

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nataša HADALIN BAŠA

**REŠEVANJE TAKSONOMSKIH DILEM PRI  
BAZIDIOMICETNIH KVASOVKAH IZ ARKTIČNIH  
LEDENIKOV**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nataša HADALIN BAŠA

**REŠEVANJE TAKSONOMSKIH DILEM PRI BAZIDIOMICETNIH  
KVASOVKAH IZ ARKTIČNIH LEDENIKOV**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**SOLVING THE TAXONOMIC DILEMMAS OF BASIDIOMYCETOUS  
YEASTS FROM ARCTIC GLACIERS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2014

## POPRAVKI

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani ter na Visoki šoli za vinogradništvo in vinarstvo Univerze v Novi Gorici.

Za mentorico je imenovana prof. dr. Nina Gunde - Cimerman, za somentorico doc. dr. Lorena Butinar, za recenzentko doc. dr. Neža Čadež.

Mentorica: prof. dr. Nina Gunde - Cimerman

Somentorica: doc. dr. Lorena Butinar

Recenzentka: doc. dr. Neža Čadež

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Nina GUNDE - CIMERMAN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Lorena BUTINAR

Univerza v Novi Gorici, Visoka šola za vinogradništvo in vinarstvo

Članica: doc. dr. Neža ČADEŽ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Diplomsko delo 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.

Nataša Hadalin Baša

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

**ŠD** Dn  
**DK** UDK 579.8.063:582.284(043)=163.6  
**KG** glive/bazidiomicetne kvasovke/taksonomska analiza/Arktika  
**AV** HADALIN BAŠA, Nataša  
**SA** GUNDE - CIMERMAN, Nina (mentorica)/BUTINAR, Lorena (somentorica)/  
ČADEŽ, Neža (recenzentka)  
**KZ** SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
**ZA** Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija  
mikrobiologije  
**LI** 2014  
**IN** REŠEVANJE TAKSONOMSKIH DILEM PRI BAZIDIOMICETNIH  
KVASOVKAH IZ ARKTIČNIH LEDENIKOV  
**TD** Diplomsko delo  
**OP** XVI, 95 str., 41 pregl., 9 sl., 68 vir.  
**IJ** sl  
**JII** sl/en  
**AI** Izjemno hladna okolja Arktičnih ledenikov so mikrobiološko slabo raziskana. Študije zadnjih let odkrivajo prisotnost evkariontskih organizmov v teh ekstremnih okoljih. Predmet raziskovanja tega diplomskega dela so kvasovke iz vzorcev zbranih leta 2003 na otočju Svalbard na Norveškem. S taksonomsko analizo na več nivojih smo izolirane kvasovke identificirali in uvrstili v znane taksonone. Vsem kvasovkam smo določili nukleotidno zaporedje domene D1/D2 26S rDNA. Izdelali smo filogenetska drevesa na podlagi katerih smo na izbranih izolatih izvedli še dodatne taksonomske analize – fiziološke teste, kot so: asimilacija različnih virov ogljika in dušika, fermentacija glukoze, hidroliza arbutina ter uree, rast na gojišču s cikloheksimidom in gojišču brez vitaminov, test DBB ter ugotavljanje tvorjenja ekstracelularnega škroba. Sledili so dodatni testi ekološko zanimivih skupin. Izbranim sevom smo določili aktivnost amilaz, proteaz, esteraz, pektinaz in celulaz; ugotavljalci smo tvorbo sideroforjev na trdnem ter v tekočem gojišču in merili velikost celic ter debelino kapsul po inkubaciji pri temperaturi 4 °C in 20 °C. Od skupno 115 sevov smo določili 8 askomicetnih in 107 bazidiomicetnih kvasovk. Bazidiomicetne smo razvrstili v dve poddebbli. Sevi iz poddebla Pucciniomycotina so razvrščeni v 3 družine, od tega je 46 izolatov iz družine Microbotryomycetes in 14 iz Cystobasidiomycetes. Trije izolati so iz družine Agaricostibolomycetes. Vseh 43 sevov iz poddebla Agaricomycotina je iz družine Tremellomycetes. V primerih, kjer analiza D1/D2 ni zadostovala za določitev do vrste, bi bile potrebne dodatne analize.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 579.8.063:582.284(043)=163.6  
CX fungi/basidiomycetous yeasts/taxonomic analysis/Arctic  
AU HADALIN BAŠA, Nataša  
AA GUNDE - CIMERMAN, Nina (supervisor)/BUTINAR, Lorena (co-advisor)/  
ČADEŽ, Neža (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in  
Microbiology  
PY 2014  
TI SOLVING THE TAXONOMIC DILEMMAS OF BASIDIOMYCETOUS  
YEASTS FROM ARCTIC GLACIERS  
DT Graduation thesis (University studies)  
NO XVI, 95 p., 41 tab., 9 fig., 68 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Microorganisms of the extremely cold environment of the Arctic glaciers are poorly investigated. Recent studies revealed the presence of eukaryotic organisms in these extreme environments. The subject of this thesis research are yeasts isolated from samples taken 2003 in Svalbard, Norway. Isolated yeasts were identified with the taxonomic analysis at several levels and classified them in the known taxa. Sequence analyses of the 26S rDNA D1/D2 region were performed for all isolated yeasts and phylogenetic trees were created. On the basis of this results we performed additional taxonomic analyses of certain groups - physiological tests, such as the assimilation of different sources of carbon and nitrogen, fermentation of glucose and urea hydrolysis, arbutin hydrolysis, growth in cycloheximide containing medium and in a medium without vitamins, DBB test and production of starch-like compounds. These tests were followed by additional tests of ecologically interesting groups. Selected strains were tested for amylase, protease, esterase, pectinase, and cellulase activities; a method for screening of siderophore production was carried out on agar plate and in liquid media; cell size and polysaccharide capsule were measured after incubation at 4 °C and 20 °C. Overall, of 115 yeast strains, 8 were of ascomycetous origin and 107 basidiomycetous. Basidiomycetous yeast were divided into two subphyla. Strains which belong to subphylum Pucciniomycotina were classified into 3 families: 46 isolates belong to the Microbotryomycetes family and 14 isolates to the family Cystobasidiomycetes. 3 isolates belong to the Agaricostibilomycetes family. All 43 strains of subphylum Agaricomycotina belong to Tremellomycetes. In certain cases, where D1/D2 analyses did not distinguish closely related species, further analyses would have to be conducted.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....	IV
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	V
KAZALO VSEBINE .....	VI
KAZALO PREGLEDNIC .....	X
KAZALO SLIK .....	XIII
OKRAJSAVE IN SIMBOLI .....	XIV
SLOVARČEK .....	XVI
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.2 CILJI IN HIPOTEZE DIPLOMSKEGA DELA .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 ARKTIKA .....	2
<b>2.1.1 Svalbard, Kongsfjorden .....</b>	<b>3</b>
2.2 MIKROORGANIZMI V IZJEMNO HLADNIH OKOLJIH IN NJIHOVI HABITATI .....	5
2.3 GLIVE IZJEMNO HLADNIH OKOLJIH IN NJIHOVI HABITATI .....	6
<b>2.3.1 Morski led.....</b>	<b>7</b>
<b>2.3.2 Ledeniški led in subledeniško okolje.....</b>	<b>7</b>
<b>2.3.3 Permafrost.....</b>	<b>8</b>
2.4 PRILAGODITVE PSIHROFILNIH IN PSIHROTOLERANTNIH ORGANIZMOV NA HLADNO OKOLJE .....	8
<b>2.4.1 Kompatibilni topljenci .....</b>	<b>9</b>
<b>2.4.2 Celična stena in citoplazemska membrana .....</b>	<b>9</b>
<b>2.4.3 Encimi .....</b>	<b>10</b>
<b>2.4.4 Zunajcelični polisaharidi .....</b>	<b>10</b>
<b>2.4.5 Ostali načini prilagoditve na nizke temperature .....</b>	<b>11</b>
2.5 PRILAGODITVE PSIHROFILNIH IN PSIHROTOLERANTNIH ORGANIZMOV NA DRUGE STRESNE DEJAVNIKE .....	11
<b>2.5.1 Pomanjkanje hranil.....</b>	<b>11</b>
<b>2.5.1 Pomanjkanje železa .....</b>	<b>11</b>
<b>2.5.2 Osmotski stres.....</b>	<b>13</b>

<b>2.5.3</b>	<b>Visoko UV-sevanje.....</b>	<b>13</b>
<b>2.5.4</b>	<b>Pomanjkanje vode .....</b>	<b>14</b>
2.6	KVASOVKE .....	14
<b>2.6.1</b>	<b>Uvrstitev .....</b>	<b>14</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Značilnosti .....</b>	<b>14</b>
<b>2.6.3</b>	<b>Taksonomija.....</b>	<b>15</b>
2.6.3.1	Morfološka karakterizacija .....	15
2.6.3.2	Fiziološki in biokemijski testi.....	15
2.6.3.3	Molekularne metode .....	17
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>20</b>
3.1	KEMIKALIJE IN REAGENTI .....	20
3.2	MATERIALI .....	22
3.3	LABORATORIJSKI PRIBOR .....	23
3.4	NAPRAVE IN DRUGI PRIPOMOČKI.....	23
3.5	GOJIŠČA.....	24
<b>3.5.1</b>	<b>Identifikacijska gojišča .....</b>	<b>24</b>
3.5.1.1	Gojišča za dokazovanje sposobnosti asimilacije različnih virov ogljika ....	25
3.5.1.2	Gojišča za dokazovanje sposobnosti asimilacije različnih virov dušika ....	26
3.5.1.3	Gojišča za ugotavljanje sposobnosti fermentacije glukoze .....	26
3.5.1.4	Gojišče za testiranje rasti v prisotnosti cikloheksimida .....	26
3.5.1.5	Gojišče za testiranje tvorbe ekstracelularnega škroba .....	27
3.5.1.6	Gojišče za testiranje hidrolize uree .....	27
3.5.1.7	Gojišče za testiranje hidrolize arbutina .....	27
3.5.1.8	Gojišče za testiranje rasti v gojišču brez dodanih vitaminov .....	27
3.5.1.9	CBU agar - gojišče za testiranje rasti na gojišču DBB .....	27
<b>3.5.2</b>	<b>Gojišča za ugotavljanje tvorbe sideroforjev .....</b>	<b>28</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Gojišča za encimske teste .....</b>	<b>28</b>
3.5.3.1	Proteazna aktivnost .....	28
3.5.3.2	Amilazna aktivnost .....	28
3.5.3.3	Pektinazna aktivnost .....	29
3.5.3.4	Esterazna aktivnost .....	29

3.5.3.5	Celulolitična aktivnost .....	29
3.6	RAZTOPINE .....	30
3.7	PUFRI .....	30
3.8	GELI ZA ANALIZE DNA .....	31
3.9	UPORABLJENI SEVI .....	32
3.10	TAKSONOMSKE ANALIZE .....	38
<b>3.10.1</b>	<b>Morfološke analize .....</b>	<b>38</b>
3.10.1.1	Merjenje velikosti celic in kapsul .....	38
<b>3.10.2</b>	<b>Fiziološke analize .....</b>	<b>38</b>
3.10.2.1	Identifikacija kvasovk .....	38
3.10.2.2	Encimski testi .....	38
<b>3.10.3</b>	<b>Molekularno genetske analize .....</b>	<b>39</b>
3.10.3.1	Analiza rDNA zaporedij (Boekhout in sod., 1995) .....	39
3.10.3.2	Določanje nukleotidnega zaporedja .....	40
3.10.3.3	Izdelava filogenetskih dreves .....	40
<b>4</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>41</b>
4.1	DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA DOMENE D1/D2 26S rDNA IZOLIRANIH SEVOV IN IZDELAVA FILOGENETSKIH DREVES .....	46
<b>4.1.1</b>	<b>Rod <i>Cryptococcus</i> .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Rod <i>Leucosporidiella</i> .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Rod <i>Kondoa</i> .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Rod <i>Dioszegia</i> .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1.5</b>	<b>Rod <i>Sporobolomyces</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1.6</b>	<b>Rod <i>Guehomyces</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1.7</b>	<b>Rod <i>Sakaguchia</i> .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1.8</b>	<b>Rod <i>Rhodosporidium</i> .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1.9</b>	<b>Rod <i>Rhodotorula</i> .....</b>	<b>54</b>
4.2	FIZIOLOŠKI TESTI .....	60
<b>4.2.1</b>	<b><i>Cryptococcus albidosimilis</i> .....</b>	<b>60</b>
<b>4.2.2</b>	<b><i>Cryptococcus magnus/ Cryptococcus chernovii/ Filobasidium floriforme</i> ..</b>	<b>63</b>
<b>4.2.3</b>	<b><i>Rhodosporidium lusitanie/ Rhodotorula colostri</i> .....</b>	<b>66</b>
<b>4.2.4</b>	<b><i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923 .....</b>	<b>69</b>

4.3	DODATNI TESTI EKOLOŠKO ZANIMIVIH VRST .....	72
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>80</b>
5.1	RAZPRAVA.....	80
5.1.1	Rod <i>Cryptococcus</i> .....	80
5.1.2	Rod <i>Leucosporidiella</i> in rod <i>Leucosporidium</i> .....	82
5.1.3	Rod <i>Sporobolomyces</i> in rod <i>Sporidiobolus</i> .....	82
5.1.4	Rod <i>Rhodosporidium</i> .....	83
5.1.5	Rod <i>Rhodotorula</i> .....	83
5.2	SKLEPI.....	86
<b>6</b>	<b>POVZETEK .....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>89</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Uporabljene kemikalije in reagenti .....	20
<b>Preglednica 2:</b> Laboratorijski pribor uporabljen pri raziskovalnem delu .....	23
<b>Preglednica 3:</b> Laboratorijske naprave s proizvajalcem in državo porekla .....	23
<b>Preglednica 4:</b> Sevi bazidiomicetnih kvasovk, kraji izolacije in izvedeni testi ter analize	32
<b>Preglednica 5:</b> Uvrstitev izolatov v taksonomske skupine in celokupno število izolatov znotraj identificiranih vrst .....	42
<b>Preglednica 6:</b> Ex oznake sevov za rod <i>Cryptococcus</i> , skupino <i>C. albidosimilis</i> in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov.....	46
<b>Preglednica 7:</b> Ex oznake sevov za rod <i>Cryptococcus</i> , skupino <i>C. glivescens</i> in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov.....	46
<b>Preglednica 8:</b> Ex oznake sevov za rod <i>Cryptococcus</i> , skupino <i>C. albidus</i> in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov.....	47
<b>Preglednica 9:</b> Ex oznake sevov za rod <i>Cryptococcus</i> , skupino <i>C. tephrensis</i> in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov.....	47
<b>Preglednica 10:</b> Ex oznake sevov za skupino <i>C. magnus/C. chernovii/F. floriforme</i> in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov.....	48
<b>Preglednica 11:</b> Ex oznake sevov za rod <i>Cryptococcus</i> , skupino <i>Cryptococcus</i> sp. in določene vrste na osnovi sekvenciranja D1/D2 domene 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov .....	48
<b>Preglednica 12:</b> Ex oznake sevov za rod <i>Cryptococcus</i> , skupino <i>C. victoriae</i> in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov.....	49
<b>Preglednica 13:</b> Ex oznake sevov za rod <i>Leucosporidiella</i> , skupino <i>L.muscorum</i> in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov.....	49
<b>Preglednica 14:</b> Ex oznake sevov za rod <i>Leucosporidiella</i> , skupino <i>L. creatinivora/Le. scotii/L. yacutica</i> in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov .....	50
<b>Preglednica 15:</b> Ex oznake sevov za rod <i>Kondoa</i> in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov .....	50

<b>Preglednica 16:</b> Ex oznake sevov za rod <i>Dioszegia</i> in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov .....	50
<b>Preglednica 17:</b> Ex oznake sevov za rod <i>Sporobolomyces</i> , skupino <i>Sp. roseus/Sp. ruberrimus/S. pararoseus</i> in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov.....	51
<b>Preglednica 18:</b> Ex oznake sevov za rod <i>Guehomyces</i> in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov .....	51
<b>Preglednica 19:</b> Ex oznake sevov za rod <i>Sakaguchia</i> in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov .....	52
<b>Preglednica 20:</b> Ex oznake sevov za skupino <i>Rhodosporidium</i> sp./ <i>Rhodotorula</i> sp. in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov.....	52
<b>Preglednica 21:</b> Ex oznake sevov za skupino <i>R. graminis/Rh. babjevae/Rh. diobovatum/R. glutinis</i> in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov .....	54
<b>Preglednica 22:</b> Ex oznake sevov za rod <i>Rhodotorula</i> , skupino <i>R. mucilaginosa</i> in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov.....	54
<b>Preglednica 23:</b> Ex oznake sevov za rod <i>Rhodotorula</i> , skupino <i>R. laryngis/Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923 in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov.....	55
<b>Preglednica 24:</b> Ex oznake sevov za rod <i>Rhodotorula</i> , skupino <i>R. glacialis</i> in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov.....	55
<b>Preglednica 25:</b> Ex oznake sevov za rod <i>Rhodotorula</i> , skupino <i>R. eucalyptica/R. phylia</i> in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov.....	56
<b>Preglednica 26:</b> Rezultati izbranih fizioloških testov za seve vrste <i>C. albidosimilis</i> .....	60
<b>Preglednica 27:</b> Rezultati asimilacijskih testov za različne vire dušika sevov vrste <i>C. albidosimilis</i> .....	61
<b>Preglednica 28:</b> Rezultati asimilacijskih testov za različne vire ogljika sevov vrste <i>C. albidosimilis</i> .....	62
<b>Preglednica 29:</b> Rezultati izbranih fizioloških testov za seve <i>Cryptococcus magnus/Cryptococcus chernovii/Filobasidium floriforme</i> .....	64
<b>Preglednica 30:</b> Rezultati za asimilacijskih testov za različne vire ogljika za seve <i>Cryptococcus magnus/Cryptococcus chernovii/Filobasidium floriforme</i> .....	65

