii* v poskusih nismo dosegli, preživela je  $24 \text{ mJ/cm}^2$ , pri *A. pullulans* dosežemo fungicidni učinek z dozo  $16 \text{ mJ/cm}^2$ , nemelanizirano *S. cerevisiae* uničimo že z  $8 \text{ mJ/cm}^2$ .
- 5) Na preživetje UV-sevanja imajo značilen vpliv vrsta glive, faza rasti in doza sevanja.

## 7 POVZETEK

Halofilne in halotolerantne črne kvasovke, izolirane leta 1997 iz slane vode v kristalizacijskem bazenu Sečoveljskih solin, sodijo v red askomicetnih gliv *Dothideales*. Črne kvasovke so melanizirane glive, ki vsaj del svojega življenjskega kroga preživijo v kvasni, torej brsteči obliki. Počasna rast večine vrst in slaba kompetitivna sposobnost sta razlog, zaradi katerega je bilo znanje o črnih kvasovkah dolgo časa pomanjkljivo. Za vse iz solin izolirane črne kvasovke so značilne debele, melanizirane celične stene in počasna, najpogosteje meristematska rast. Večina se jih razmnožuje z endokonidiacijo.

Soline veljajo za ekstremno okolje, kjer vladajo posebni okoljski faktorji, kot so visoka koncentracija v vodi raztopljenih soli, nizka koncentracija kisika, občasno visoke količine hranil, nevtralen pH in zelo visoko ultravijolično sevanje. Učinki UV-sevanja na biološke sisteme kažejo močno odvisnost od valovnih dolžin. UV-sevanje ima škodljive učinke na vse žive organizme, segajoč od prokariotov do različnih evkariotov; gliv, nižjih in višjih rastlin, živali in ljudi. Ultravijolična svetloba je visokoenergetska in biološke makromolekule (proteini, nukleinske kisline, lipidi) jo učinkovito absorbirajo, zato je za mikroorganizme najbolj nevarna komponenta sončnega sevanja.

Melanin ima pri mikroorganizmih različne vloge. Znana je njegova zaščitna vloga pred fizikalnimi (UV-sevanje, izsuševanje, prosti kisikovi radikali) in biološkimi stresnimi dejavniki okolja (litični encimi). Ker melaninom pripisujejo zaščito pred ionizirajočim sevanjem, smo postavili hipotezo o podobni vlogi v *H. werneckii* in *A. pullulans*, in v tej diplomski nalogi preizkušali to hipotezo z določanjem preživetja melaniziranih celic črnih kvasovk v primerjavi s preživetjem nemelanizirane pivske kvasovke *S. cerevisiae*. Ker imajo črne kvasovke pri povišani slanosti strnjeno melaninsko plast v zunanji plasti celične stene, smo pričakovali, da bosta *H. werneckii* in *A. pullulans* v večji meri odporne na UV-sevanje, še posebej v stacionarni fazi rasti.



Pri halofilni črni kvasovki *H. werneckii* in halotolerantni *A. pullulans* smo želeli ugotoviti, kolikšno dozo fungicidnega UV-C-sevanja preživita, katera od preiskovanih črnih kvasovk je bolj odporna proti sevanju UV-C v primerjavi z nemelanizirano pivsko kvasovko *S. cerevisiae* ter ugotoviti, v kateri fazi rasti so črne kvasovke najbolj odporne proti UV-C-sevanju.

Za vsako glivo smo izvedli 5 samostojnih poskusov, ki so potekali v eksponentni in stacionarni fazi rasti, na gojišču YNB in YNB z dodanim NaCl, z različnimi dozami sevanja in vsakič v treh ponovitvah kontrolnih in obsevanih plošč. Stopnjo preživetja smo določili s primerjavo števila kolonij (CFU), zraslih na kontrolnih in obsevanih ploščah. Podatke smo statistično obdelali z analizo povprečja in analizo variance (ANOVA) ter rezultate prikazali v krivuljah preživetja. Za primerjavo nam je služila nemelanizirana pivska kvasovka *S. cerevisiae*.

Ugotovili smo značilen vpliv (z 1-odstotnim tveganjem) **vrste**, **doze sevanja** in **faze rasti**. Značilen je bil tudi vpliv nekaterih kombinacij faktorjev. Tako smo ugotovili različen odziv posameznih vrst na določeno dozo sevanja, prav tako je imela na preživetje posameznih vrst različen vpliv faza rasti. *H. werneckii* je UV-C-sevanje preživela najbolje v stacionarni fazi rasti neodvisno od slanosti gojišča. *H. werneckii* je najbolj odporna proti UV-sevanju, saj fungicidne doze (90 % uničenje) v poskusih sploh nismo dosegli. *A. pullulans*, sev B-802 pri danih pogojih tekom poskusov ni sintetiziral melanina, kar je verjetno razlog za manjšo odpornost proti UV-sevanju kot pri *H. werneckii*. Najmanj odporna je pivska kvasovka *S. cerevisiae*, kar je bil pričakovani rezultat.