<b>Preglednica 31:</b> Rezultati asimilacijskih testov za različne vire dušika za seve <i>Cryptococcus magnus/ Cryptococcus chernovii/ Filobasidium floriforme</i> .....	66
<b>Preglednica 32:</b> Rezultati izbranih fizioloških testov .....	66
<b>Preglednica 33:</b> Rezultati asimilacijskih testov za različne vire dušika za seve <i>Rhodosporidium lusitanie/ Rhodotorula colostri</i> .....	67
<b>Preglednica 34:</b> Rezultati asimilacijskih testov za različne vire ogljika za seve <i>Rhodosporidium lusitanie/ Rhodotorula colostri</i> .....	68
<b>Preglednica 35:</b> Rezultati izbranih fizioloških testov za <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923 .....	69
<b>Preglednica 36:</b> Rezultati asimilacijskih testov za različne vire ogljika seva <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923 .....	70
<b>Preglednica 37:</b> Rezultati asimilacijskih testov za različne vire dušika seva <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923 .....	71
<b>Preglednica 38:</b> Rezultati encimskih testov za izbrane seve .....	73
<b>Preglednica 39:</b> Rezultati testiranja produkcije sideroforjev v tekočem in na trdnem gojišču za izbrane seve .....	77
<b>Preglednica 40:</b> Rezultati meritev širine in dolžine celic ter debeline kapsule .....	78
<b>Preglednica 41:</b> Rezultati testiranja rasti pri različnih temperaturah .....	79

## KAZALO SLIK

Slika 1: Arktika(Hannemann, 2010).....	3
Slika 2: Otočje Svalbard (Norwegian Polar Institute, 2014) .....	4
Slika 3: Filogenetsko drevo izdelano po metodi distančnega združevanja najbližjega soseda za izolate iz reda Filobasidiales .....	57
Slika 4: Filogenetsko drevo izdelano po metodi distančnega združevanja najbližjega soseda za izolate iz družine Microbotryomycetes.....	58
Slika 5: Filogenetsko drevo izdelano po metodi distančnega združevanja najbližjega soseda za izolate iz družine Tremelalles .....	59
Slika 6: Kulture nekaterih sevov rodu <i>Cryptoccocus</i> na poševnikih z MEA gojiščem.....	63
Slika 7: Testiranje esterazne aktivnosti .....	74
Slika 8: Testiranje proteazne aktivnosti.....	75
Slika 9: Testiranje produkcije sideroforjev. ....	76

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

$a_w$	vodna aktivnost
BLAST	osnovno iskalno orodje lokalne poravnave (angl. <b>B</b> asic <b>L</b> ocal <b>A</b> lignment <b>S</b> earch <b>T</b> ool)
bp	bazni pari
CBS	zbirka glivnih kultur (nl. <b>C</b> entraal <b>b</b> ureau voor <b>S</b> chimmercultures), Nizozemska
CBU	CBU agar (angl. <b>C</b> arbon <b>B</b> ase <b>U</b> rea Agar)
CTAB	cetyltrimetilamonijev <b>bromid</b>
CYA	gojišče Czapek (angl. <b>C</b> zapek <b>Y</b> east <b>A</b> utolysate Agar)
DBB	angl. <b>D</b> iazonium <b>B</b> lue <b>B</b>
dH <sub>2</sub> O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <b>D</b> eoxiribonucleic Acid)
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat (angl. <b>D</b> eoxyribonucleotide <b>T</b> riphosphate)
D1	variabilna domena 1 velike podenote ribosomske RNA
D2	variabilna domena 2 velike podenote ribosomske RNA
Ex	zbirka ekstremofilnih mikroorganizmov, IC MYCOSMO, član MRRICUL, Univerza v Ljubljani, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta (angl. Culture Collection of <b>E</b> xtrémophilic Microorganisms)
GPY	agar z glukozo, peptonom in kvasnim ekstraktom (angl. <b>G</b> lucose <b>P</b> eptone <b>Y</b> east Extract Agar)
HCl	klorovodikova kislina
ITS	notranje prepisujoče regije (angl. <b>I</b> nternal <b>T</b> ranscribed <b>S</b> pacer)
LSU	velika ribosomska podenota (angl. <b>L</b> arge <b>S</b> ubunit)
M	molarna koncentracija
MEA	agar s sladnim ekstraktom (angl. <b>M</b> alt <b>E</b> xtract <b>A</b> gar)
NaCl	natrijev klorid

OD	optična gostota
PDA	krompirjev dekstrozni agar (angl. <b>Potato Dextrose Agar</b> )
rcf	relativna centrifugalna sila (angl. <b>Relative Centrifugal Force</b> )
rDNA	ribosomska deoksiribonukleinska kislina (angl. <b>Ribosomal Deoxyribonucleic Acid</b> )
RNA	ribonukleinska kislina (angl. <b>Ribonucleic Acid</b> )
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina (angl. <b>Ribosomal Ribonucleic Acid</b> )
rpm	število obratov v minuti (angl. <b>rotations per minute</b> )
SSU	mala ribosomska podenota (angl. <b>Small Subunit</b> )
PDA	krompirjev dekstrozni agar (angl. <b>Potato Dextrose Agar</b> )
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <b>Polimerase Chain Reaction</b> )
T	tipski sev
TAE	tris, ocetna kislina in EDTA pufer (angl. <b>Tris, Acetic acid, EDTA</b> )
TBE	tris, borova kislina in EDTA pufer (angl. <b>Tris, Borat, EDTA</b> )
TRIS	tris (hidroksimetil) aminometan
TWEEN 80	polisorbat 80
YCB	gojišče z univerzalnim virom ogljika in brez vira dušika (angl. <b>Yeast Carbon Base</b> )
YM	tekoče gojišče s sladnim in kvasnim ekstraktom (angl. <b>Yeast Malt Broth</b> )
YMA	agar s sladnim in kvasnim ekstraktom (angl. <b>Yeast Malt Agar</b> )
YNB	gojišče z univerzalnim virom dušika in brez vira ogljika (angl. <b>Yeast Nitroso Base</b> )

## SLOVARČEK

$a_w$	Vodna aktivnost; izraža dostopnost vode v substratu v obliki desetiškega deleža količine vode, navzoče v substratu, kadar je le-ta v ravnotežju z nasičeno atmosfero (relativna ravnotežna vlažnost okoli 70 % pomeni, da ima substrat vodno aktivnost 0,70).
mol	Količina snovi sistema, ki vsebuje toliko elementarnih delcev, kolikor je atomov v 0,012 kg ogljikovega izotopa 12 (definicija iz leta 1971).
pH	Merilo za koncentracijo oksonijevih ionov ( $H^3O^+$ ) v raztopini in s tem posledično merilo za kislost ali alkalnost raztopine.
U/ $\mu$ L	1 enota (angl. Unit) je opredeljena kot količina encima, potrebnega za popolno razgradnjo 1 $\mu$ L DNA v 10 minutah pri 37 °C.

## 1 UVOD

Izjemno hladne habitate naseljujejo ekstremofilni mikroorganizmi, tudi glice. To področje raziskovanja je še precej novo in slabo raziskano. Arktični ledeniki so okolja, kjer poleg izjemno nizkih temperatur razmere otežujejo tudi osmotski stres, visoko UV-sevanje na površju in pomanjkanje vode ter hrani. Tam živeči mikroorganizmi so za te stresne dejavnike razvili različne prilagoditve.

### 1.2 CILJI IN HIPOTEZE DIPLOMSKEGA DELA

Identificirati bazidiomicetne kvasovke izolirane iz arktičnega okolja do nivoja rodov in vrst, s poudarkom na redkih ter novih taksonih, z uporabo klasičnih in molekularnih taksonomskeih metod.

Delovne hipoteze:

- Arktični ledeniki so okolja, v katerih pričakujemo predvsem bazidiomicetne kvasovke.
- Najverjetneje bodo celice obdane s kapsulami, ki celice ščitijo pred zamrzovanjem in odtajevanjem ter posledičnimi poškodbami.
- S taksonomsko analizo na različnih nivojih bomo izolirane kvasovke identificirali in uvrstili v znane taksone.
- Zaradi geografske oddaljenosti in ekstremnega okolja pričakujemo odkritje še neopisanih taksonov.

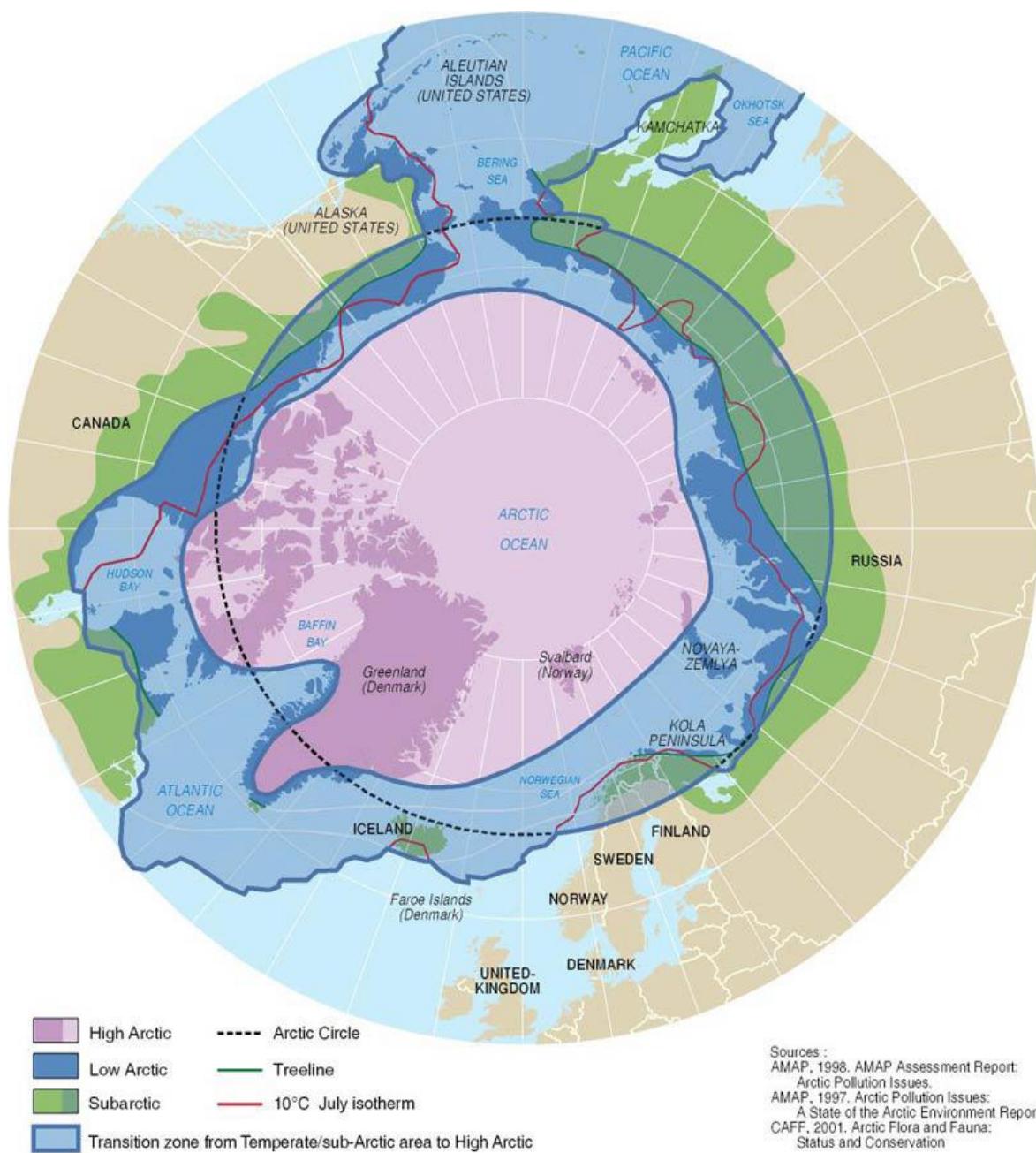
## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ARKTIKA

Arktika je območje, ki obdaja severni zemeljski tečaj in zajema dele Kanade, Rusije, Grenlandije, Združenih držav Amerike, Švedske, Finske, Islandije ter Norveške, ki ležijo na obalah Arktičnega oceana. Južno je omejena z arktičnim krogom (severnim tečajnikom), ki vzporedno poteka  $66^{\circ} 33' 44''$  severno od ekvatorja. Značilnost za območja znotraj arktičnega kroga sta polarna noč in polarni dan. Arktiko lahko tudi omejimo z julijsko izotermo  $10^{\circ}\text{C}$  (Ostenso, 2013a; Hannemann, 2010).

Arktični ocean je prekrit z ledenimi ploskvami, katerih obseg in debelina se sezonsko spreminja v odvisnosti od intenzivnosti sončne svetlobe, ki doseže površino Zemlje. Je najmanjši in najbolj plitek od petih svetovnih oceanov. Nekateri oceanografi ga tako niti ne uvrščajo med oceane in ga imenujejo arktično-mediteransko morje ali arktično morje. Pokriva področje veliko približno  $14.056\ 000\ \text{km}^2$ , tj. 3 % celotne zemeljske površine. Temperatura in slanost se sezonsko spreminja v odvisno od taljenja ledu. Zaradi slanosti je točka ledišča nižja kot pri čisti vodi in je  $-1,8^{\circ}\text{C}$  (Ostenso, 2013b; Pidwirny, 2006).

Na celini sta sneg in led prisotna skoraj celo leto. Zaradi nizkih temperatur so tla globoko zmrznjena, tudi v globino 200 m. Odmrznejo le poleti in to samo na površju (do 1,5 m globoko). Osnovna značilnost podnebja v polarnih predelih je stalno nizka temperatura, čeprav je osončenost zelo spremenljiva. Značilnost arktične pomladi je dolgotrajna osončenost. Zaradi nizke lege sonca atmosfera absorbira in odseva veliko topotne energije. Ker se večji del energije porabi za topljenje zimskega snega in ledu, le malo energije ostane za ogrevanje ozračja, zato je polarno poletje mrzlo. Zima je dolgotrajna in zelo mrzla, temperatura zraka pa lahko pada vse do  $-50^{\circ}\text{C}$ . Povprečna letna temperatura na celotnem arktičnem področju je tako negativna (Przybylak, 2003, cit. po Sonjak, 2006).



Slika 1: Arktika (Hannemann, 2010)

### 2.1.1 Svalbard, Kongsfjorden

Kongsfjorden je eden največjih fjordov na zahodni obali otoka Spitzbergen, ki je del otočja Svalbard z geografsko lego 79° severno in 12° vzhodno. Poteka v smeri jug-jugovzhod do zahod-severozahod, se v ustju združi s fjordom Krosfjorden in se nadaljuje v Grenlandsko morje. 26 km dolg in 8 km širok fjord ima značilno podolgovato obliko s strmimi obalami, obdaja pa ga več manjših otokov. Ima 140 m globoko vodno telo. Plimovanje ima razpon približno dva metra, vodni tok v fjordu je dokaj počasen, vendar je občasno prevetren.

Voda je toplejša in manj slana kot v odprttem morju v isti zemljepisni širini. Povprečna letna temperatura vode je okoli  $-5^{\circ}\text{C}$ , spomladis in poleti pa lahko naraste do  $3,8^{\circ}\text{C}$ . Slanost vode se spreminja z letnimi časi. Pozimi je višja zaradi mešanja vode iz fjorda z globokomorsko vodo Atlantskega oceana, poleti se slanost znižuje zaradi taljenja ledenikov. Voda v fjordu ostane, kljub visoki zemljepisni širini, večino nezmrznjena, obala pa je večino leta prekrita z ledom. Zalivi so prekriti z ledeniki, ki se segajo v morje (Gunde - Cimerman in sod., 2005).



Slika 2: Otočje Svalbard (Norwegian Polar Institute, 2014)

## 2.2 MIKROORGANIZMI V IZJEMNO HLADNIH OKOLJIH IN NJIHOVI HABITATI

Velik del Zemlje je hladen: okoli 14 % biosfere je polarne in 90 % (po volumnu) je polarnega oceana s temperaturami pod 5 °C (Larose in sod., 2009).

Psihofile<sup>1</sup> najdemo skoraj izključno le v okoljih, ki so konstantno hladni in stabilni. Tako okolje so morja v polarnih regijah. Psihrotolerantni organizmi so splošno razširjeni. Lahko jih izoliramo iz zemlje in vode na območjih z zmernim podnebjem, pa tudi iz mesa, mleka ter mlečnih izdelkov, jabolčnika, zelenjave in sadja, skladiščenega pri temperaturi okoli 4 °C. Kopenska polarna območja so bolj nestabilna, zato tam prevladujejo mezofilne psihrotolerantne vrste (Madigan in sod., 2006; Ruisi in sod., 2007).

Raziskave na področju ekstremofilne mikrobiologije so bile v prvi vrsti namenjene študijam prokariotskih mikroorganizmov iz prepričanja, da so evkarionti nezmožni naseljevati taka območja. Študije zadnjih let pa odkrivajo prisotnost različnih evakariotskih organizmov v ekstremnih okoljih (Gunde - Cimerman in sod., 2005).

Opisani so mikroorganizmi iz različnih ekstremno hladnih okolij, kot so ledeniški led, morski led in polarni sneg (Larose in sod., 2009).

Mnoge raziskave potrjujejo, da ledeniki niso niti sterilni niti abiotska skladišča mirujočih celic, ampak vsebujejo aktivne mikrobne združbe, ki izrabljajo hranila iz atmosfere (Anesio in sod., 2008).

Tekoča voda, potrebna za vse biološke procese, je na površju arktičnih ledenikov na voljo nekaj tednov oziroma mesecev poletja. Nastajajo pa tudi t. i. kriokonitne kotanje, ki so z vodo napolnjene depresije na površju ledenikov. Nastanejo zaradi segrevanja vetrnih nanosov s sončno svetlobo, ki posledično topijo led. Vetrni nanosi so zmes anorganskih in organskih delcev, vključno z mikrobnim materialom, ki predstavlja vcepek ter substrat. Iz teh kotanj so izolirali raznolike mikrobne združbe, ki odvisno od geografske regije, vključujejo viruse, bakterije in alge. Kriokonitne kotanje predstavljajo prevladujoče okolje aktivnega mikrobnega življenja na ledeniški površini (Anesio in sod., 2008; Stibal in sod., 2008).

Skrajno hladna okolja povezujemo z mnogimi okoljskimi stresnimi dejavniki, katerim pa uspešno kljubujejo mikroorganizmi, ki so razvili različne morfološke in fiziološke

---

<sup>1</sup> Psihrofilni so organizmi, katerih optimum rasti je 15 °C ali manj, najvišja temperatura rasti pod 20 °C in najnižja temperatura rasti 0 °C ali celo manj. Organizme, ki rastejo pri 0 °C, vendar imajo optimum rasti v območju 20–40 °C, imenujemo psihrotolerantni organizmi (Madigan in sod., 2006). Ta definicija psihirofilnosti se ne uporablja za kvasovke. Kot psihirofilne smatramo tiste vrste kvasovk, ki rastejo pri nižjih temperaturah od 25 °C (Vishniac, H. S., 1987, cit. po Strmole, 2007).

prilagoditve. Mikroorganizmi se hkrati soočajo z različnimi stresnimi dejavniki in morajo razviti strategije odgovorov na posamezen stresni faktor (Ruisi in sod., 2007).

### 2.3 GLIVE IZJEMNO HLADNIH OKOLJIH IN NJIHOVI HABITATI

Pretekle študije organizmov iz skrajno hladnih okolij so se osredotočale predvsem na psihrofilne bakterije in arheje, deloma tudi alge, pojavnost ter raznovrstnost psihrofilnih gliv pa je bila praktično neraziskana (Gunde - Cimerman in sod., 2005).

Nedavne raziskave pa kažejo, da so glice razširjene v različnih ekstremnih okoljih, kot so solinske vode, suhe površine skal in oceanske globine. Glice so bile izolirane tudi iz izjemno hladnih okolij, in sicer iz različnih habitatov (rastlinje, permafrost, voda, sneg in ledeniški led). Študije biodiverzitete gliv v antarktičnih tleh kažejo, da je to zanimiv habitat za kserofilne glice – je skrajno suho okolje z nizko  $a_w$  (vodna aktivnost) in visoko vsebnostjo soli. Medtem ko v prsti zmernih območij prevladujejo predvsem askomicetne filamentozne glice, najdemo v antarktični prsti predvsem bazidiomicetne kvasovke. Prevladujejo rodovi *Candida*, *Cryptococcus* in *Leucopodium*. Raznovrstnost je majhna, prevladuje nekaj visoko specializiranih in pogosto endemičnih taksonov. Kvasovke in druge glice so bile izolirane tudi iz permafrosta v Sibiriji. Dolga obdobja so preživele v zmrznjenem stanju, vendar so ob odtajanju zopet postale metabolno aktivne. Najpogostejše so bile iz rodu *Cryptococcus*. Še manj so raziskane glice vodnih habitatov polarnih območij. Iz vode odprtrega morja na polarnih območjih so bile izolirane večinoma kvasovke rodov *Leucosporidium*, *Rhodosporidium* in *Sporobolomyces*. Glice so bile izolirane tudi iz antarktičnih jezer. Najmanj raziskav pa je o glivah v ledenikih. Filamentozne glice in kvasovke so bile najdene v kriokonitnih kotanjah. Filamentozne glice so izolirali tudi iz 10.000–13.000 let starega ledu na Grenlandiji, 12.000 let starega ledu na Antarktiki in celo 38.600 let starega ledu prav tako na Antarktiki. Kvasovke iz rodov *Cryptococcus* in *Rhodotula* pa so bile najdene le v zgornjih, mlajših plasteh ledu ter snega (Gunde - Cimerman in sod., 2005; Gunde - Cimerman in sod., 2003).

Glice lahko rastejo pri precej nižjih  $a_w$  vrednostih kot prokarionti in preživijo tudi pri velikih nihanjih v slanosti ter temperaturah, pri zelo nizkih temperaturah okolja, velikem UV-sevanju in slab preskrbljenosti s hranili (Gunde - Cimerman in sod., 2005).

Leta 2001 je Gunde - Cimerman s sodelavci iz morske vode, morskega in ledeniškega ledu s seleksijskimi metodami, ki so temeljile na uporabi gojišč z nizkimi  $a_w$ , izolirala številne glice. Med njimi so prevladovale askomicetne in bazidiomicetne kvasovke, melanizirane glice (večinoma iz rodov *Cladosporium* in *Aureobasidium*) ter nemelanizirane nitaste glice, predvsem iz rodu *Penicillium* (Gunde - Cimerman in sod., 2003).

Mnoge filamentozne glice in kvasovke, osamljene iz stalno hladnih okolij, so kozmopolitske vrste (Ruisi in sod., 2007).

### **2.3.1 Morski led**

Morski led je zmrznjena morska voda. Voda izoblikuje poltrden matriks, prepleten z mrežo kanalčkov in por, napolnjenih s slanico, ki se izloča ob nastajanju ledenih kristalov. Morski led je podvržen izrazitim sezonskim in vsakodnevnim spremembam, zato so morfologija ter druge lastnosti morskega ledu zelo heterogene. Je okolje, ki ga zaznamujejo izraziti gradienti v temperaturi, slanosti, prostoru in osvetljenosti. Je skrajno hladno okolje s temperaturnim nihanjem med  $-1^{\circ}\text{C}$  in vse do  $-50^{\circ}\text{C}$  v zimskem obdobju. Mikroorganizmi, ki jih najdemo v tem okolju, so razvili visoko toleranco do nizkih temperatur, izsuševanja in nihanja v slanosti okolja. Ob zamrzovanju lahko vsebnost soli naraste na 200 g/l, ob taljenju pa pade na 10 g/l (Gunde - Cimerman in sod., 2005; Thomas in Dieckmann, 2002).

Iz morskega ledu so do sedaj izolirali viruse, bakterije, alge, glive, praživali, ploske črve in male rakce (Thomas in Dieckmann, 2002).

### **2.3.2 Ledeniški led in subledeniško okolje**

Ledeniški led nastane z rekristalizacijo snega. V snegu je le 10 % tekoče vode, drugi del predstavlja zrak in delci zemlje ter rastlinja, na katerih najdemo tudi mikroorganizme. Pod pritiskom zgornjih plasti na novo zapadlega snega se oblikuje sren ali firn, ki je vmesno stanje med snegom in ledeniškim ledom. V takem granuliranem snegu je 50 % tekoče vode. Nadalje je sren stisnjен v ledeniški led, kjer je 90 % vode. Tak proces v polarnih regijah zahteva 100 let, odvisno od količin zapadlega snega (Ma in sod., 2005).

Ledeniški led ima določen temperaturni profil. Temperatura ledeniškega ledu na Antarktiki se spreminja od površinskih plasti, ki so v stiku z zrakom in tako pod vplivom temperature zraka, do globljih plasti, ki so v stiku s podlagom ter pod vplivom geotermalnega segrevanja, zato so temperature globlje višje. Pri ledu debeline 1,5 km so tipične vrednosti od  $-22^{\circ}\text{C}$  do  $-6^{\circ}\text{C}$  (Law Dome, vzhodna Antarktika), pri debelini 3,6 km pa od  $-50^{\circ}\text{C}$  do  $-3^{\circ}\text{C}$  (Vostok, osrednja Antarktika) (Nichols, 2005).

Ledeniški led je ledeno mrzlo, a stabilno okolje. Mikroorganizme in njihove spore ščiti pred UV-sevanjem, zato je manj poškodb DNA. Mikroorganizmi, ki so v led ujeti celo za tisoče let, se sprostijo ob taljenju ledenikov ali ob lomljenu ledenih gor v ocean. Vetrovi, ki so posledica kroženja zračnih mas nad poloma, prenašajo mikroorganizme iz zmernih in tropskih predelov v skrajno hladna območja. Ti se ujamejo na cvetni prah, prašne delce ali kristalčke padavin. Ledeniški led tako predstavlja vir raznolikih organizmov (Gunde - Cimerman in sod., 2005).

Za ledeniški led je do nedavnega veljalo, da je mirujoč in zelo stabilen sistem. Zadnje raziskave pa so pokazale, da so ledeniki na geomorfološkem nivoju veliko bolj dinamični, kot se je do sedaj predvidevalo. Na ležišču ledenika pride do taljenja ledu in nastajanja bazalne vode. Ta se skupaj s talno in površinsko vodo združi v subledeniško vodo, ki reagira s kamnitom podlagom ter sedimenti pod ležiščem ledenika. Zato subledeniška voda vsebuje visoke koncentracije topljencev in mineralnih sedimentov. Ko ta voda zmrzne,

nastane subledeniški led. To okolje je bilo do nedavnega poznano kot abiotiko, zadnje študije pa kažejo, da tu prevladujejo predvsem aerobne heterotrofne beta proteobakterije (Foght in sod., 2004).

### 2.3.3 Permafrost

Permafrost so tla, ki so stalno zmrznjena, tudi med ledenimi dobami, zato ostaja to okolje nespremenjeno že dolgo geološko dobo. Je okolje, za katerega so značilne stalne temperature pod ničlo, nizka koncentracija kisika, biološko nedostopna voda, popolna tema, zmrznjen substrat in visoka koncentracija soli v zelo tankih filmih tekoče vode, ki prekrivajo delce zemlje ter mikroorganizme. Je zelo stabilno okolje, saj ni prisotnih dnevnih ali sezonskih sprememb bivanjskih pogojev (Faizutdinova in sod., 2005; Vishnivetskaya in sod., 2005).

Količina tekoče vode je odvisna od temperature tal, pri  $-1,5^{\circ}\text{C}$  je tekoče vode od 5 do 6 %, pri  $-10^{\circ}\text{C}$  od 2 do 3 % in pri  $-15^{\circ}\text{C}$  od 1 do 2 % (Rivkina in sod., 2000).

Temperatura permafrosta se giblje od  $-1^{\circ}\text{C}$  do  $-12^{\circ}\text{C}$ , odvisno od geografske lege (Nichols, 2005).

Permafrost zavzema 20 % zemeljske površine (85 % Aljaske, 55 % Rusije in Kanade ter najverjetneje celotno Antarktiko). To znatno maso zmrznjene zemlje, ki je lahko debela do nekaj sto metrov, naseljujejo številne bakterije. V preteklosti so večinoma predpostavljalji, da so v permafrostu mikroorganizmi v stanju anabioze (metabolno neaktivni). Novejše raziskave so dokazale metabolno aktivnost do  $-20^{\circ}\text{C}$  (Rivkina in sod., 2000).

## 2.4 PRILAGODITVE PSIHROFILNIH IN PSIHROTOLERANTNIH ORGANIZMOV NA HLADNO OKOLJE

V biologiji pod pojmom nizke temperature navadno označujemo temperature, ki so nižje od ledišča do  $-20^{\circ}\text{C}$ . Kopenski organizmi polarnih območij morajo preživeti dolga obdobja s temperaturami okoli ledišča in dnevna obdobja zamrzovanja ter odtajevanja. Nizke temperature ne vplivajo samo na encimsko aktivnost in prepustnost membrane, temveč zavirajo razpoložljivost vodnih molekul, ki so nujne za biokemične procese. Glede na to, da mraz vpliva na celoten mikroorganizem, morajo biti vse celične sestavine od membran in transportnih sistemov do znotrajceličnih raztopin, nukleinskih kislin ter proteinov ustrezno prilagojene na ekstremne pogoje. Nujna je tudi prilagojenost osnovnih celičnih procesov metabolizma, replikacije, transkripcije in translacije. Študije prilagojenosti na mraz so pokazale, da se celice prilagodijo tako, da preprečijo manj učinkovite encimske reakcije in nižjo raven privzema raztopin, reducirajo fluidnost membran in preprečijo nastanek znotrajceličnih ledenih kristalov. Temperaturno najbolj

občutljiv proces je translacija, zato je vloga ribosomov in proteinov, ki pri tem sodelujejo, pri temperaturnem prilagajanju velika (Ruisi in sod., 2007; Cavicchioli in sod., 2002).

#### **2.4.1 Kompatibilni topljenci**

Zunajcelično zamrzovanje vodi v celično dehidracijo, hladne temperature pa zmanjšujejo absorbcojo vode. Dehidracija zaradi visoke slanosti in nizke  $a_w$  vrednosti predstavlja največji stres za organizme, ujete v led. Pri zelo nizkih temperaturah predstavlja nevarnost tudi nastajanje ledu znotraj celice. To vodi v razgradnjo celice, ker se pri tvorbi ledu poveča volumen vode v celici. Zaradi nastajanja ledu se iz vode izloča sol, zato se zunaj celice poveča slanost, visoka koncentracija soli zunaj celice pa sproži osmotski gradient čez celično membrano. Vsi ti stresi pogosto aktivirajo nastajanje stresnih proteinov, zvišano regulacijo antioksidantov in akumulacijo kompatibilnih topljencev, ki so hkrati osmoliti ter krioprotектanti (Gunde - Cimerman in sod., 2005).

V odgovoru na zvišano osmolarnost in nizko temperaturo je glicerol glavni kompatibilni topljenec pri glivah. Pri mnogih drugih organizmih, vključno z nekaterimi askomicetnimi in bazidiomicetnimi glivami, pa nastaja glicin betain. Kot krioprotektanti so zelo uspešni sladkorji, kot sta trehaloza in manitol. Vplivajo na stabilizacijo membrane. Trehaloza je na splošno najbolj razširjen disaharid pri glivah. Je pogosta v vegetativni in reproduktivni fazni, pa tudi pomembna sestavina spor (Gunde - Cimerman in sod., 2005; Ruisi in sod., 2007).

Organski topljenci za prilagajanje vodne aktivnosti znotraj celic v citoplazmi ne smejo biti inhibitorni notranjim biokemijskim procesom. Lahko se sintetizirajo znotraj celic ali pa jih organizmi prevzamejo iz okolice (Madigan in sod., 2006).

#### **2.4.2 Celična stena in citoplazemska membrana**

Debelo celična stena obdana s polisaharidi, pomaga premagati stres, ki ga prestavlja nizke temperature in posledično izguba vode. S tem so povezane nadaljnje spremembe v povečani koncentraciji topljencev v celici, zmanjšanje velikosti celice, slabitev celične membrane in fizične poškodbe celice, ki lahko nastanejo ob zamrzovanju ter odtajevanju (Gunde - Cimerman in sod., 2005).

Celična membrana je plast, s katero celica vzdržuje stik z okoljem. Vsaka sprememba celične membrane zato vpliva na njeno integriteto in stabilnost. Zelo pomembna prilagoditev na nizke temperature je vzdrževanje membranske fluidnosti. Stopnja fluidnosti membrane je odvisna od vrste maščobnih kislin, ki gradijo membranske fosfolipide. Psihrofili vsebujejo v citoplazemski membrani večji delež nenasičenih maščobnih kislin, kar pri nizkih temperaturah vzdržuje citoplazemsko membrano semifluidno. Membrane z nasičenimi maščobnimi kislinami bi postale pri nizkih temperaturah voskaste in nefunkcionalne. Obstajajo različne strategije, s katerimi mikroorganizmi vzdržujejo membrane fluidne: konverzija nasičenih maščobnih kislin v nenasičene s pomočjo desaturaz, skrajšanje acilnih verig in sinteza razvezanih maščobnih kislin. Lipidi nekaterih

psihrofilnih organizmov vsebujejo večkrat nenasičene maščobne kisline in kratke ogljikovodikove verige s številnimi dvojnimi vezmi. Na tem področju je bilo na glivah narejenih le nekaj študij. Pri psihrofilnih oziroma psihrotolerantnih glivah, kot so *Mortierella antarctica* in *Cadophora fastigiata* izolirane na Antarktiki, se pri nizkih temperaturah opazno dvigne vsebnost linolejske ter arahidonske kisline. Pri *Cryptococcus albidus*, *Cr. laurentii* in *Rhodotorula mucilaginosa* do sedaj vemo le, da pri nizkih temperaturah v membrani prevladujejo nenasičene maščobne kisline (Madigan in sod., 2006; Gunde - Cimerman in sod., 2005; Ruisi in sod., 2007; Thomas in Dieckmann, 2002).

Transport vode preko celične membrane je pomemben za halotoleranco in toleranco na zmrzovanje. Pri transportu vode in/ali majhnih molekul, kot je glicerol, so vključeni akvaporini, ki so membranski kanalski proteini s transmembranskimi domenami. Natančne fiziološke funkcije teh sistemov so še nepoznane, pri *S. cerevisiae* pa so potrdili povezavo med odpornostjo na zmrzovanje in prisotnostjo genov za akvaporine. Ker je osmotsko napajan tok vode hiter, se znotrajcelična tvorba ledenih kristalov med procesom zmrzovanja zmanjša (Gunde - Cimerman in sod., 2005).