## 8 VIRI

Arrage A.A., Phelps T.J., Benoit R.E., White D.C., 1993. Survival of subsurface microorganisms exposed to UV radiation and hydrogen peroxide. *Applied and Environmental microbiology* 59 (11): 3545-3550

Bell A.A., Wheeler M. H., 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Reviews of Phytopathology*. 24: 411-451

Blois M. S., 1978. The melanins: their synthesis and structure. *Photochem. Photobiol. Rev.* 3: 115-134.

Bloomfield B. J., Alexander M., 1966. Melanins and resistance of fungi to lysis. *Journal of bacteriology*, 93 (4): 1276-1280

Brock, 1997. Microbial growth, ch. 5. In: *Biology of microorganisms*, Eighth edition. Prentice-Hall, Inc., str. 149-177

Bryan B. A., Knapp G. S., Bowen L. M., Polymenis M., 2004. The UV response in *Saccharomyces cerevisiae* involves the mitogen-activated protein kinase Slt2p. *Current microbiology*, 49: 32-34

Butler M.J., Day A. W., 1998. Fungal melanins: a review. *Can. J. Microbiol.*, 44: 1115-1136.

Cockell C. S., Knowland J., 1999. Ultraviolet radiation screening compounds. *Biol. Rev.* 74: 311-345.

Diffey. B. L., 1990. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Physics in medicine and biology* 36 (3): 299-328

Durrel L. W., 1964. The composition and structure of walls of dark fungus spores. *Mycopathologia* 23 (4): 339-345

Ensminger P.A., 1993. Control of development in plants and fungi by far-UV. *Physiologia Plantarum* 88 (3):501

Fogarty R. V., Tobin J. M., 1996. Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme and Microbial technology* 19:311-317.

Griffin D. H., 1994. *Fungal physiology*, 2nd edition. Wiley Science Paperback Series: 102-115

Gunde-Cimerman N., Zalar P., Hoog S. de, Plemenitaš A., 2000. Hypersaline waters in salterns- natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology*, 32 (3): 235-240

Haase G., Sonntag L., Melze-Krick B., Hoog S. de, 1999. Phylogenetic interference by SSU-gene analysis of members of the Herpotrichelaceae with special reference to human pathogenic species. *Studies in mycology*, 43: 80-97.

Henson J. M., Butler M. J., Day A.W., 1999. The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 37: 447-471.

Hermanides-Nijhof E. J., 1977. *Aureobasidium* and allied genera. *Stud. Mycology* 15: 141-177.

Hoog G.S. de, 1993. Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. *Antonie van Leeuwenhoek* 63: 105-109

Hoog S. de, Beguin H., Batenburg –van de Vegte W. H., 1997. *Phaeotheca triangularis*, a new meristematic black yeast from a humidifier. *Antonie van Leeuwenhoek* 71: 289-295.

Hoog S. de, Gerrits van den Ende A. H. G., 1992. Nutritional pattern and ecophysiology of *Hortaea werneckii*, agent of human tinea nigra. *Antonie van Leeuwenhoek* 62: 321-329.

Hoog S. de, Hermanides-Nijhof E. J., 1977. The black yeasts and allied Hyphomycetes. *Studies in mycology* 15: 222 str.

Hoog S. de, McGinnis M.R., 1987. Ascomycetous black yeasts. In: *The expanding realm of yeast-like fungi*, eds. de Hoog, Smith, Weijman. CBS, Baarn, str. 188-199

Hoog S. de, Zalar P., Urzi C., Yurlova N.A., Sterflinger K., 1999. Relationships of dothideaceous black yeasts and meristematic fungi based on 5.8S and ITS2 rDNA sequence comparison. *Studies in mycology*, 43: 31-37

Hughes K.A., Lawley B., Newsham K.K., 2003. Solar UV-B radiation inhibits the growth of antarctic terrestrial fungi. *Applied and environmental microbiology*, 69 (3): 1488-1491

Jacobson E. S., 2000. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clinical microbiology reviews*, 13 (4): 708-717

Kawamura C., Tsujimoto T., Tsuge T., 1999. Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *MPMI* 12 (1): 59-63

Kocuvan A., 2002. Ekofiziologija črnih kvasovk Dothideales iz solin. Diplomsko delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 93 str.