#### **2.4.3 Encimi**

Psihofilni organizmi producirajo encime, ki optimalno delujejo v mrzlem in zelo pogosto denaturirajo ali postanejo drugače neaktivni že pri zmerno visokih temperaturah. Molekulske osnove tega procesa še niso popolnoma jasne, znano pa je, da v sekundarni zgradbi teh encimov prevladujejo  $\alpha$ -verige ( $\beta$ -ravnin je manj). V primerjavi z  $\alpha$ -verigami, ki proteinom omogočajo večjo fleksibilnost v hladnem,  $\beta$  ravnine tvorijo bolj rigidne strukture. Psihofilni encimi imajo, v primerjavi z mezofilnimi in termofilnimi, tudi več polarnih ter manj hidrofobnih aminokislinskih delov, ki vzdržujejo fleksibilnost proteinov (Madigan in sod., 2006).

#### **2.4.4 Zunajcelični polisaharidi**

Tudi sposobnost sinteze določene količine zunajceličnih polisaharidov je prilagoditev na ekstremne razmere. Glive ščiti med cikli izsuševanja, zamrzovanja in odtajanja. Mehanizem delovanja teh molekul še ni popolnoma pojasnjen, predlagajo pa, da spremenijo prepustnost za  $\text{Na}^+$  in  $\text{K}^+$  med zmrzovanjem in odtajanjem in vplivajo na viskoznost zunajcelične raztopine in tako preprečijo prekomeren stres. Zdi se tudi, da vplivajo na strukturo vode v in okoli celice in povzročijo nastanek strukture stekla med zamrzovanjem, kar do neke mere zadržuje kristalizacijo vode. Pri antarktični vrsti glive *Phoma herbarum* so opazili, da je tvorba zunajceličnih polisaharidov povezana s preprečevanjem škode, ki nastane pri ponavljanju se zmrzovanju in odtajevanju. Tudi meristematske črne glive z Antarktike okoli hif ali večceličnih konidijev pogosto tvorijo zunajcelične polimerne sestavine. Ne nazadnje – biofilm omogoči celicam razmere, ki so manj ostre od tistih v zunanjem okolju (Ruisi in sod., 2007; Selbmann in sod., 2005).

#### **2.4.5 Ostali načini prilagoditve na nizke temperature**

Meristematska rast omogoča kolonijam optimalno razmerje med površino in volumnom, zato je to tudi eden od dejavnikov, ki omogočajo preživetje v različnih stresnih okoljih (visoka/nizka temperatura, suša, kislota, pomanjkanje hrani, visoko UV-sevanje ali visoka slanost) (Selbmann in sod., 2005).

Pri glivah, ki uspevajo v skrajno hladnih okoljih, se večinoma pojavlja anamorfna – nespolna oblika. Opustitev spolnega razmnoževanja omogoča krajsi življenjski cikel brez prevelikih metabolnih izgub (Ruisi in sod., 2007).

### **2.5 PRILAGODITVE PSIHROFILNIH IN PSIHROTOLERANTNIH ORGANIZMOV NA DRUGE STRESNE DEJAVNIKE**

#### **2.5.1 Pomanjkanje hrani**

Ena izmed prilagoditev na skrajnostna okolja in pomanjkanje hrani je tvorba raznolikih ekstracelularnih encimov. Glive so vključene v biološko razgradnjo številnih substratov in spojin (Gopinath in sod., 2005).

V živilski industriji je dobrodošlo, da so postopki obdelave izvedeni v blagih temperturnih pogojih, ki kar najmanj vplivajo na okus in hrnilno vrednost. Zato so iskani encimi, ki delujejo pri nizkih temperaturah (Brizzio in sod., 2007).

V primerjavi z bakterijami in ostalimi glivami, kvasovk ne smatramo kot bogate vire industrijsko pomembnih encimov (Brizzio in sod., 2007).

Leta 2007 je Brizzio s sodelavci izvedla študijo ekstracelularne encimatske aktivnosti (EEA) pri izolatih bazidiomicetnih kvasovk iz ledenomrzlih okolij Patagonije (Argentina). Kot substrate so uporabili škrob, pektin, celulozo, hitin, tributirin, polioksietilen-sorbitan-monooleate in proteine iz posnetega mleka. Pokazalo se je, da ima več kot 15 % sevov pri 4 °C vsaj tri EEA in več kot 63 % sevov vsaj dve EEA pri isti temperaturi. Niso zasledili hitinolitične ali celulolitične aktivnosti (Brizzio in sod., 2007).

Tako tvorjenje kot aktivnost encimov sta odvisna od pH (Hankin in sod., 1975).

Analize na trdnem gojišču so lahko semikvantitativne, če merimo premer nastalih con in ta premer primerjamo s premerom kolonije (Hankin in sod., 1975).

#### **2.5.1 Pomanjkanje železa**

Sideroforji (iz grščine: »prenašalci železa«) so kelatne spojine z nizko molekulsko težo, ki imajo specifično in visoko afiniteto za ione železa. Značilni so za bakterije in glive, ki se znajdejo v stresnih okoliščinah pomanjkanja železa. Še posebej so pomembni v morskih okoljih, kjer je topnost železa nizka. Zaradi aerobne atmosfere postane železo na površini slabno topno, ker oksidira v oksihidroksidne polimere. Zato je koncentracija prostega železa

pri nevtralnem pH odvisna od konstante topnostnega produkta železovega hidroksida. Mikroorganizmi, ki rastejo v aerobnem okolju, potrebujejo železo za številne esencialne celične funkcije, tudi za redukcijo kisika pri sintezi ATP (adenin trifosfat), redukcijo prekurzorjev za DNA in tvorjenje hema. Te razmere so mikroorganizme prisilile v izdelavo molekule, ki učinkovito tekmuje s hidroksilnim ionom za železov ion, ga prevzame iz okolja in ga naredi razpoložljivega za mikrobeno celico. Za razliko od večine drugih esencialnih kovinskih ionov, mora železo pred vstopom v celico postati topno z vezavo na siderofor in šele nato sledi vstop v celico preko za sideroforje specifičnega transportnega sistema. Študije so pokazale, da razen striktno anaerobnih bakterij in nekaterih kvasovk, kot so *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* in *Cryptococcus neoformans*, vsi proizvajajo vsaj en siderofor. V glivnih celicah so sideroforji vključeni pri virulenci, odpornosti na oksidativnem stresu, spolni in nespolni razvoj, skladiščenje železa, varujejo pri toksičnosti zaradi železa ter sodelujejo pri nekaterih interakcijah z gostiteljem. Sideroforji so pomembni tudi v medicinski industriji, kmetijstvu in okoljskih znanostih. Kvasovke so sposobne izkoriščati sideroforje, ki jih proizvajajo drugi mikroorganizmi (Neilands, 1995; Wang in sod., 2009; Winkelmann, 2007).

Večino sideroforjev uvrščamo v dve skupini: med hidroksimate ali catehole. Kvasovke proizvajajo samo hidroksamatne sideroforje, medtem ko bakterije izdelujejo sideroforje obeh vrst. Hidroksamatni sideroforji nastanejo iz ornitina in jih po strukturi razdelimo v štiri družine: fuzarini, koprogeni, ferikromi in rodotorulna kislina (Calvente in sod., 2001; Wang in sod., 2009).

Poznamo veliko različnih tehnik za detekcijo tvorbe sideroforjev. Analize so lahko nespecifične ali pa temeljijo na kemičnih in bioloških lastnostih sideroforjev. Najpogostejsa nespecifična metoda je krom azurol sulfonatna analiza. Lahko je izvedena na trdnem gojišču ali v raztopini, a le v raztopini lahko tvorjenje tudi kvantitativno ovrednotimo. Temelji na kompeticiji za železo med indikatorjem in kelatorjem oziroma sideroforjem, ki ga proizvaja mikroorganizem. Ob vezavi železovega iona na siderofor pride do barvne spremembe, ki pa je mogoča le, če je raztopini dodan detergent krom azurol sulfonat, ki omogoča intenzivno modro obarvanje kompleksa železov ion-indikator. Ob vezavi na siderofor pride do razbarvanja. Ta analiza je odvisna le od sposobnosti molekule, da veže železo, o strukturi ne izvemo ničesar. Druge analize, kot je perkloratna, pa temeljijo na kemičnih lastnostih sideroforjev. Za detekcijo hidroksamatnih sideroforjev lahko uporabimo perkloratno analizo, saj so ti sideroforji stabilni pri nizkem pH (oranžno rdeče barve), medtem ko so železovi cateholi stabilni pri nevtralnem pH (rdeče vijolične barve), pri kislem pH pa se železo odcepi in obarvanost izgine. Metodo lahko izvedemo tudi na trdnem gojišču, vendar ne omogoča kvantifikacije. Večina analiz za detekcijo sideroforjev se izvaja v supernatantu, zato je treba celice odstraniti s centrifugiranjem in analizirati supernatant. Kvantitativne analize so navadno spektrofotometrične (Calvente in sod., 2001; Neilands, 1995).

Pri nekaterih vrstah kvasovk lahko zasledimo sideroforje šele v drugi ali tretji zaporedni seriji kultivacije kulture. Tvorba sideroforjev je večja pri optimalni temperaturi rasti (Atkin in sod., 1970).

### 2.5.2 Osmotski stres

Slanost, voda in mraz so popolnoma različni stresni dejavniki, pa vendar aktivirajo nekatere skupne odgovore. Slanost povzroči tako ionski kot osmotski stres, suša in mraz pa osmotski ter oksidativni stres (Gunde - Cimerman in sod., 2005).

Visoka slanost povzroča iste učinke kot zmrzovanje – nastane osmotsko neravnotežje. Mikroorganizmi, ki so prilagojeni na t. i. matrični vodni stres, ki je posledica suše ali vezave vode v led, uspešno premagujejo tudi osmotski stres. Zamrzovanje vodi v dehidracijo celic zaradi pomanjkanja biološko razpoložljive vode. Prav tako deluje osmotsko neravnovesje. V obeh primerih gre za znižanje vodne aktivnosti v okolju celice. To kaže na podobnost v obrambnih mehanizmih psihrofilnih in halofilnih mikroorganizmov (Ruisi in sod., 2007; Gunde - Cimerman in sod., 2005).

V pogojih sušenja in nizke razpoložljivosti vode mikroorganizmi proizvajajo tako zunaj- kot znotrajcelične sestavine. Nekatere antarktične in ne-antarktične vrste gliv se zavarujejo pred izsušitvijo s proizvajanjem zunajceličnih polisaharidov. Celica tudi kopiči znotrajcelične osmoregulatorje nizkih molekularnih tež, ki pripadajo različnim vrstam spojin – polioli in melanin, mikosporini, sladkorji ter njihovi derivati, kot so glicerol, arabitol, manitol in trehaloza (Ruisi in sod., 2007).

Spremembe v strukturi in lastnostih membrane so pomemben dejavnik prilagoditve na visoke koncentracije soli. Membranski lipidi so pomembni pri kontroli fluidnosti membrane. Visoke koncentracije soli povzročijo spremembe v sestavi membranskih lipidov, zato halotoleranco povezujemo z značilno sestavo membrane. Na membransko fluidnost vplivajo vrsta verig maščobnih kislin (dolžina in nenasičenost), količina sterolov ter narava skupin polarnih fosfolipidnih glav (Turk in sod., 2004).

Preživetje osmotskega stresa zahteva vzpostavitev osmotskega ravnotežja med zunanjostjo in notranjostjo celice. Kot odgovor na spremembo zunanjega osmotskega pritiska, celica kopiči osmolite – anorganske ione in organske topljence (kot so prolin, manitol in glicin betain), ki jih sintetizira sama ali jih prevzame iz okolice. Pri algah, izoliranih iz morskega ledu, so odkrili zanimiv osmolit in krioprotektant dimetilsulfoniopropionat (DMSO) (Thomas in Dieckmann, 2002).

### 2.5.3 Visoko UV-sevanje

Sončno sevanje je nujno potrebno, vendar predstavlja tudi stresni dejavnik. Vse od osemdesetih let prejšnjega stoletja se predvsem zaradi vpliva človeka tanjša stratosferična ozonska plast. Posledično se je povečala stopnja sončnega UVB-sevanja, ki doseže Zemljo. Izpostavljenost UV-žarkom povzroča poškodbe DNA, proteinov, celičnih membran in

organelov ter vpliva na celoten ekosistem in biološko evolucijo. Kopenski organizmi, ki so izpostavljeni UV-sevanju, tvorijo različne pigmente kot zaščito pred poškodbami predvsem z UVB-žarki. Ti pigmenti so v notranjosti celice ali njeni zunanjosti in tako ščitijo življenjsko pomembne molekule (Ruisi in sod., 2007).

#### **2.5.4 Pomanjanje vode**

Polarna območja so tudi izjemno suha področja. Padavin je izjemno malo in še te so v obliki snega. Poleg tega dodatno izsuševanje povzročajo vetrovi. Organizme, ki so sposobni uspevati na območjih, kjer je prisotno malo tekoče vode, imenujemo kserotolerantni organizmi. Kserofilne pa tiste, ki bolje uspevajo v okoljih, kjer je na voljo malo vode (Ruisi in sod., 2007).

### **2.6 KVASOVKE**

#### **2.6.1 Uvrstitev**

Kvasovke kot skupino mnogi velikokrat neposredno povezujejo s procesi vrenja pri proizvodnji kruha in piva ter tako kvasovke napačno označijo kot fermentativne askomicete podobne *Saccharomyces cerevisiae*. Mnogi celo enačijo »kvasovko« s »*Saccharomyces*«. Pravilno je kvasovke definirati kot glive, ki se nespolno razmnožujejo z brstenjem ali cepljenjem. Pripadajo dvem glavnim taksonom, in sicer Ascomycotina in Basidiomycotina (Kurtzman in sod., 2011c).

#### **2.6.2 Značilnosti**

Kvasovke so tiste glive, ki se nespolno praviloma množijo z brstenjem oziroma nekatere s cepljenjem ter spolnega stadija ne tvorijo v obliki plodišč. Nespolen način razmnoževanja lahko v ustreznih razmerah poteka nekaj ali več generacij. Kvasovko, ki se razmnožuje nespolno, imenujemo anamorf. V določenih okoljskih razmerah pa nekatere kvasovke preidejo v spolno fazo življenjskega cikla in tvorijo spolne spore. Kvasovko v tem stadiju imenujemo teleomorf. Spolne spore v ugodnih pogojih kalijo v brsteče vegetativne celice (Kurtzman in sod., 2011c; Fugelsang in Edwards, 2007).

V glavnem so kvasovke poznane kot enocelični organizmi, izjemoma pa nekatere vrste lahko razvijejo hife in psevdohife. Njihovo oblikovanje je še posebej stimulirano ob pomanjanju kisika (Raspor, 1996).

Askomicetne oziroma zaprtotrosne kvasovke proizvajajo spolne spore, ki se imenujejo askospore, nastajajo pa v sporangijih, imenovanih aski. Bazidiomicetne glive (odprtotrosnice) proizvajajo spolne spore, ki jih imenujemo bazidiospore in nastajajo na trosnih podstavkih, imenovanih bazidiji (Likar, 1987).

Askospore so bogate v svoji različnosti spor in askusov, medtem ko so bazidiospore bazidiomicetnih kvasovk v glavnem enostavnih oblik in poženejo iz odebelenih teleospor ali direktno iz hife (Raspor, 1996).

V aerobnih razmerah kvasovke asimilirajo številne sladkorje, medtem ko imajo v anaerobnih razmerah sposobnost fermentacije samo nekatere vrste. Nekatere izjeme med kvasovkami so lahko patogene (Raspor, 1996).

### 2.6.3 Taksonomija

V preteklosti je klasifikacija kvasovk temeljila predvsem na njihovih morfoloških, fizioloških in biokemijskih značilnostih. V zadnjih 30 letih pa so klasične pristope dopolnile novejše tehnike: kemotaksonomske in molekularne metode, ki omogočajo naravnejšo ter zanesljivejšo identifikacijo posameznih vrst. Te metode so odkrile heterogenost znotraj vrst, ki so bile prvotno opisane le na podlagi testov fermentacije in sposobnosti asimilacije različnih virov ogljika ter dušika. Kljub temu pa so določene fiziološke in mikromorfološke značilnosti še vedno pomembne za identifikacijo. S potrditvijo identifikacije z molekularnimi metodami so lahko značilne fenotipske lastnosti uporabne pri karakterizaciji novih taksonov. Posamezne metode v taksonomiji niso vedno splošno uporabne, ampak so specifične za določeno taksonomsко skupino in se razlikujejo tudi na posameznih ravneh taksonov (razred, red, družina, rod, vrsta, podvrsta) (Kurtzman in sod., 2011c; Zalar in Gunde - Cimerman, 2002).

Podrobneje so opisani le sklopi metod, ki so neposredno vključeni tudi v moje diplomsko delo.

#### 2.6.3.1 Morfološka karakterizacija

Morfološka karakterizacija zajema več stopenj in se osredotoča na opis rasti na trdnem gojišču, morfologijo nespolnih celic, spolno razmnoževanje, izolacijo paritvenega tipa in opazovanje celičnega jedra (Kurtzman in sod., 2011a).

#### 2.6.3.2 Fiziološki in biokemijski testi

Fiziološki testi, ki se navadno uporabljam za identifikacijo, so: fermentacija sedmih ali osmih sladkorjev, rast na različnih ogljikovih in dušikovih virih, določitev potreb po vitaminih, rast pri različnih temperaturah, rast na mediju z visoko vsebnostjo sladkorjev ali natrijevega klorida, testiranje sposobnosti hidrolize uree ter odpornost proti antibiotikom (Kurtzman in sod., 2011a).

#### Fermentacija ogljikovih hidratov

Če kvasovka lahko fermentira določen ogljikov hidrat, lahko na njem tudi raste. Obratno pa vedno ne velja, saj lahko mnoge kvasovke aerobno rastejo na ogljikovem hidratu, vendar ga niso sposobne fermentirati. Sposobnost kvasovk, da fermentirajo sladkor, zasledujemo z nastanjem ogljikovega dioksida. Za rutinsko ugotavljanje sposobnosti fermentacije ogljikovih hidratov se za najprimernejšega izkaže test v Durchamovi cevki z 2

% raztopino sladkorja. Navadno se za rutinsko identifikacijo uporablja D-glukoza, D-galaktoza, saharoza, maltoza, lakoza, rafinoza in  $\alpha$ - $\alpha$ -trehaloza (Kurtzman in sod., 2011a).

#### Asimilacija različnih virov ogljika

Testira se sposobnost aerobne rasti na določenem viru ogljika kot edinem viru energije. Test lahko izvedemo v tekočem ali na trdnem gojišču. Za opis vrste testiramo sposobnost fermentacije 36 različnih ogljikovih spojin.

- viri ogljika na osnovi heksoz: glukoza, inulin, saharoza, rafinoza, melibioza, galaktoza, lakoza, trehaloza, maltoza, melezitoza, metil- $\alpha$ -D-glukozid, topen škrob, celobioza, salicin, L-sorboza;
- metil-pentoza: L-ramnoza;
- pentoze: D-ksiloza, L-arabinosa, D-arabinosa, D-riboza;
- alkoholi: metanol, etanol, glicerol, eritritol, ribitol, galaktikol, D-manitol, D-sorbitol, *mio*-inozitol;
- kisline: DL-laktat, sukcinat, citrat, D-glukonat, glukonolakton;
- amini: D-glukozamin, N-acetyl-D-glukozamin.

Za razlikovanje med nekaterimi vrstami so lahko specifično dodani še: 2-keto-D-glukonat, 5-keto-D-glukonat, saharat, arbutin, D-glukuronat, ksilitol in L-arabinitol (Sampaio, 1999; Fonseca, 1992; Kurtzman in sod., 2011a).

#### Asimilacija različnih virov dušika

Kvasovke so sposobne izrabljati širok spekter virov dušika. Najpogosteje se testira sposobnost asimilacije nitrata, nitrita, etilamin hidroklorida, kadaverin dihidroklorida, L-lizina, imidazola, glukozamina, kreatina in kreatinina. Metoda je enaka kot pri ugotavljanju sposobnosti asimilacije različnih virov ogljika. Kvasovke, ki so sposobne rasti na nitratu, lahko rastejo tudi na nitritu, obratno ne velja vedno (Kurtzman in sod., 2011a).

#### Drugi rastni testi

Rast na gojišču brez dodanih vitaminov in ugotavljanje potrebe po določenih vitaminih, rast na gojišču z visokim osmotskim pritiskom, rast pri 37 °C in drugih temperaturah, hidroliza arbutina, nastajanje kisline iz glukoze, tvorba ekstracelularnega škroba, hidroliza uree, lipazna aktivnost, odpornost proti cikloheksimidu, rast na gojišču z 1 % ocetno kislino, utekočinjenje želatine, Diazonium blue B barvni test, gojišče kanavanin-glicin-bromtimol modro za identifikacijo *Filobasidiella neoformans* in sestrške vrste, sinteza melanina na L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) gojišču ter rast na TTC (2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium klorid) gojišču.

Pri identifikaciji kvasovk imata dva testa poseben pomen. Diazonium blue B barvni test je biokemijski test za razlikovanje med askomicetnimi in bazidiomicetnimi kvasovkami. Vsi sevi bazidiomicetnih kvasovk dajejo temno rdečo barvo po politju z reagentom DBB. To obarvanje ni značilno za askomicetne kvasovke. Mehanizem reakcije še ni poznan.

Pomemben je tudi test hidrolize uree. Ureazna aktivnost je značilna za bazidiomicetne kvasovke (Kurtzman in sod., 2011a).

### 2.6.3.3 Molekularne metode

#### Določanje vsebnosti G+C

Vsebnost G+C predstavlja vsebnost gvanina in citozina v molekulah DNA; A+T pa vsebost adenina in timina. Razmerje (G+C): (A+T) je karakteristično. Askomicetne kvasovke imajo to razmerje 25–50 mol%, bazidiomicetne pa precej više: 50–70 mol%. Študije predlagajo, da seva, ki se v tem razmerju razlikujeta za 1–2 %, pripadata različnima vrstama. Čeprav je ta metoda uporabna, so zaradi razvoja v taksonomiji in sistematiki priporočene metode, ki kvantitativno ocenijo podobnosti genomov (Kurtzman in sod., 2011b).

#### Jedrna DNA/DNA reasociacija

Omogoča ocenitev podobnosti celotnih genomov dveh organizmov s tem, da ugotavljamo obseg parjenja nukleotidnih zaporedij enoverižnih DNA, ko z določenimi pogoji omogočimo nastanek dvoeverižne DNA. Obstajata dve osnovni metodi. Pri prvi sta oba para DNA prosta v puferki raztopini, pri drugem načinu pa je ena DNA (enoverižna) prilepljena na matriksu (nitrocelulozna membrana ipd.), druga pa ostaja prosta v raztopini. Analize v prosti raztopini lahko opravimo spekrofotometrično ali z uporabo radioaktivnih izotopov. Pri spekrofotometričnih metodah dvoeverižno DNA segrevamo. Absorbanca ( $A_{260}$ ) je v točki taljenja ( $T_m$ ) DNA največja. Reasociacija DNA optimalno poteka pri temperaturi, ki je za 25 °C nižja od temperature taljenja ( $T_m - 25$  °C). Ko dvoeverižno DNA ločimo, temperaturo ustrezno znižamo in ugotavljamo reasociacijo z merjenjem padajoče  $A_{260}$ . Na tak način analiziramo slepi vzorec brez DNA, vzorec z DNA obeh preučevanih organizmov in vsako od DNA posebej. Reakcija je koncentracijsko pogojena. Če obe DNA pripadata isti vrsti, bo reasociacija potekla enako hitro kot pri vzorcu, ki je vseboval samo DNA enega organizma. Če gre za dva nesorodna organizma, bo reasociacija potekala dvakrat daljše, ker vsaka DNA reagira neodvisno od druge.

V primeru, da kot označevalce uporabimo izotope, reasociirano DNA izoliramo na matriks, ki veže dvoeverižno DNA. Uporabimo na primer hidroksiapatit. Obseg reasociacije določimo z merjenjem radioaktivnosti.

Rezultate meritev komplementarnosti DNA navadno izražamo v odstotkih sorodnosti. Eksperimentalni pogoji lahko močno vplivajo na potek reasociacije. Če pa analizo izvedemo v optimalnih pogojih, dajejo različne metode merjenja DNA sorodnosti iste rezultate. Odstotek sorodnosti DNA daje oceno sorodnosti celotnega genoma in ne zasledi razlike v posameznih genih (Kurtzman in sod., 2011b).

Predlagajo, da imata organizma, ki kažejo več kot 80 % podobnost v zaporedju DNA in imata podoben fenotip, pripadata isti vrsti (Kurtzman in sod., 2011b).

#### Primerjava genskih zaporedij

Primerjamo ribosomske rRNA gene ali druge neribosomske gene. Tehnike primerjave zaporedij so uporabne tako pri bolj sorodnih organizmih kot tudi pri sorodstveno bolj oddaljenih taksonih. Pri tem nastaja baza, ki se dopolnjuje in je na voljo za nadaljnjo uporabo.

Najprej so potekale študije variabilne domene 2 (D2) velike podenote ribosomske RNA (LSU rRNA), ki se izkaže uporabna za tesno sorodne organizme. Nadalje nastaja informacijska baza podatkov o domenah 1 in 2 (D1/D2) za vse opisane askomicetne kvasovke, ki je uporabna za hitro diagnosticiranje vrst. Ta baza je nadgrajena tudi za bazidiomicetne kvasovke. V splošnem velja, da se istovrstni sevi ne razlikujejo za več kot 3 nukleotide v 500–600 dolgem nukleotidnem zaporedju domene D1/D2. Razlika v 6 ali več nukleotidih (1 %) pa že kaže na to, da sta seva različnih vrst. Za oba primera obstajajo izjeme.

Notranja transkripcijska vmesnika rRNA 1 in 2 sta ločena z 5.8S rRNA genom in sta locirana med SSU ter LSU rRNA geni. Ta t. i. zaporedja ITS so večkrat uporabna pri ločevanju vrst.

Za identifikacijo ozko sorodnih vrst se od rRNA regij najbolje izkažejo medgenski vmesniki IGS. Sestavljeni so iz dveh regij: IGS1 in IGS2, ki sta pogosto ločeni s 5S rRNA genom. Značilnost IGS je različnost v dolžini polimorfizmov. Regije IGS vsebujejo veliko serij večkratnih ponovitev s številnimi delečijami in insercijami, ki so specifične ter zato pomembne pri identifikaciji.

Ribosomi imajo skupno evolucijsko zgodovino. Prednost uporabe ribosomskih zaporedij pri identifikaciji pa so tudi visoko ohranjene regije med variabilnimi regijami, ki služijo kot oligonukleotidni začetniki pri verižni reakciji s polimerazo (PCR) in določanju nukleotidnega zaporedja. Geni, ki kodirajo proteine pa so nagnjeni k temu, da so v celoti variabilni, zato je izdelava oligonukleotidnih začetnikov težja. Vseeno pa imamo nekaj proteinskih zaporedij, ki so uporabna. To so zaporedja za aktin, ki imajo večje število substitucij, zato lažje prepoznamo ozko sorodne vrste. Pa tudi gena za transkripcijski elongacijski faktor 1 $\alpha$  in citokrom oksidazo II (COX II) (Kurtzman in sod., 2011b).

#### Multigenske filogenetske analize

Pri prepoznavanju ali sevi pripadajo isti ali različnim vrstam, predstavljajo težave nepojasnjeni polimorfizmi v zaporedju in razlike v vrednostih nukleotidnih zamenjav. Multigenske analize nam pomagajo te spremembe zaznati, saj se odražajo v neskladju genetskega drevesa.

MLST (angl. multilocus sequence typing) je pomembna metoda za študije genetskih struktur številnih vrst kvasovk, še posebej iz rodu *Candida*, pa tudi za *Saccharomyces*

*cerevisiae* in *Cryptococcus neoformans*. Sekvenčna analiza navadno temelji na hišnih genih, podatki pa so skladiščeni v elektronskih bazah (Kurtzman in sod., 2011b).

**Hitre molekularne metode za identifikacijo vrst in kvantifikacijo**

Te metode za identifikacijo vrst vključujejo uporabo vrstnoznačilnih oligonukleotidnih začetnikov in sond ter tehnik: RAPD (angl. randomly amplified polymorphic DNA), AFLP (angl. amplified fragment lenght polymorphisms), RFLP (angl. restriction fragment lenght polymorphisms) ter kariotipizacija (Kurtzman in sod., 2011b).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 KEMIKALIJE IN REAGENTI

Preglednica 1: Uporabljene kemikalije in reagenti

Kemikalija/reagent	Proizvajalec in poreklo
10 x PCR Dream Taq pufer brez MgCl <sub>2</sub>	Fermentas, Life Sciences, Litva
100bp DNA Ladder Plus	Fermentas, Life Sciences, Litva
Agar (tehnični)	Biolife, Milan, Italija
Agar (ultra pure)	Merck, Darmstadt, Nemčija
Agaroza	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
Amonijev sulfat	Merck, Darmstadt, Nemčija
Arbutin	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
Borova kislina	Calbiochem, San Diego, ZDA
CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, Nemčija
Celobioza	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
Cikloheksimid	Applichem, Gatersleben, Nemčija
Cinkov sulfat	Merck, Darmstadt, Nemčija
Citronska kislina	Merck, Darmstadt, Nemčija
CTAB	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
D-arabinoza	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
FeCl <sub>3</sub> -HClO <sub>4</sub>	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
D-galaktoza	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
D-sorbitol	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
D-glukonat	Merck, Darmstadt, Nemčija
D-glukuronat	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
D-glukoza	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
D-glukozamin	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
Diazonium blue B sol	Merck, Darmstadt, Nemčija
D-ksiloza	Merck, Darmstadt, Nemčija
D-manitol	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
dNTP	Fermentas, Life Sciences, Litva
Dream Taq polimeraza (5U/μl)	Applied Biosystems, Foster City, California, ZDA
D-riboza	Acros Organic, Geel, Belgija
D-vinska kislina	Applichem, Gatersleben, Nemčija
EDTA	Applichem, Gatersleben, Nemčija
Ekstrakt krompirja	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
Etanol	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija
Etilamin	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
Fenol	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija
Fenol rdeče	Acros Organic, Geel, Belgija
Ferulična kislina	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
Galaktarat (mucic acid)	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
Galaktitol	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
Glicerol	Calbiochem, San Diego, ZDA

Se nadaljuje

## Nadaljevanje

Preglednica 1: Uporabljene kemikalije in reagenti

Kemikalija/reagent	Proizvajalec in poreklo
Glukono- $\delta$ -lakton	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
Hranilo brez dodanih vitaminov	Formedium, Norfolk, Velika Britanija
India ink	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, ZDA
Inulin	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
Jod	Riedel deHaen, Seelze, Nemčija
Kadaverin	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
Kalijev jodid	Riedel deHaen, Seelze, Nemčija
Karboksimetyl celuloza	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
Katehol	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija
Kalijev dihidrogen fosfat	Riedel deHaen, Seelze, Nemčija
Kisli fuksin	Acros Organic, Geel, Belgija
Kongo rdeče	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
Kreatin	Merck, Darmstadt, Nemčija
Kreatinin	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
Ksilitol	Calbiochem, San Diego, ZDA
Kvasni ekstrakt	Biolife, Milan, Italija
Laktoza	Merck, Darmstadt, Nemčija
L-arabinoza	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
L-lizin	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
L-malat	Noack (Megazyme), Dunaj, Avstrija
L-ramnoza	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
L-sorboza	Carlo Erba, Rodano, Italija
L-vinska kislina	Applichem, Gatersleben, Nemčija
Magnezijev klorid	Merck, Darmstadt, Nemčija
Malezitoza	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
Maltoza	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
Melibioza	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
Magnezijev sulfat	Applichem, Gatersleben, Nemčija
<i>m</i> -hidroksibenzojska kislina	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
<i>m</i> -vinska kislina	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
<i>mio</i> -inozitol	Merck, Darmstadt, Nemčija
Natrijev klorid	Merck, Darmstadt, Nemčija
Nitrat	Riedel deHaen, Seelze, Nemčija
Nitrit	Merck, Darmstadt, Nemčija
Osnovno dušično hranilo (angl. Yeast Nitrogen Base)	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
Osnovno ogljikovo hranilo (angl. Yeast Carbon Base)	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
Pepton	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
<i>p</i> -hidroksibenzojska kislina	Merck, Darmstadt, Nemčija
$\text{PO}_4\text{HK}_2$	Riedel deHaen, Seelze, Nemčija
Poli-L-lizin	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA

Se nadaljuje

## Nadaljevanje

Preglednica 1: Uporabljene kemikalije in reagenti

Kemikalija/reagent	Proizvajalec in poreklo
Posneto mleko v prahu	Mlekarna Planika, Kobarid, Slovenija
Prepman® Ultra	Applied Biosystems, Foster City, California, ZDA
Proteokatehojska kislina	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
Ribitol	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
Saharoza	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
Saharinska kislina	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
Salicilna kislina	Sigma Aldrich Chemie, Steinhein, Nemčija
Salicin	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
Sladni ekstrakt	Merck, Darmstadt, Nemčija
Sukcinat	Merck, Darmstadt, Nemčija
Syber safe	Invitrogen, Carlsbad, California, ZDA
Škrob	Merck, Darmstadt, Nemčija
Topni škrob	Riedel deHaen, Seelze, Nemčija
Tween 80	Sigma Aldrich Chemie, Steinhein, Nemčija
Urea	Merck, Darmstadt, Nemčija
Vanilna kislina	Sigma Aldrich Chemie, Steinhein, Nemčija
Veratrična kislina	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
Železov (III) klorid	Merck, Darmstadt, Nemčija
$\alpha,\alpha$ -trehaloza	Fluka Chemie AG, Buchs, Švica
$\alpha$ -metil-D-glukozid	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA

## 3.2 MATERIALI

- DNA izolirana s kitom Prepman® Ultra po postopkih proizvajalca,
- kulture na gojišču YMA (agar s kvasnim in sladnim ekstraktom).