Kogej T., 2002. Vpliv slanosti na melanizacijo iz solin izoliranih črnih kvasovk. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 124 str.

Kogej T., Wheeler M. H., Rižner T. L., Gunde-Cimerman N., 2004. Evidence for 1,8-dihydroxynaphthalene melanin in three halophilic black yeasts grown under saline and non-saline conditions. *FEMS microbiology letters* 232: 203-209.

Leathers, 2003. Biotechnological production and applications of pullulan. *Appl Microbiol Biotechnol* 62:468-473

Mittag H., 1993. The fine structure of *Hortaea werneckii*. *Mycoses* 36: 343-350

Nicholson W. L., Schueger A. C., Setlow P., 2005. The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight. *Mutation research* 571: 249-264

Nosanchuk J. D., Casadevall A., 2003. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular microbiology* 5 (4): 203-223.

Qiu J., Guan M., Bailis A. M., Shen B., 1998. *Saccharomyces cerevisiae* exonuclease-1 plays a role in UV resistance that is distinct from nucleotide excision repair. *Nucleic acids research*, 26 (13): 3077-3083.

Račnik T., 2003. Primerjava metabolizma halofilne glive *Hortaea werneckii* in halotolerantne *Aureobasidium pullulans* pri različnih slanostih. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.

Siehr D. J., 1981. Melanin biosynthesis in *Aureobasidium pullulans*. *J. Coat. Technol.* 53: 23-25

Sinha R.P., Häder D.-P., 2002. UV-induced damage and repair: a review. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 1: 225-236

Sommer R., Haider T., Cabaj A., Heidenreich E., Kundi M., 1996. Increased inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by protraction of UV irradiation. *Applied and environmental microbiology*, 62 (6): 1977-1983

Sterflinger K., 1998. Temperature and NaCl-tolerance of rock-inhabiting meristematic fungi. *Antonie van Leeuwenhoek* 74: 271-281.

Sterflinger K., Hoog S. de, Haase G., 1999. Phylogeny and ecology of meristematic ascomycetes. *Studies in mycology*, 43: 5-22

Sumner E. R., Avery S. V., 2002. Phenotypic heterogeneity: differential stress resistance among individual cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 148: 345-351

Tsimako M., Guffogg S., Thomas-Hall S., Watson K., 2002. Resistance to UVB radiation in Antarctic yeasts. *Redox report*, 7 (5): 312-314

Turkovskii I.I., Yurlova N. A., 2002. The photochemical and surface-active properties of melanins isolated from some black fungi. *Microbiology* 71 (4): 410-416

Wang Y., Aisen P., Casadevall A., 1996. Melanin, melanin "ghosts" and melanin composition in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 64 (7): 2420-2424

Wang Y., Casadevall A., 1994. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Applied and environmental microbiology* 60 (10): 3864-3866

Yurlova N.A., Hoog G. S. de, 1997. A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. *Antonie van Leeuwenhoek* 00: 1-7.

Yurlova N.A., Hoog G. S. de, Gerrits van den Ende A. H. G., 1999. Taxonomy of *Aureobasidium pullulans* and allied genera. *Studies in mycology*, 43: 63-69

Zalar P., Hoog G. S. de, Gunde-Cimerman N., 1999. Ecology of halotolerant dothideaceous black yeasts. *Studies in mycology*, 43: 38-48

Zalar P., 1999. Halofilne črne kvasovke v vodah solin. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 96 str.

Zhdanova N.N., Pokhodenko V. D., 1973. The possible participation of a melanin pigment in the protection of the fungus cell from dessication.

Žagar Z., 1985. Solinarstvo v Sloveniji. *Proteus* 48: 90-92

## **ZAHVALA**

To stran posvečam mami, sestri in fantu.

Hvala za neizčrpno podporo, razumevanje in potrpljenje.



## Priloga A

Preglednica z rezultati obsevanja za *H. werneckii* na gojišču YNB v eksponentni in stacionarni fazi rasti. Prikazani so rezultati štetja celic na ploščah (CFU).