### 3.3 LABORATORIJSKI PRIBOR

Preglednica 2: Laboratorijski pribor uporabljen pri raziskovalnem delu

<b>Laboratorijski pribor</b>	<b>Proizvajalec in poreklo</b>
Cepilne zanke	
Injekcijske brizge	
Laboratorijska steklovina	
Laboratorijske rokavice	
Nastavki za polavtomatske pipete	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Mikrocentrifugirke (1,5 ml in 2,0 ml)	Biohit, Helsinki, Finska
Mikrotitrne plošče s 96 luknjicami	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Nitrocelulozni filtri s porami 0,2 µm	Biokit, Finska
Objektna in krovna stekelca	Milipore Co, Billerica, ZDA
Papirnate brisače	Pechiney Plastic Packaging, ZDA
Parafilm	
Pincete	
Plastične petrijevke	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Polavtomatske pipete (2-20µL, 10-100µL, 100-1000µL)	Biohit, Helsinki, Finska
Polavtomatske pipete (2-20µL, 10-100µL, 100-1000µL, 1-10 ml)	Pipetman, Middleton, USA
Polavtomatske pipete (2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	
Pasteurjeve pipete	

### 3.4 NAPRAVE IN DRUGI PRIPOMOČKI

Preglednica 3: Laboratorijske naprave s proizvajalcem in državo porekla

<b>Laboratorijske naprave</b>	<b>Proizvajalec in poreklo</b>
Avtoklav A-63C	Kambič, Slovenija
Avtoklav Tuttnauer 3850 ELVC	Tuttnauer, Dusseldorf, Nemčija
Bunsenov gorilnik	TLOS, Zagreb, Hrvaska
Centrifuga	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Digestorij Variolab Mobilien W90	Waldner, Wangen, Nemčija
Digitalna kamera DP12	Olympus, Tokio, Japonska
Električni transformator za elektroforezo Consort EV202	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
Električni transformator za elektroforezo Consort E143	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
Elektroforezna banjica E33	Hoefer, San Francisco, ZDA
Elektroforezne banjice	Cleaver Scientific Ltd, Warwickshire, Velika Britanija
Inkubator Innova 42	New Brunswick Scientific, Edison, ZDA
Laminarij IBK 1V2	Iskra, Slovenija
Magnetno mešalo	HANNA Instruments, ZDA
Mikroskop Olympus BX51	Olympus, Tokio, Japonska
Mikrovalovna pečica	Gorenje, Slovenija
PCR sistem	Treviso, Italija
pH meter	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Tehtnica ET-1111,	HANNA Instruments, ZDA
Tehtnica EXSACTA 310 EB	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Tehtnica KERN	Tehtnica, Železniki, Slovenija
	Kern, Tuebingen, Nemčija

### 3.5 GOJIŠČA

Če ni navedeno drugače, so vsa gojišča sterilizirana z avtoklaviranjem na 121 °C, 15 min, pH smo umerjali pred avtoklaviranjem; za uravnavanje smo uporabili 1,0 M NaCl (natrijev klorid) in 1,0 M HCl (klorovodikova kislina).

#### 3.5.1 Identifikacijska gojišča

##### **YM (tekoče gojišče s sladnim ekstraktom)**

Kvasni ekstrakt	3 g
Sladni ekstrakt	3 g
Glukoza	10 g
Destilirana voda	do 1000 ml
pH	6,45

##### **YMA (agar s sladnim in kvasnim ekstraktom)**

Gojišču YM dodamo agar v končni koncentraciji 2 %.

##### **PDA (krompirjev dekstrozni agar)**

Ekstrakt krompirja	4 g
Glukoza	20 g
Agar	15 g
Destilirana voda	do 1000 ml

##### **MEA (agar s sladnim ekstraktom)**

Sladni ekstrakt	20 g
Pepton	1 g
Glukoza	20 g
Agar	20 g
Destilirana voda	do 1000 ml

##### **GPY (agar z glukozo, peptonom in kvasnim ekstraktom)**

Glukoza	20 g
Pepton	2,5 g
Kvasni ekstrakt	2,5 g
Agar	20 g
Destilirana voda	do 1000 ml

### 3.5.1.1 Gojišča za dokazovanje sposobnosti asimilacije različnih virov ogljika (Kurtzman in sod., 2011a; Sampaio, 1999; Fonseca, 1992)

Uporabljene ogljikove spojine lahko razdelimo v štiri skupine: aldarične kisline,<sup>2</sup> aromatske spojine,<sup>3</sup> organske spojine,<sup>4</sup> skupina, ki vsebuje etanol in metanol ter skupina z drugimi ogljikovimi spojinami.<sup>5</sup>

Priprava raztopine:

Osnovno dušično hranilo	6,70 g
Ustrezna ogljikova spojina	X <sup>6</sup> g
Destilirana voda	do 100 ml

Raztopinam aldaričnih kislin smo pH z 1,0 M NaOH naravnali na 3,8–4,0; raztopinam aromatskih spojin na pH 4,5; raztopinam organskih kislin pa na pH 5,6.

Raztopine steriliziramo s filtracijo in hranimo v hladilniku.

Epruvete s testnim gojiščem pripravimo tako, da aseptično odpipetiramo 0,5 ml raztopine in 4,5 ml sterilne vode. Za negativno kontrolo uporabimo osnovno dušično hranilo, ki ne vsebuje dodanih ogljikovih spojin; pozitivno kontrolo predstavlja raztopina z glukozo. Testni medij inokuliramo s suspenzijo mladih kvasnih celic (0,1 ml) in inkubiramo pri temperaturi, pri kateri določen sev najbolje raste. Mi smo vse seve inkubirali na 20 °C, saj so pri tej temperaturi vsi sevi dobro rastli. Rezultate odčitamo po enem in po treh tednih s pomočjo bele kartice, na kateri so narisane tri 0,75 mm debele črte, ki so razmaknjene približno 5 mm. Pred odčitavanjem epruvete dobro premešamo.

Rezultate odčitamo kot:

- 3+, če so črte na kartici za epruveto popolnoma nevidne;
- 2+, če so črte vidne nejasno;
- 1+, če so črte razločne, vendar so robovi zamegljeni;
- negativne, če so črte razločne z jasnimi robovi.

<sup>2</sup> L-malat, L-vinska kislina, D-vinska kislina, m-vinska kislina, saharinska kislina, galaktarat (mucic acid)

<sup>3</sup> proteokatehojska kislina, vanilna kislina, ferulična kislina, veratrična kislina, p-hidroksibenzojska kislina, m-hidroksibenzojska kislina, galska kislina, salicilna kislina, gentistična kislina, katehol, fenol

<sup>4</sup> sukcinat, citrat

<sup>5</sup> D-glukoza, D-galaktoza, L-sorboza, D-riboza, D-ksiloza, L-arabinoza, D-arabinoza, L-ramnoza, sukroza, maltoza, α, α-trehaloza, α-metil-D-glukozid, celobioza, salicin, melibioza, lakoza, melezitoza, inulin, škrob, glicerol, ribitol, ksilitol, D-glucitol, D-manitol, galaktitol, myo-inozitol, glukono δ-lakton, D-glukonat, D-glukoronat

<sup>6</sup> 10,0 za XY (1–36); 4,92 za sukcinat; 9,00 za citrat; 5,34 za metanol; 3,84 za etanol; 2,50 za L-mlečno in saharinsko kislino ter galaktarat in 5,00 za L-vinsko, D-vinsko ter m-vinsko kislino

Te rezultate nato pretvorimo:

- +, pozitiven rezultat ustreza rezultatom 2+ ali 3+ po enem tednu;
- 1, zakasnjen pozitiven rezultat 2+ ali 3+, ki se razvijeta naglo, vendar šele po dveh tednih;
- s, počasno pozitiven rezultat, počasno razvijanje do 2+ ali 3+ po dveh tednih;
- w, šibko pozitiven rezultat ustreza rezultatu 1+;
- -, negativen rezultat.

### 3.5.1.2 Gojišča za dokazovanje sposobnosti asimilacije različnih virov dušika (Kurtzman in sod., 2011a; Sampaio, 1999; Fonseca, 1992)

Priprava raztopine:

Osnovno ogljikovo hranilo	11,7 g
Ustrezna dušikova spojina	X <sup>7</sup> g
Destilirana voda	do 100 ml

Raztopine steriliziramo s filtracijo in hranimo v hladilniku.

Epruvete s testnim gojiščem pripravimo tako, da aseptično odpipetiramo 0,5 ml raztopine in 4,5 ml sterilne vode. Testni medij inokuliramo s suspenzijo mladih kvasnih celic (0,1 ml) in inkubiramo pri temperaturi, pri kateri določen sev najbolje raste. Mi smo vse seve inkubirali na 20 °C, saj so pri tej temperaturi vsi sevi dobro rastli. Negativno kontrolo predstavlja osnovno ogljikovo hranilo brez dodanih dušikovih spojin.

Kvasne celice v vcepku imajo lastne zaloge dušika, ki lahko vplivajo na rezultat, zato po 3–7 dnevni inkubaciji prenesemo zanko suspenzije v epruveto z raztopino enako izhodiščni. Ovrednotimo po enakem postopku kot test asimilacije različnih virov ogljika (glej 3.5.1.1).

### 3.5.1.3 Gojišča za ugotavljanje sposobnosti fermentacije glukoze (Kurtzman in sod., 2011a)

Kvasni ekstrakt	2,0 g
Glukoza	4,0 g
Destilirana voda	do 200 ml

### 3.5.1.4 Gojišče za testiranje rasti v prisotnosti cikloheksimida (Kurtzman in sod., 2011a)

Testiramo v tekočem osnovnem dušičnem hranilu z D-glukozo. Dodamo cikloheksimid v končni koncentraciji 0,1 % in 0,01 %. Odčitavamo in vrednotimo skupaj s testi sposobnosti asimilacije ogljikovih spojin.

---

<sup>7</sup> 0,78 za nitrat ( $\text{KNO}_3$ ); 0,26 za nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ), 0,64 za etilamin (hidroklorid); 0,56 za L-lizin; 0,68 za kadaverin (dihidroklorid); 6,0 za kreatin, kreatinin in D-glukozamin.

### 3.5.1.5 Gojišče za testiranje tvorbe ekstracelularnega škroba (Kurtzman in sod., 2011a)

Glukoza	10 g
Osnovno dušično hranilo	6,7 g
Agar	15 g
Destilirana voda	do 1000 ml

Reakcija je pozitivna, če nastane modra do zelena barva, ko gojišče prelijemo z raztopino lugola.

### 3.5.1.6 Gojišče za testiranje hidrolize uree (Kurtzman in sod., 2011a)

Pepton	1 g
NaCl	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (natrijev monofosfat)	2 g
Fenol rdeče	0,012 g
Agar	20 g
20 % urea	100 ml
Destilirana voda	1000 ml
pH 6,8	

Po avtoklaviraju dodamo 20 % ureo, ki jo predhodno steriliziramo s filtracijo. Gojišča razdelimo po mikrocentrifugirkah (0,8 ml). Kulture pregledujemo dnevno v 4 dneh. Reakcija je pozitivna, če okoli kolonij nastane vijolično obarvan obroč.

### 3.5.1.7 Gojišče za testiranje hidrolize arbutina (Kurtzman in sod., 2011a)

Arbutin	0,5 g
Kvasni ekstrakt	1 g
Agar	2 g
Destilirana voda	do 100 ml

Po avtoklaviraju dodamo 2 ml sterilne 1 % raztopine železovega amonijevega citrata.

### 3.5.1.8 Gojišče za testiranje rasti v gojišču brez dodanih vitaminov (Kurtzman in sod., 2011a)

10 % založno raztopino gojišča brez dodanih vitaminov pripravimo tako, da 16,7 g osnovnega hranila brez dodanih vitaminov raztopimo v 100 ml destilirane vode, ki je rahlo segreta.

### 3.5.1.9 CBU agar - gojišče za testiranje rasti na gojišču DBB (Kurtzman in sod., 2011a)

Osnovno ogljikovo hranilo	11,7 g
Kisli fuksin	0,2 g
Agar	20 g
Destilirana voda	900 ml
Urea	100 ml

Po avtoklaviraju dodamo 20 % ureo, ki jo steriliziramo s filtracijo. Po 3 dnevni inkubaciji na CBU-agarju, prestavimo plošče na 55 °C za 16 ur. Plošče ohladimo na sobno temperaturo in na kolonije nanesemo sveže pripravljen reagent DBB (1–2 kapljici). Reakcija je pozitivna, če kolonija po 1–2 minutah razvije temno rdečo do vijolično barvo.

### **3.5.2 Gojišča za ugotavljanje tvorbe sideroforjev (Calvente in sod., 2001)**

#### **SPM**

Saharoza	25 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4 g
PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub>	3 g
Citronska kislina	1 g
MgSO <sub>4</sub>	0,08g
ZnSO <sub>4</sub>	0,002g
Destilirana voda	do 1000 ml
pH = 6,80	

#### **SPMA**

Gojišču SPM dodamo 20 g/l agarja Ultra Pure.

### **3.5.3 Gojišča za encimske teste (Brizzio in sod., 2007)**

#### **3.5.3.1 Proteazna aktivnost (hidroliza kazeina)**

Posneto mleko v prahu	10 %
Agar	2 %

Obe sestavini zatehtamo v erlenmajerico in segrevamo v mikrovalovni pečici tako dolgo, da se agar stopi in da kazein ni več v kepicah. Steriliziramo 10 min na 110 °C.

Reakcija je pozitivna, če so prisotne cone razgradnje – prosojni kolobarji okoli kolonij v sicer enakomerno motnem gojišču.

#### **3.5.3.2 Amilazna aktivnost (hidroliza škroba)**

Topni škrob	1 % (p/v)
Osnovno dušično hranilo	0,67 %
Agar	2 %

Reakcija je pozitivna, če je po dodatku raztopine Lugola (na vsako kolonijo eno kapljico) okoli kolonije viden razbarvan kolobar, plošča pa se obarva vijolično.

**3.5.3.3 Pektinazna aktivnost (hidroliza pektina): pH vrednost 5 za pektinazo in pH vrednost 7 za pektinlazio**

Pektin iz citrusov	1 %
Osnovno dušično hranilo	0,67 %
Agar	2 %

Uravnamo na ustrezен pH – 5 oziroma 7. Steriliziramo 10 min na 110 °C. Gojišče prelijemo z reagentom – 1 % CTAB (cetyltrimetilamonijev klorid). Reakcija je pozitivna, če so okoli kolonij prisotne cone zbistritve.

**3.5.3.4 Esterazna aktivnost (hidroliza Tween 80)**

Pepton	1 %
NaCl	0,5 %
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,01 %
Agar	2 %
Tween 80 (polisorbat 80)	1 % (v/v)
pH = 6,00	

Raztopimo vse sestavine gojišča razen Tweena in jih 15 min avtoklaviramo na 121 °C. Tween 80 avtoklaviramo posebej v epruveti in ga dodamo v gojišče pred razlivanjem. Reakcija je pozitivna, če okoli kolonij nastane bel obroč. Ta se pojavi zaradi precipitacije kalcijevih soli, ki se oborijo zaradi kratkih maščobnih kislin, ki se sprostijo v agar.

**3.5.3.5 Celulolitična aktivnost (hidroliza karboksimetil celuloze)**

Karboksimetil celuloza	1 %
Celobioza	0,05 %
Osnovno dušično hranilo	0,67 %
Agar	2 %

Ploščo prelijemo z reagentom 0,03 % kongo rdečim, inkubiramo 15 min, speremo z 1 M NaCl. Pozitivna reakcija je zelo svetlo rumen obroč okoli kolonij.

### 3.6 RAZTOPINE

#### **20 % raztopina uree**

Urea	20 g
Bidestilirana voda	do 100 ml

#### **Lugolova raztopina**

Jod	1 g
Kalijev jodid	2 g
Bidestilirana voda	do 300 ml

#### **Reagent DBB**

Diazonium Blue B sol	15 mg
0,25 M Tris Pufer (pH 7)	15 ml

#### **1 % raztopina železovega amonijevega citrata**

Železov amonijev citrat	1 g
Bidestilirana voda	do 100 ml

#### **1 % raztopina CTAB**

CTAB	1 g
Bidestilirana voda	do 100 ml

#### **0,03 % Kongo rdeče**

Kongo rdeče	15 mg
Bidestilirana voda	do 50 ml

#### **5 × nanašalni pufer**

Bromtimol modro	0,25 g
Ksilen cianol	0,25 g
Glicerol	30 ml
Destilirana voda	do 100 ml

### 3.7 PUFRI

#### **50 × TAE pufer**

Tris-HCl	24,2 g
Oacetna kislina	6,0 g
EDTA	1,8 g
Bidestilirana voda	do 100 ml
pH 8,00	

Uporabili smo 1 × TAE pufer, ki smo ga pripravili s 50 × redčenjem 50 × TAE pufra.

### **5 X TBE pufer**

Tris	54,0 g
Borova kislina	27,5 g
0,5 M EDTA	20 ml
Bidestilirana voda	do 1000 ml
pH 8,00	

### 3.8 GELI ZA ANALIZE DNA

#### **1 % agarozni gel**

Agaroza	0,3 g
1 × TAE	30 ml
Syber green barvilo	3 µl

#### **1,4 % agarozni gel**

Agaroza	2,1 g
0,5 × TBE	150 ml
Syber safe barvilo	15 µl

Agarozo smo s segrevanjem raztopili v pufru, pustili, da se ohladi, dodali barvilo in vse skupaj vlili v nosilec v kadico z glavničkom.

### 3.9 UPORABLJENI SEVI

Predmet preučevanja so bile kvasovke, ki so navedene v Preglednici 4. Sevi so bili leta 2003 nabrani na otočju Svalbard na Norveškem. Shranjeni so v Mikrobiološki zbirki Ex Biotehniške fakultete, Oddelka za biologijo, Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov. Zbirka deluje v sklopu infrastrukturnega centra Mycosmo, ki je član mreže infrastrukturnih centrov Univerze v Ljubljani MRIC UL.

Vzorec številka 6 je bil nabran v okolici Ny-Alesund-a, Svalbard, Norveška. Vzorci 13–15, 17–28 in 31 pa v fjordu Kongsfjorden, Svalbard, Norveška.