1.k	1.t	2.k	2.t	3.k	3.t	4.k	4.t	5.k	5.t	Doza	
153	122	148	127	114	88	0	0	166	115		<b>E K S P O N E N T N A</b>
127	114	148	112	103	93	235	198	133	143	<b>4</b>	
132	112	124	101	0	0	261	221	142	128		
113	88	133	94	0	0	0	0	128	102		<b>S T A C I O N A R N A</b>
133	102	127	100	105	85	276	202	120	110	<b>8</b>	
0	0	156	119	99	73	298	239	117	86		
105	79	94	68	112	63	165	109	111	59		<b>16</b>
134	69	139	61	106	46	139	104	132	69		
125	73	111	84	163	94	151	98	108	72		
206	31	0	0	107	30	254	36	155	35		<b>24</b>
129	15	143	43	122	21	0	0	119	10		
118	13	121	21	101	16	232	45	151	29		
0	0	120	109	125	111	137	113	115	99		<b>4</b>
108	92	114	116	102	95	179	154	121	107		
100	91	116	104	114	107	186	164	107	98		
97	61	118	94	135	106	146	124	124	86		<b>8</b>
108	76	133	123	101	92	144	132	120	102		
101	102	122	112	120	90	146	100	116	92		
136	104	138	61	94	61	217	152	139	89		<b>16</b>
142	94	162	52	98	59	247	143	119	90		
119	53	124	109	106	75	260	137	116	76		
134	33	124	37	114	54	158	43	119	52		<b>24</b>
117	40	135	41	112	15	190	68	117	51		
106	38	137	72	82	61	0	0	137	43		

k...kontrola

t...obsevane celice

## Priloga B

Preglednica z rezultati obsevanja glive *H. werneckii* na gojišču YNB s 17 % NaCl v eksponentni in stacionarni fazi rasti. Prikazani so rezultati štetja celic na ploščah (CFU).

1.k	1.t	2.k	2.t	3.k	3.t	4.k	4.t	5.k	5.t	Doza	
250	201	217	145	156	127	129	109	312	265	4	E K S P O N E N T N A
267	213	254	200	194	133	127	97	287	235		
217	166	203	165	0	0	121	101	0	0		
242	158	266	173	171	113	158	69	321	246	8	
255	177	223	196	175	143	124	84	302	228		
180	161	232	169	0	0	158	120	0	0		
193	131	207	115	101	66	101	73	312	216	16	
216	146	220	152	127	64	151	77	331	218		
273	181	198	153	0	0	144	82	0	0		
164	87	132	56	250	123	168	51	106	37	24	
252	71	163	31	215	90	162	44	96	30		
207	42	143	78	203	87	233	78	93	16		
255	214	239	126	211	187	202	165	111	94	4	S T A C I O N A R N A
214	197	231	213	206	177	213	172	96	70		
212	189	196	204	0	0	200	180	124	102		
260	184	225	173	196	132	229	158	0	0	8	
240	137	214	146	162	154	198	142	102	77		
231	195	166	162	0	0	204	184	103	80		
222	155	236	141	168	108	236	164	107	82	16	
188	112	228	154	262	167	199	133	104	75		
219	151	226	176	0	0	168	115	113	78		
180	75	217	94	232	93	230	79	237	114	24	
206	98	206	114	203	102	165	30	255	109		
198	71	215	52	193	106	209	88	0	0		

k...kontrola

t...obsevane celic

## Priloga C

Preglednica z rezultati obsevanja za *A. pullulans* na gojišču YNB v eksponentni in stacionarni fazi rasti. Prikazani so rezultati štetja celic na ploščah (CFU).

1.k	1.t	2.k	2.t	3.k	3.t	4.k	4.t	5.k	5.t	Doza	
292	233	109	70	267	245	137	87	127	90	4	E K S P O N E N T N A
330	195	99	66	344	208	156	92	142	74		
0	0	0	0	315	201	132	90	113	83		
356	68	104	35	309	118	128	41	117	52	8	S P O N E N T N A
298	109	103	32	290	139	103	28	125	37		
282	91	97	28	301	143	117	39	137	44		
310	12	103	3	298	35	131	7	162	4	16	E N T N A
296	6	128	2	320	20	119	3	145	5		
329	8	90	4	303	15	129	11	133	5		
298	3	110	2	393	4	134	1	156	3	24	T N A
303	1	96	2	0	0	142	2	162	0		
310	1	100	0	270	1	120	0	134	2		
303	293	298	207	0	0	154	92	112	103	4	S T A C I O N A R N A
325	204	292	167	287	210	130	101	143	87		
327	214	0	0	301	223	127	108	125	95		
317	140	223	133	317	144	134	77	153	78	8	A C I O N A R N A
234	152	302	164	228	123	131	69	144	80		
309	187	299	154	337	178	128	76	149	82		
326	5	274	30	273	1	113	2	133	1	16	O N A R N A
0	0	267	7	267	7	116	9	126	6		
305	9	246	11	319	17	121	4	139	5		
342	0	307	1	305	0	132	1	112	0	24	R N A
352	0	232	1	292	1	122	1	130	1		
319	0	216	2	332	0	137	0	125	0		

k....kontrola

t...obsevane celice

## Priloga D

Preglednica z rezultati obsevanja za *A. pullulans* na gojišču YNB s 5 % NaCl v eksponentni in stacionarni fazi rasti. Prikazani so rezultati štetja celic na ploščah (CFU).

1.k	1.t	2.k	2.t	3.k	3.t	4.k	4.t	5.k	5.t	Doza	
224	145	285	176	317	187	291	201	298	117	4	E K S P O N E N T N A
242	184	265	192	221	120	267	120	303	238		
271	127	246	186	0	0	0	0	0	0		
252	177	249	103	242	98	243	127	303	128	8	E K S P O N E N T N A
267	115	0	0	213	107	221	130	283	107		
234	102	271	132	215	92	0	0	0	0		
286	15	281	8	256	16	267	6	269	10	16	E K S P O N E N T N A
225	12	301	16	234	7	273	17	288	15		
0	0	0	0	215	11	269	12	256	21		
238	2	232	0	204	1	310	7	237	2	24	E K S P O N E N T N A
283	2	219	3	233	0	312	2	234	0		
0	0	0	0	187	2	279	1	0	0		
242	135	189	117	117	102	114	81	134	85	4	S T A C I O N A R N A
213	189	209	142	153	87	100	99	127	91		
208	185	219	151	118	96	123	75	125	98		
213	111	226	121	136	44	166	27	118	38	8	S T A C I O N A R N A
227	73	228	102	117	54	180	29	129	47		
205	132	258	100	166	52	150	75	121	58		
223	14	190	20	162	6	119	2	135	8	16	S T A C I O N A R N A
218	17	251	16	174	1	171	4	147	11		
206	8	225	0	239	4	166	6	130	3		
244	1	136	3	201	0	118	2	141	0	24	S T A C I O N A R N A
175	0	174	7	236	0	136	0	125	3		
0	0	226	0	185	0	145	0	145	0		

k...kontrola

t...obsevane celice

## Priloga E

Preglednica z rezultati obsevanja za *S. cerevisiae* na gojišču YNB v eksponentni in stacionarni fazi rasti. Prikazani so rezultati štetja celic na ploščah (CFU).

1.k	1.t	2.k	2.t	3.k	3.t	4.k	4.t	5.k	5.t	Doza	
120	81	117	61	225	53	270	65	182	52	4	E K S P O N E N T N A
193	87	135	125	229	81	0	0	210	73		
174	83	182	76	247	186	260	150	178	38		
160	14	133	6	229	0	235	1	213	17	8	E K S P O N E N T N A
128	5	137	7	243	4	291	15	206	8		
135	16	146	44	225	30	0	0	197	13		
156	0	123	1	260	1	215	2	207	1	16	E K S P O N E N T N A
121	6	138	1	239	0	259	0	210	0		
146	2	152	4	228	2	256	0	201	2		
160	0	143	0	238	0	244	0	199	0	24	E K S P O N E N T N A
157	0	120	0	236	0	319	0	192	0		
149	1	156	0	231	0	278	0	208	0		
108	29	103	35	221	53	252	42	127	59	4	S T A C I O N A R N A
112	41	130	56	229	81	271	108	119	89		
106	36	96	66	247	186	253	50	148	55		
154	2	107	1	234	3	235	17	150	10	8	S T A C I O N A R N A
105	5	114	5	251	1	247	7	121	4		
105	7	111	16	249	4	243	2	147	21		
121	0	95	0	212	0	273	0	197	0	16	S T A C I O N A R N A
111	0	92	5	227	0	267	0	160	0		
103	0	111	0	225	0	221	0	163	0		
100	0	120	0	267	0	262	2	174	0	24	S T A C I O N A R N A
123	0	115	0	247	0	234	0	162	0		
101	0	92	0	214	0	238	0	144	0		

k...kontrola

t...obsevane celice

## Priloga F

Preglednica z rezultati obsevanja za *S. cerevisiae* na gojišču YNB s 5 % NaCl v eksponentni in stacionarni fazi rasti. Prikazani so rezultati štetja celic na ploščah (CFU).