Preglednica 4: Sevi bazidiomicetnih kvasovk, kraji izolacije in izvedeni testi ter analize

<b>Ekološka oznaka seva</b>	<b>Oznaka Ex zbirke</b>	<b>Ekološka niša</b>	<b>Izvedeni testi, analize za posamezen sev</b>
AR8/7_6_MEA_OLJE_A_1	EXF-3989	zemlja kontaminirana z nafto (vzorec 6)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_6_MEA_OLJE_B_1	EXF-4950	zemlja kontaminirana z nafto (vzorec 6)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_13_MEA_A_5	EXF-3822	led ob robu ledenika (vzorec 13)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_13_MEA_B_3	EXF-3879	led ob robu ledenika (vzorec 13)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_13_MEAS_A_4	EXF-3659	led ob robu ledenika (vzorec 13)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_13_MEAS_A_5	EXF-3660	led ob robu ledenika (vzorec 13)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_14_MEA_B_2	EXF-3680	led tik nad vzorcem 13 (vzorec 14)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_15_MEA_A_2	EXF-3998	izcedna voda (vzorec 15)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_15_MY20_A_2	EXF-4000	izcedna voda (vzorec 15)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_15_MY20_A_3	EXF-3922	izcedna voda (vzorec 15)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_16_MEA_A_3	EXF-3748	izcedna voda (vzorec 15)	določanje nukleotidnega zaporedja, merjenje velikosti celic in kapsul, encimski testi, testiranje tvorbe sideroforjev
AR8/7_16_MEA_A_4	EXF-3749	izcedna voda (vzorec 15)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_17_MEA_A_3	EXF-3875	voda iz bistrega potoka (vzorec 17)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_17_MEA_A_4	EXF-3711	voda iz bistrega potoka (vzorec 17)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_17_MEA_A_5	EXF-3712	voda iz bistrega potoka (vzorec 17)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_17_MEAS_A_5	EXF-3831	voda iz bistrega potoka (vzorec 17)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_18_MEA_A_5	EXF-3721	voda iz bistrega potoka (vzorec 18)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_18_MY20_A_4	EXF-3727	voda iz bistrega potoka (vzorec 18)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_18_MEA_A_3	EXF-3719	voda iz bistrega potoka (vzorec 18)	določanje nukleotidnega zaporedja

Se nadaljuje

Hadalin Baša N. Reševanje taksonomskih dilem pri bazidiomicetnih kvasovkah iz arktičnih ledenikov.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije

## Nadaljevanje

Preglednica 4: Sevi bazidiomicetnih kvasovk, kraji izolacije in izvedeni testi ter analize

<b>Ekološka oznaka seva</b>	<b>Oznaka Ex zbirke</b>	<b>Ekološka niša</b>	<b>Izvedeni testi, analize za posamezen sev</b>
AR8/7_19_MEA_A_6	EXF-3894	morska voda ob obali, sredina zaliva (vzorec 19)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_19_MEA5_A_4	EXF-3983	morska voda ob obali, sredina zaliva (vzorec 19)	določanje nukleotidnega zaporedja, merjenje velikosti celic in kapsul, encimski testi
AR8/7_20_MEA_A_2	EXF-3825	subglacialni led (vzorec 20)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_20_MEA_A_3	EXF-3824	subglacialni led (vzorec 20)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_20_MEA_A_4	EXF-3823	subglacialni led (vzorec 20)	določanje nukleotidnega zaporedja, fiziološki testi, merjenje velikosti celic in kapsul, encimski testi
AR8/7_20_MEA_B_3	EXF-3812	subglacialni led (vzorec 20)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_20_SNA_B_2	EXF-3906	subglacialni led (vzorec 20)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_20_MY20_A_2	EXF-3871	subglacialni led (vzorec 20)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_20_MY20_A_3	EXF-3827	subglacialni led (vzorec 20)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_20_MY20_A_4	EXF-3873	subglacialni led (vzorec 20)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_20_MY20_B_1	EXF-3947	subglacialni led (vzorec 20)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_20_MEA5_B_3	EXF-3835	subglacialni led (vzorec 20)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_20_MEA5_C_1	EXF-3833	subglacialni led (vzorec 20)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_20_MEA5_C_2	EXF-3832	subglacialni led (vzorec 20)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_20_MEA5_C_3	EXF-3834	subglacialni led (vzorec 20)	določanje nukleotidnega zaporedja, fiziološki testi, testiranje tvorbe sideroforjev
AR8/7_20_5°C_MEA_C_4	EXF-4947	subglacialni led (vzorec 20)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_20_5°C_MEA5_B_1	EXF-4223	subglacialni led (vzorec 20)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_20_5°C_MEA5_B_2	EXF-4224	subglacialni led (vzorec 20)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_20_5°C_MEA5_B_3	EXF-4241	subglacialni led (vzorec 20)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_20_5°C_MEA5_B_6	EXF-4238	subglacialni led (vzorec 20)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_20_5°C_SNA_A_1	EXF-4237	subglacialni led (vzorec 20)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_20_5°C_SNA_A_3	EXF-4948	subglacialni led (vzorec 20)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_20_5°C_SNA_A_4	EXF-3703	subglacialni led (vzorec 20)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_21_MEA_A_3	EXF-3936	subglacialni led (vzorec 21)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_20_5°C_SNA_A_2	EXF-4242	subglacialni led (vzorec 20)	določanje nukleotidnega zaporedja

Se nadaljuje

**Nadaljevanje**

Preglednica 4: Sevi bazidiomicetnih kvasovk, kraji izolacije in izvedeni testi ter analize

<b>Ekološka oznaka seva</b>	<b>Oznaka Ex zbirke</b>	<b>Ekološka niša</b>	<b>Izvedeni testi, analize za posamezen sev</b>
AR8/7_21_MEA_D_2	EXF-3932	subglacialni led (vzorec 21)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_21_MEA_D_3	EXF-4068	subglacialni led (vzorec 21)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_21_MEA_D_4	EXF-3931	subglacialni led (vzorec 21)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_21_MEA5_A_4	EXF-3899	subglacialni led (vzorec 21)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_21_MEA5_A_5	EXF-3898	subglacialni led (vzorec 21)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_21_MEA5_A_6	EXF-4067	subglacialni led (vzorec 21)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_21_MEA5_B_4	EXF-3933	subglacialni led (vzorec 21)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_21_MEA5_C_2	EXF-4073	subglacialni led (vzorec 21)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_21_MY20_A_1	EXF-3935	subglacialni led (vzorec 21)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_21_MY20_A_3	EXF-3934	subglacialni led (vzorec 21)	določanje nukleotidnega zaporedja, fiziološki testi
AR8/7_21_MY20_A_6	EXF-3941	subglacialni led (vzorec 21)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_21_MY20_C_4	EXF-3927	subglacialni led (vzorec 21)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_21_MY20_C_5	EXF-3926	subglacialni led (vzorec 21)	določanje nukleotidnega zaporedja, merjenje velikosti celic in kapsul, encimski testi
AR8/7_21_SNA_B_2	EXF-4087	subglacialni led (vzorec 21)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_21_5°C_MY20_A_1	EXF-4226	subglacialni led (vzorec 21)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_21_5°C_MY20_A_2	EXF-4228	subglacialni led (vzorec 21)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_21_5°C_MY20_A_3	EXF-4227	subglacialni led (vzorec 21)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_21_5°C_MY20_A_5	EXF-4243	subglacialni led (vzorec 21)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_22_MEA_A_2	EXF-4003	morska voda ob ledeniku (vzorec 22)	določanje nukleotidnega zaporedja, merjenje velikosti celic in kapsul, encimski testi
AR8/7_22_MEA_A_3	EXF-4002	morska voda ob ledeniku (vzorec 22)	določanje nukleotidnega zaporedja, merjenje velikosti celic in kapsul, encimski testi
AR8/7_22_MEA5_A_2	EXF-3913	morska voda ob ledeniku (vzorec 22)	določanje nukleotidnega zaporedja, merjenje velikosti celic in kapsul, encimski testi
AR8/7_22_MY20_A_3	EXF-3909	morska voda ob ledeniku (vzorec 22)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_22_MY20_A_4	EXF-3908	morska voda ob ledeniku (vzorec 22)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_22_SNA_A_1	EXF-3988	morska voda ob ledeniku (vzorec 22)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_22_MY20_A_2	EXF-3910	morska voda ob ledeniku (vzorec 22)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_22_MEA5_A_3	EXF-3912	morska voda ob ledeniku (vzorec 22)	določanje nukleotidnega zaporedja, testiranje tvorbe sideroforjev

Se nadaljuje

Hadalin Baša N. Reševanje taksonomskih dilem pri bazidiomicetnih kvasovkah iz arktičnih ledenikov.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije

## Nadaljevanje

Preglednica 4: Sevi bazidiomicetnih kvasovk, kraji izolacije in izvedeni testi ter analize

<b>Ekološka oznaka seva</b>	<b>Oznaka Ex zbirke</b>	<b>Ekološka niša</b>	<b>Izvedeni testi, analize za posamezen sev</b>
AR8/7_23_MEA_A_2	EXF-3820	ledeniški led (vzorec 23)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_23_MEA_B_4	EXF-3880	ledeniški led (vzorec 23)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_23_MEA_B_5	EXF-3902	ledeniški led (vzorec 23)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_23_MEA_D_2	EXF-3883	ledeniški led (vzorec 23)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_23_MEA5_A_3	EXF-3881	ledeniški led (vzorec 23)	določanje nukleotidnega zaporedja, fiziološki testi, encimski testi
AR8/7_23_MEA5_B_5	EXF-4070	ledeniški led (vzorec 23)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_23_MY20_A_5	EXF-3884	ledeniški led (vzorec 23)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_24_MEA_A_3	EXF-3814	ledeniški led (vzorec 24)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_24_MEA_A_2	EXF-3815	ledeniški led (vzorec 24)	določanje nukleotidnega zaporedja, merjenje velikosti celic in kapsul, encimski testi
AR8/7_25_MEA_A_1	EXF-4026	morska voda ob ledeniku (vzorec 25)	določanje nukleotidnega zaporedja, merjenje velikosti celic in kapsul, encimski testi
AR8/7_25_MEA_A_3	EXF-4021	morska voda ob ledeniku (vzorec 25)	določanje nukleotidnega zaporedja, merjenje velikosti celic in kapsul, encimski testi
AR8/7_25_MEA_A_4	EXF-4020	morska voda ob ledeniku (vzorec 25)	določanje nukleotidnega zaporedja, testiranje tvorbe sideroforjev
AR8/7_25_MEA_A_5	EXF-4008	morska voda ob ledeniku (vzorec 25)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_25_MEA_A_7	EXF-3967	morska voda ob ledeniku (vzorec 25)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_25_MEA_B_3	EXF-3923	morska voda ob ledeniku (vzorec 25)	določanje nukleotidnega zaporedja, testiranje tvorbe sideroforjev
AR8/7_25_MEA_B_7	EXF-4071	morska voda ob ledeniku (vzorec 25)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_25_MEA_C_6	EXF-3917	morska voda ob ledeniku (vzorec 25)	določanje nukleotidnega zaporedja, fiziološki testi, merjenje velikosti celic in kapsul, encimski testi
AR8/7_25_MEA5_A_2	EXF-4015	morska voda ob ledeniku (vzorec 25)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_25_MEA5_A_4	EXF-4014	morska voda ob ledeniku (vzorec 25)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_25_MEA5_A_5	EXF-4013	morska voda ob ledeniku (vzorec 25)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_25_MEA5_A_6	EXF-4012	morska voda ob ledeniku (vzorec 25)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_25_MEA5_A_7	EXF-4011	morska voda ob ledeniku (vzorec 25)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_25_MEA_C_4	EXF-4072	morska voda ob ledeniku (vzorec 25)	določanje nukleotidnega zaporedja

Se nadaljuje

## Nadaljevanje

Preglednica 4: Sevi bazidiomicetnih kvasovk, kraji izolacije in izvedeni testi ter analize

<b>Ekološka oznaka seva</b>	<b>Oznaka Ex zbirke</b>	<b>Ekološka niša</b>	<b>Izvedeni testi, analize za posamezen sev</b>
AR8/7_25_MY20_A_8	EXF-4023	morska voda ob ledeniku (vzorec 25)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_25_MY20_B_5	EXF-4019	morska voda ob ledeniku (vzorec 25)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_25_SNA_B_2	EXF-3918	morska voda ob ledeniku (vzorec 25)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_26_MEA_B_1	EXF-4029	ledeniški led (vzorec 26)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_26_MEA_B_3	EXF-4032	ledeniški led (vzorec 26)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_26_MEA_C_3	EXF-4030	ledeniški led (vzorec 26)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_26_MEA5_A_2	EXF-4006	ledeniški led (vzorec 26)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_26_5°C_MY20_A_2	EXF-4236	ledeniški led (vzorec 26)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_26_5°C_MY20_A_3	EXF-4235	ledeniški led (vzorec 26)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_26_5°C_MY20_A_4	EXF-4239	ledeniški led (vzorec 26)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_27_MEA_A_2	EXF-3980	ledeniški led (vzorec 27)	določanje nukleotidnega zaporedja, testiranje tvorbe sideroforjev
AR8/7_27_MEA_A_3	EXF-3979	ledeniški led (vzorec 27)	določanje nukleotidnega zaporedja, fiziološki testi, merjenje tvorbe sideroforjev
AR8/7_27_MEA_C_3	EXF-3986	ledeniški led (vzorec 27)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_27_MEA_D_6	EXF-3982	ledeniški led (vzorec 27)	določanje nukleotidnega zaporedja, fiziološki testi, merjenje tvorbe sideroforjev
AR8/7_27_MEA5_B_1	EXF-3968	ledeniški led (vzorec 27)	določanje nukleotidnega zaporedja, fiziološki testi, merjenje velikosti celic in kapsul, encimski testi, testiranje tvorbe sideroforjev
AR8/7_27_MEA5_B_2	EXF-3969	ledeniški led (vzorec 27)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_27_MY20_C_2	EXF-3971	ledeniški led (vzorec 27)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_25_MEA_C_6	EXF-3970	ledeniški led (vzorec 27)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_25_MEA5_A_2	EXF-3996	ledeniški led (vzorec 27)	določanje nukleotidnega zaporedja, fiziološki testi, merjenje tvorbe sideroforjev
AR8/7_27_SNA_C_1	EXF-4018	ledeniški led (vzorec 27)	določanje nukleotidnega zaporedja, fiziološki testi
AR8/7_27_5°C_MY20_A_1	EXF-4949	ledeniški led (vzorec 27)	določanje nukleotidnega zaporedja, fiziološki testi, merjenje tvorbe sideroforjev
AR8/7_27_5°C_MY20_A_2	EXF-4229	ledeniški led (vzorec 27)	določanje nukleotidnega zaporedja

Se nadaljuje

Hadalin Baša N. Reševanje taksonomskih dilem pri bazidiomicetnih kvasovkah iz arktičnih ledenikov.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije

## Nadaljevanje

Preglednica 4: Sevi bazidiomicetnih kvasovk, kraji izolacije in izvedeni testi ter analize

<b>Ekološka oznaka seva</b>	<b>Oznaka Ex zbirke</b>	<b>Ekološka niša</b>	<b>Izvedeni testi, analize za posamezen sev</b>
AR8/7_27_MEA_G_2	EXF-3973	ledeniški led (vzorec 27)	določanje nukleotidnega zaporedja, fiziološki testi, merjenje velikosti celic in kapsul, encimski testi, testiranje tvorbe sideroforjev
AR8/7_27_5°C_MY20_C_1	EXF-4230	ledeniški led (vzorec 27)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_27_5°C_MY20_C_2	EXF-4050	ledeniški led (vzorec 27)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_27_5°C_MY20_C_3	EXF-4234	ledeniški led (vzorec 27)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_27_5°C_MY20_C_4	EXF-4232	ledeniški led (vzorec 27)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_27_5°C_SNA_B_1	EXF-4225	ledeniški led (vzorec 27)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_27_5°C_SNA_B_2	EXF-4233	ledeniški led (vzorec 27)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_28_MEA_B_1	EXF-3997	morska voda ob izhodu iz fjorda (vzorec 28)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_28_MEA_C_3	EXF-3995	morska voda ob izhodu iz fjorda (vzorec 28)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_28_MEA5_B_2	EXF-3907	morska voda ob izhodu iz fjorda (vzorec 28)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_28_SNA_A_1	EXF-4084	morska voda ob izhodu iz fjorda (vzorec 28)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_28_SNA_A_2	EXF-4085	morska voda ob izhodu iz fjorda (vzorec 28)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_31_MEA_A_4	EXF-3944	izcedna voda (vzorec 31)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_31_MEA_A_5	EXF-3999	izcedna voda (vzorec 31)	določanje nukleotidnega zaporedja
AR8/7_31_MY20_A_9	EXF-3952	izcedna voda (vzorec 31)	določanje nukleotidnega zaporedja

### 3.10 TAKSONOMSKE ANALIZE

#### 3.10.1 Morfološke analize

##### 3.10.1.1 Merjenje velikosti celic in kapsul

Uporabili smo mlado kulturo kvasovk v YM gojišču. Preparate smo pripravili z barvanjem s tušem India Ink, celice smo na objektno stekelce predhodno utrdili s polilizinom (Zaragoza in sod., 2003). Vzorci so bili opazovani pod mikroskopom Olympus BX51. V vsakem vzorcu smo izmerili 20 celic. Preparate smo fotografirali z digitalno kamero DP12 in obdelali s programsko opremo Olympus DP-soft.

#### 3.10.2 Fiziološke analize

##### 3.10.2.1 Identifikacija kvasovk

Fiziološke analize za identifikacijo kvasovk smo izvedli po protokolih, ki jih navajajo Kurtzman s sodelavci (2011a), Sampaio (1999) in Fonseca (1992). Izvedli smo:

- teste asimilacije različnih virov ogljika in dušika,
- test za ugotavljanje sposobnosti fermentacije glukoze,
- testiranje rasti pri različnih temperaturah,
- testiranje rasti v prisotnosti cikloheksimida,
- testiranje tvorjenja ekstracelularega škroba,
- testiranje hidrolize uree,
- testiranje hidrolize arbutina,
- testiranje rasti v gojišču brez vitaminov,
- testiranje rasti na gojišču DBB.

Podrobni opisi, recepture gojišč, raztopin in način priprave ter uporabe so v poglavju 3.5.