<b>1.k</b>	<b>1.t</b>	<b>2.k</b>	<b>2.t</b>	<b>3.k</b>	<b>3.t</b>	<b>4.k</b>	<b>4.t</b>	<b>5.k</b>	<b>5.t</b>	<b>Doza</b>
172	61	154	81	290	46	167	76	138	47	<b>4</b>
164	75	196	73	205	83	154	49	124	61	
163	85	175	66	0	0	157	71	135	54	
151	2	175	17	226	6	161	5	133	3	<b>8</b>
147	8	183	3	233	2	149	4	152	5	
130	9	195	15	0	0	151	7	161	6	
125	0	196	0	248	0	155	1	117	0	<b>16</b>
162	0	182	0	200	0	124	0	134	0	
116	1	195	0	0	0	148	0	126	0	
147	0	166	0	204	0	173	0	151	0	<b>24</b>
152	0	174	0	230	0	152	0	134	0	
145	0	186	0	166	0	168	0	137	0	
138	31	101	37	135	90	123	51	115	63	<b>4</b>
135	32	144	24	153	32	141	45	142	34	
165	38	0	0	0	0	133	33	128	54	
94	0	128	3	156	0	102	1	134	3	<b>8</b>
145	1	133	0	138	2	115	0	126	1	
94	0	101	1	117	1	116	1	119	2	
101	0	125	0	123	0	146	0	116	0	<b>16</b>
98	0	154	0	143	0	137	0	110	0	
169	0	0	0	0	0	134	0	128	0	
117	0	91	0	108	0	123	0	114	0	<b>24</b>
131	0	124	0	112	0	141	0	126	0	
129	0	0	0	115	0	133	0	109	0	

## Priloga G

Preglednica z izračunanimi deleži preživetja za *H. werneckii* na gojišču YNB s 17 % NaCl. Prikazani so vsi parametri, uporabljeni pri statistični obdelavi podatkov (analiza variance) s pomočjo statističnega programa SPSS.

Vrsta	Doza	Faza rasti	Slanost	Delez preživetja
Hw	4	log	17%	0,790190736
Hw	4	log	17%	0,756676558
Hw	4	log	17%	0,742857143
Hw	4	log	17%	0,814323607
Hw	4	log	17%	0,834724541
Hw	8	log	17%	0,732644018
Hw	8	log	17%	0,746185853
Hw	8	log	17%	0,739884393
Hw	8	log	17%	0,620454545
Hw	8	log	17%	0,760834671
Hw	16	log	17%	0,671554252
Hw	16	log	17%	0,672
Hw	16	log	17%	0,570175439
Hw	16	log	17%	0,585858586
Hw	16	log	17%	0,67496112
Hw	16	log	17%	0,321027287
Hw	24	log	17%	0,376712329
Hw	24	log	17%	0,449101796
Hw	24	log	17%	0,307282416
Hw	24	log	17%	0,281355932
Hw	4	stac	17%	0,881057269
Hw	4	stac	17%	0,815315315
Hw	4	stac	17%	0,872901679
Hw	4	stac	17%	0,840650407
Hw	4	stac	17%	0,803625378
Hw	8	stac	17%	0,705882353
Hw	8	stac	17%	0,795041322
Hw	8	stac	17%	0,798882682
Hw	8	stac	17%	0,76703645
Hw	8	stac	17%	0,765853659
Hw	16	stac	17%	0,6645469
Hw	16	stac	17%	0,682608696
Hw	16	stac	17%	0,639534884
Hw	16	stac	17%	0,683250415
Hw	16	stac	17%	0,725308642
Hw	16	stac	17%	0,417808219
Hw	24	stac	17%	0,407523511
Hw	24	stac	17%	0,479299363
Hw	24	stac	17%	0,32615894
Hw	24	stac	17%	0,453252033

## Priloga H

Preglednica z izračunanimi deleži preživetja za *H. werneckii* na gojišču YNB. Prikazani so vsi parametri, uporabljeni pri statistični obdelavi podatkov (analiza variance) s pomočjo statističnega programa SPSS.

Vrsta	Doza	Faza rasti	Slanost	Delez preživetja
Hw	4	log	0%	0,844660194
Hw	4	log	0%	0,80952381
Hw	4	log	0%	0,834101382
Hw	4	log	0%	0,844758065
Hw	4	log	0%	0,875283447
Hw	8	log	0%	0,772357724
Hw	8	log	0%	0,752403846
Hw	8	log	0%	0,774509804
Hw	8	log	0%	0,768292683
Hw	8	log	0%	0,816438356
Hw	16	log	0%	0,607142857
Hw	16	log	0%	0,619186047
Hw	16	log	0%	0,532808399
Hw	16	log	0%	0,683516484
Hw	16	log	0%	0,56980057
Hw	16	log	0%	0,130242826
Hw	24	log	0%	0,242424242
Hw	24	log	0%	0,203030303
Hw	24	log	0%	0,166666667
Hw	24	log	0%	0,174117647
Hw	4	stac	0%	0,879807692
Hw	4	stac	0%	0,94
Hw	4	stac	0%	0,917888563
Hw	4	stac	0%	0,858565737
Hw	4	stac	0%	0,886297376
Hw	8	stac	0%	0,781045752
Hw	8	stac	0%	0,882037534
Hw	8	stac	0%	0,808988764
Hw	8	stac	0%	0,816513761
Hw	8	stac	0%	0,777777778
Hw	16	stac	0%	0,632241814
Hw	16	stac	0%	0,523584906
Hw	16	stac	0%	0,654362416
Hw	16	stac	0%	0,596685083
Hw	16	stac	0%	0,681818182
Hw	16	stac	0%	0,349775785
Hw	24	stac	0%	0,415441176
Hw	24	stac	0%	0,391752577
Hw	24	stac	0%	0,357894737
Hw	24	stac	0%	0,37007874



## Priloga I

Preglednica z izračunanimi deleži preživetja za *A. pullulans* na gojišču YNB. Prikazani so vsi parametri, uporabljeni pri statistični obdelavi podatkov (analiza variance) s pomočjo statističnega programa SPSS.

Vrsta	Doza	Faza rasti	Slanost	Delez preživetja
Ap	4	log	0%	0,688102894
Ap	4	log	0%	0,653846154
Ap	4	log	0%	0,706263499
Ap	4	log	0%	0,632941176
Ap	4	log	0%	0,646596859
Ap	8	log	0%	0,286324786
Ap	8	log	0%	0,3125
Ap	8	log	0%	0,444444444
Ap	8	log	0%	0,310344828
Ap	8	log	0%	0,350923483
Ap	16	log	0%	0,027807487
Ap	16	log	0%	0,028037383
Ap	16	log	0%	0,076004343
Ap	16	log	0%	0,055408971
Ap	16	log	0%	0,031818182
Ap	16	log	0%	0,005488474
Ap	24	log	0%	0,013071895
Ap	24	log	0%	0,007541478
Ap	24	log	0%	0,007575758
Ap	24	log	0%	0,011061947
Ap	4	stac	0%	0,744502618
Ap	4	stac	0%	0,633898305
Ap	4	stac	0%	0,736394558
Ap	4	stac	0%	0,732360097
Ap	4	stac	0%	0,75
Ap	8	stac	0%	0,556976744
Ap	8	stac	0%	0,547330097
Ap	8	stac	0%	0,504535147
Ap	8	stac	0%	0,564885496
Ap	8	stac	0%	0,538116592
Ap	16	stac	0%	0,022187005
Ap	16	stac	0%	0,060991105
Ap	16	stac	0%	0,029103609
Ap	16	stac	0%	0,042857143
Ap	16	stac	0%	0,030150754
Ap	16	stac	0%	0
Ap	24	stac	0%	0,005298013
Ap	24	stac	0%	0,001076426
Ap	24	stac	0%	0,00511509
Ap	24	stac	0%	0,002724796

## Priloga J

Preglednica z izračunanimi deleži preživetja za *A. pullulans* na gojišču YNB s 5 % NaCl. Prikazani so vsi parametri, uporabljeni pri statistični obdelavi podatkov (analiza variance) s pomočjo statističnega programa SPSS.

Vrsta	Doza	Faza rasti	Slanost	Delez preživetja
Ap	4	log	5%	0,618724559
Ap	4	log	5%	0,695979899
Ap	4	log	5%	0,57063197
Ap	4	log	5%	0,575268817
Ap	4	log	5%	0,590682196
Ap	8	log	5%	0,523240372
Ap	8	log	5%	0,451923077
Ap	8	log	5%	0,443283582
Ap	8	log	5%	0,55387931
Ap	8	log	5%	0,401023891
Ap	16	log	5%	0,052837573
Ap	16	log	5%	0,041237113
Ap	16	log	5%	0,04822695
Ap	16	log	5%	0,043263288
Ap	16	log	5%	0,056580566
Ap	16	log	5%	0,007677543
Ap	24	log	5%	0,006651885
Ap	24	log	5%	0,004807692
Ap	24	log	5%	0,011098779
Ap	24	log	5%	0,004246285
Ap	4	stac	5%	0,767722474
Ap	4	stac	5%	0,664505673
Ap	4	stac	5%	0,734536082
Ap	4	stac	5%	0,756676558
Ap	4	stac	5%	0,70984456
Ap	8	stac	5%	0,489922481
Ap	8	stac	5%	0,453651685
Ap	8	stac	5%	0,357995227
Ap	8	stac	5%	0,264112903
Ap	8	stac	5%	0,388586957
Ap	16	stac	5%	0,060278207
Ap	16	stac	5%	0,054054054
Ap	16	stac	5%	0,019130435
Ap	16	stac	5%	0,026315789
Ap	16	stac	5%	0,053398058
Ap	16	stac	5%	0,002386635
Ap	24	stac	5%	0,018656716
Ap	24	stac	5%	0
Ap	24	stac	5%	0,005012531
Ap	24	stac	5%	0,00729927

## Priloga K

Preglednica z izračunanimi deleži preživetja za *S. cerevisiae* na gojišču YNB. Prikazani so vsi parametri, uporabljeni pri statistični obdelavi podatkov (analiza variance) s pomočjo statističnega programa SPSS.

Vrsta	Doza	Faza rasti	Slanost	Delez preživetja
Sc	4	log	0%	0,515400411
Sc	4	log	0%	0,603686636
Sc	4	log	0%	0,456490728
Sc	4	log	0%	0,405660377
Sc	4	log	0%	0,285964912
Sc	8	log	0%	0,082742317
Sc	8	log	0%	0,137019231
Sc	8	log	0%	0,048780488
Sc	8	log	0%	0,030418251
Sc	8	log	0%	0,061688312
Sc	16	log	0%	0,01891253
Sc	16	log	0%	0,014527845
Sc	16	log	0%	0,004126547
Sc	16	log	0%	0,002739726
Sc	16	log	0%	0,004854369
Sc	16	log	0%	0,002145923
Sc	24	log	0%	0
Sc	24	log	0%	0
Sc	24	log	0%	0
Sc	24	log	0%	0
Sc	4	stac	0%	0,325153374
Sc	4	stac	0%	0,477203647
Sc	4	stac	0%	0,459110473
Sc	4	stac	0%	0,257731959
Sc	4	stac	0%	0,515228426
Sc	8	stac	0%	0,038461538
Sc	8	stac	0%	0,06626506
Sc	8	stac	0%	0,010899183
Sc	8	stac	0%	0,035862069
Sc	8	stac	0%	0,083732057
Sc	16	stac	0%	0
Sc	16	stac	0%	0,016778523
Sc	16	stac	0%	0
Sc	16	stac	0%	0
Sc	16	stac	0%	0
Sc	16	stac	0%	0
Sc	24	stac	0%	0
Sc	24	stac	0%	0
Sc	24	stac	0%	0,002724796
Sc	24	stac	0%	0

## Priloga L

Preglednica z izračunanimi deleži preživetja za *S. cerevisiae* na gojišču YNB s 5 % NaCl. Prikazani so vsi parametri, uporabljeni pri statistični obdelavi podatkov (analiza variance) s pomočjo statističnega programa SPSS.

Vrsta	Doza	Faza rasti	Slanost	Delez preživetja
Sc	4	log	5%	0,442885772
Sc	4	log	5%	0,419047619
Sc	4	log	5%	0,260606061
Sc	4	log	5%	0,410041841
Sc	4	log	5%	0,408060453
Sc	8	log	5%	0,044392523
Sc	8	log	5%	0,063291139
Sc	8	log	5%	0,017429194
Sc	8	log	5%	0,034707158
Sc	8	log	5%	0,031390135
Sc	16	log	5%	0,00248139
Sc	16	log	5%	0
Sc	16	log	5%	0
Sc	16	log	5%	0,00234192
Sc	16	log	5%	0
Sc	16	log	5%	0
Sc	24	log	5%	0
Sc	24	log	5%	0
Sc	24	log	5%	0
Sc	24	log	5%	0
Sc	4	stac	5%	0,230593607
Sc	4	stac	5%	0,248979592
Sc	4	stac	5%	0,423611111
Sc	4	stac	5%	0,324937028
Sc	4	stac	5%	0,392207792
Sc	8	stac	5%	0,003003003
Sc	8	stac	5%	0,011049724
Sc	8	stac	5%	0,00729927
Sc	8	stac	5%	0,006006006
Sc	8	stac	5%	0,015831135
Sc	16	stac	5%	0
Sc	16	stac	5%	0
Sc	16	stac	5%	0
Sc	16	stac	5%	0
Sc	16	stac	5%	0
Sc	24	stac	5%	0
Sc	24	stac	5%	0
Sc	24	stac	5%	0
Sc	24	stac	5%	0