##### 3.10.2.2 Encimski testi

Encimske teste smo izvedli po protokolih, ki jih navaja Brizzio in sod. (1997). Podrobni opisi, recepture gojišč, raztopin in način priprave ter uporabe so v poglavju 3.5.2.

##### 3.10.2.3 Testiranje tvorbe sideroforjev

Test smo izvedli po protokolu, ki ga navajajo Atkin in sod. (1970) in Calvente in sod. (2001), in sicer v tekočem in trdnem gojišču.

Testiranje v tekočem gojišču:

5 ml prekonočne kulture kvasnih celic smo suspendirali v 45 ml SPM. Naredili smo dve seriji in jih inkubirali 14 dni na 15 °C in 25 °C na stresalniku (200 rpm). Testno kulturo smo po petih, desetih in štirinajstih dneh vzorčili in merili OD (optična gostota) pri A<sub>480</sub> nm. Vzorčili smo 800 µl kulture in jo centrifugirali (6,0 rcf, 10 min). V kiveto smo odpipetirali 500 µl supernatanta, dodali 2500 µl 5 mmol FeCl<sub>3</sub>-0,1 mmol HClO<sub>4</sub> ter

izmerili OD pri valovni dolžini A<sub>480</sub> nm na spektrofotometru. Pri negativni kontroli smo namesto supernatanta dodali 500 µl gojišča SPM. Koncentracijo sideroforjev smo določili s pomočjo umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili s pomočjo standarda deferoksamin mezilat v koncentracijah 1,5; 1,0; 0,5; 0,25; 0,1; 0,075; 0,05; 0,01 in 0 mg/ml. V kiveto smo dodali ustrezeno količine založne raztopine deferoksamin mezilata (10 mg/ml) in gojišča SPM ter merili OD pri A<sub>480</sub> nm. Izdelali smo krivuljo odvisnosti OD od koncentracije standarda.

Testiranje na trdnem gojišču:

mlado kulturo kvasnih celic smo nacepili na plošče z gojiščem SPMA in jih 5 dni inkubirali na 15 °C ter 25 °C. Po končani inkubaciji smo v gojišče s slamico naredili luknjico in jo s pomočjo pipete napolnili z 20 mmol FeCl<sub>3</sub>. Po 15 min smo odčitali rezultat. Pozitivna reakcija je nastanek rdečega obroča.

### 3.10.3 Molekularno genetske analize

#### 3.10.3.1 Analiza rDNA zaporedij (Boekhout in sod., 1995)

Verižna reakcija s polimerazo: PCR mešanica (35 µl) je vsebovala 10 x PCR Dream Taq pufer brez MgCl<sub>2</sub>, 25 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/l mešanice vseh štirih gradnikov DNA, 10 pmol/µl oligonukleotidnega začetnika NL1 in 10 pmol/µl oligonukleotidnega začetnika NL4, 1 µl genomske DNA, 5 U/µl Dream taq DNA polimeraze ter bidestilirano sterilno vodo.

Oligonukleotidni začetniki: NL1 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'  
NL4 5'-GGTCCGTGTTCAAGACGG-3'

Kot negativno kontrolo smo namesto DNA uporabili sterilno bidestilirano vodo.

Za pomnožitev DNA smo uporabili cikel:

59 °C	120 s	
95 °C	45 s	
52 °C	30 s	
72 °C	120 s	
72 °C	250 s	30 ciklov

Gelska elektroforeza: pomnoženo DNA smo z elektroforezo ločili na 1-odstotnem agaroznem gelu v 1 × TAE pufru. V gel smo dodali 3 µl barvila Syber green. Nanašali smo 5,5 µl mešanice, ki je vsebovala 4,0 µl pomnoženih fragmentov DNA in 1,5 µl 5 × nanašalnega pufra. Uporabili smo lestvico 100bp DNA Ladder Plus. Elektroforeza je tekla 5 min pri 90 V in nato približno 20 min pri 120 V. Po končani elektroforezi smo gel osvetlili z UV-transiluminatorjem in ga fotografirali.

### 3.10.3.2 Določanje nukleotidnega zaporedja

V podjetju Macrogen (Seul, Koreja) so določili nukleotidna zaporedja pomnoženih odsekov DNA. Uporabili so sekvenator 3730xl, ki temelji na Sangerjevi metodi in kapilarni elektroforezi.

### 3.10.3.3 Izdelava filogenetskih dreves

Za poravnavo in obdelavo ugotovljenih nukleotidnih zaporedij smo uporabili računalniški program Clustal X (Thomson in sod., 1997). Najsorodnejša zaporedja smo poiskali v bazi podatkov GeneBank s spletnim programom BLAST (angl. Basic Local Alignment Search Tool) (NCBI, 2009).

Po metodi distančnega združevanja najbližjega soseda (»neighbour joining«) smo z računalniškim programom Mega4 (Tamura in sod., 2007) izdelali filogenetska drevesa.

#### 4 REZULTATI

Izolirane kvasovke smo na podlagi nukletidnih zaporedij domene D1/D2 26S rDNK identificirali do nivoja vrste, in sicer smo najSORODNEJŠA zaporedja poiskali v podatkovni bazi GenBank s pomočjo uporabe orodja BLAST. Pri tem smo upoštevali, da gre za isto vrsto pri poravnavi nukleotidnih zaporedij z nobeno, eno ali dvema razlikama ( $\Delta$ bp), v primeru treh razlik pa smo določili kot vrsti podobno (= podoben) in v primeru z več kot tremi razlikami kot sp. (Fell in sod., 2000).

Tako smo od skupno 115 sevov določili 8 askomicetnih in 107 bazidiomicetnih kvasovk. Bazidiomicetne smo razvrstili v dve poddebbli. Sevi iz poddebla Pucciniomycotina so razvrščeni v 3 razrede, od tega je 46 izolatov iz razreda Microbotryomycetes in 14 iz Cystobasidiomycetes. 3 izolati so iz razreda Agaricostilbomycetes. Vseh 43 sevov iz poddebla Agaricomycotina je iz razreda Tremellomycetes. Preglednica 5 prikazuje uvrstitev izolatov v taksonne in celokupno število izolatov znotraj identificiranih vrst. V Preglednicah 6–25 pa so za določene vrste navedeni rezultati poravnav nukleotidnih zaporedij domene D1/D2 26S rDNA naših izoliranih sevov, in sicer so izraženi kot odstopanje nt zaporedja od zaporedja zadetka GenBank.

Za izdelavo filogenetskega drevesa smo uporabili zaporedja D1/D2 določenih sevov bazidiomicetnih kvasovk, ki so bile na voljo v podatkovni bazi GenBank, pa tudi določena zaporedja sevov, ki so bili izolirani iz argentinskih in arktičnih ledenikov. Na izbranih skupinah smo nato izvedli tudi dodatne taksonomske analize. Na podlagi izdelanih filogenetskih dreves (Slika 3–5) smo na izbranih skupinah izvedli še dodatne taksonomske analize.

Tako smo na izbranih sevih vrst *Cryptococcus albidosimilis*, *Cryptococcus magnus/Cryptococcus chernovii/Filobasidium floriforme*, *Rhodosporidium lusitanie/Rhodotorula colostri* in *Rhodotorula* sp./*Erythrobasidium* klad sp. CBS 8923 izvedli fiziološke teste, kot so: asimilacija različnih virov ogljika in dušika, fermentacija glukoze, hidroliza arbutina ter uree, rast na gojišču z 0,01 % cikloheksimidom in gojišču brez vitaminov, test DBB ter ugotavljanje tvorjenja ekstracelularnega škroba. Rezultati fizioloških testov so predstavljeni ločeno za vsak takson v poglavju 4.2.

Na izbranih sevih določenih ekološko bolj zanimivih vrst pa smo dodatno izvedli še encimske teste, preverili ali tvorijo sideroforje in izvedli meritve velikosti celic ter kapsul. Testirali smo tudi rast pri različnih temperaturah.

Preglednica 5: Uvrstitev izolatov v taksonomske skupine in celokupno število izolatov znotraj identificiranih vrst

	Ex oznake	število izolatov
<b>ASCOMYCOTA</b>		
<b>Saccharomycotina</b>		
Saccharomycetes		
Saccharomycetales		
<i>Debaromyces/Lodderomyces</i> klad		
<i>Candida shehatae</i> var. <i>insectosa</i> CBS 4286 <sup>T</sup>	4950	1
<i>Candida zeylanoides</i> CBS 619 <sup>T</sup>	4241, 3703, 3660, 3659	4
<i>Debaromyces</i> sp.; 5Δbp od <i>Debaryomyces nepalensis</i> CBS 5921 <sup>T</sup> /5Δbp od <i>Debaryomyces maramus</i> CBS 1958 <sup>T</sup> /5Δbp od <i>Debaryomyces hansenii</i> 12-1	4023	1
<i>Metschnikowia</i> klad		
<i>Metschnikowia bicuspidata</i> var. <i>bicuspidata</i> CBS 5575 <sup>T</sup>	3997	1
<b>Pezizomycotina</b>		
Sordariomycetes		
Hypocreomycetidae		
Hypocreales		
<i>Acremonium</i> sp.; 7Δbp/Uncultured Acremonium clone NG_N_B12; 13Δbp	4071	1
<b>BASIDIOMYCOTA</b>		
Basidiomycota sp.; 25Δbp	4226	1
<b>Pucciniomycotina</b>		
Agaricostibilomycetes		
<i>Kondoa</i> sp.; 7Δbp od <i>Kondoa aeria</i> CSB 8352 <sup>T</sup> / <i>Bensingtonia</i> sp.; 11Δbp <i>Besingtonia</i> sp.	4073	1
Agaricostibales		
Filogentska skupina <i>kondoa</i>		
<i>Kondoa aeria</i> CSB 8352 <sup>T</sup>	3908, 4238	2
Microbotryomycetes		
<i>Rhodotorula</i> sp.; 9Δbp od <i>Rhodotorula eucalyptica</i> sp. nov. CBS 8499 <sup>T</sup> / <i>Rhodotorula</i> sp.; 12Δbp od <i>Rhodotorula phylia</i> CBS 6272 <sup>T</sup>	3931	1

Se nadaljuje

## Nadaljevanje

Preglednica 5: Uvrstitev izolatov v taksonomske skupine in celokupno število izolatov znotraj identificiranih vrst

	Ex oznake	Število izolatov
Leucosporidiales		
<i>Rhodotorula creatinivora</i> = <i>Leucosporidiella creatinivora</i> CBS 8620 <sup>T</sup> / <i>Leucosporidium scottii</i> CBS 5932 <sup>T</sup> ; 1Δbp/ <i>Leucosporidiella yakutica</i> CBS 8621 <sup>T</sup> ; 1Δbp	4013	1
<i>Rhodotorula creatinivora</i> = <i>Leucosporidiella creatinivora</i> CBS 8620 <sup>T</sup> ; 1Δbp/ <i>Leucosporidium scottii</i> CBS 5932 <sup>T</sup> ; 1Δbp/ <i>Leucosporidiella yakutica</i> CBS 8621 <sup>T</sup> ; 1Δbp	3967, 3918	2
Sporidiobolales		
<i>Rhodosporidium</i> sp.; 8Δbp od <i>Rhodosporidium lusitanie</i> CSB 7604 <sup>T</sup> / <i>Rhodotorula</i> sp.; 7Δbp od <i>Rhodotorula colostri</i> CSB 348 <sup>T</sup>	4230, 4948	2
<i>Rhodosporidium</i> sp.; 7Δbp od <i>Rhodosporidium lusitanie</i> CSB 7604 <sup>T</sup> / <i>Rhodotorula</i> sp.; 5Δbp od <i>Rhodotorula colostri</i> CSB 348 <sup>T</sup>	4947	1
<i>Rhodosporidium</i> sp.; 12Δbp od <i>Rhodosporidium lusitanie</i> CSB 7604 <sup>T</sup> / <i>Rhodotorula</i> sp.; 11Δbp od <i>Rhodotorula colostri</i> CSB 348 <sup>T</sup>	4235	1
<i>Rhodosporidium</i> sp.; 5Δbp od <i>Rhodosporidium lusitanie</i> CSB 7604 <sup>T</sup> / <i>Rhodotorula</i> sp.; 5Δbp od <i>Rhodotorula colostri</i> CSB 348 <sup>T</sup>	3969, 3986, 4228	3
<i>Rhodosporidium lusitanie</i> – podoben; 3Δbp od CSB 7604 <sup>T</sup> / <i>Rhodotorula</i> sp.; 5Δbp od <i>Rhodotorula colostri</i> CSB 348 <sup>T</sup>	3820, 3880, 3884, 3936, 3935, 3934, 3933, 3970, 4018, 3881	10
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i> var. <i>albus</i> CBS 7501/ <i>Sporidiobolus pararoseus</i> – podoben; 3Δbp od CBS 491 <sup>T</sup>	4070	1
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i> var. <i>albus</i> CBS 7501/ <i>Sporidiobolus pararoseus</i> CBS 491 <sup>T</sup> ; 2Δbp	4237, 4223, 3894, 3815, 3833, 3879, 3825, 3822	8
<i>Rhodotorula graminis</i> CBS 2826 <sup>T</sup> / <i>Rhodosporidium babjevae</i> CBS 7808 <sup>T</sup> ; 1Δbp/ <i>Rhodosporidium diobovatum</i> CBS 6085 <sup>T</sup> ; 1Δbp/ <i>Rhodotorula glutinis</i> CBS 20 <sup>T</sup> ; 1Δbp	4006, 4029	2
<i>Rhodotorula graminis</i> CBS 2826 <sup>T</sup> ; 2Δbp / <i>Rhodosporidium babjevae</i> – podoben; 3Δbp od CBS 7808 <sup>T</sup> ; 1Δbp/ <i>Rhodosporidium diobovatum</i> CBS 6085 <sup>T</sup> ; 1Δbp/ <i>Rhodotorula glutinis</i> – podoben; 3Δbp od CBS 20 <sup>T</sup>	4236	1
<i>Rhodotorula</i> sp.; 21Δbp od <i>R. eucalyptica</i> sp. nov. CSB 8499 <sup>T</sup>	4232	1
<i>Rhodotorula</i> sp.; 16Δbp od <i>R. eucalyptica</i> sp. nov. CSB 8499 <sup>T</sup>	4227	1
Filogenetska skupina <i>johsonii</i>		
<i>Sporobolomyces roseus</i> CBS 486 <sup>T</sup>	4026	1

Se nadaljuje

## Nadaljevanje

Preglednica 5: Uvrstitev izolatov v taksonomske skupine in celokupno število izolatov znotraj identificiranih vrst

	Ex oznake	število izolatov
Filogenetska skupina <i>Sphaerocarpum</i>		
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS 316 <sup>T</sup>	4015, 3988, 3913, 3906, 3899, 3898, 3878, 3980	8
Leucosporidiales		
<i>Rhodotorula muscorum</i> = <i>Leucosporidiella muscorum</i> CBS 6921 <sup>T</sup>	3952	1
Kriegeriales		
<i>Rhodotorula glacialis</i> CBS 10436 <sup>T</sup>	3922	1
Cystobasidiomycetes		
<i>Rhodotorula laryngis</i> – podoben; 3Δbp od CSB 2221 <sup>T</sup> / <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923; 1Δbp	4242, 4068, 4032	3
<i>Rhodotorula laryngis</i> – podoben; 3Δbp od CSB 2221 <sup>T</sup> / <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923; 3Δbp	3824, 3712	2
<i>Rhodotorula laryngis</i> ; 1Δbp od CSB 2221 <sup>T</sup> / <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923 – podoben; 3Δbp od CBS 8923	3989, 4224, 4014	3
<i>Rhodotorula</i> sp.; 4Δbp od <i>Rhodotorula laryngis</i> CSB 2221 <sup>T</sup> / <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923; 1Δbp	4003	1
<i>Rhodotorula</i> sp.; 7Δbp od <i>Rhodotorula laryngis</i> CSB 2221 <sup>T</sup> / <i>Erythrobasidium</i> klad sp.; 7Δbp od CBS 8923	3973	1
<i>Rhodotorula laryngis</i> ; 2Δbp od CBS 2221 <sup>T</sup> / <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923; 2Δbp	3873	1
Cystobasidiales		
<i>Rhodotorula laryngis</i> CBS 2221 <sup>T</sup>	3909, 4243	2
Erythrobasidiales		
Filogenetska skupina <i>gracilis</i>		
<i>Sakaguchia dacryoidea</i> CBS 6356 <sup>T</sup>	3910	1
<b>Agaricomycotina</b>		
Tremellomycetes		
<i>Cryptococcus</i> sp.; 11Δbp od <i>Cryptococcus laurentii</i> CBS 139 <sup>T</sup>	4087	1
<i>Cryptococcus</i> sp.; 7Δbp od <i>Cryptococcus laurentii</i> CBS 139 <sup>T</sup>	3926	1
<i>Cryptococcus chernovii</i> CBS 8679 <sup>T</sup> ; 1Δbp/ <i>Filobasidium</i> sp.; 1Δbp/ <i>Cryptococcus</i> sp.; 4Δbp od <i>Cryptococcus magnus</i> CBS 140 <sup>T</sup> / <i>Filobasidium</i> sp.; 4Δbp od <i>Filobasidium floriforme</i> ZIM 606	3823	1
<i>Cryptococcus magnus</i> CBS 140 <sup>T</sup> / <i>Filobasidium floriforme</i> CBS 6241 <sup>T</sup> / <i>Cryptococcus chernovii</i> CBS 8679 <sup>T</sup> ; 2Δbp	3917	1
<i>Cryptococcus magnus</i> CBS 140 <sup>T</sup> / <i>Filobasidium floriforme</i> CBS 6241 <sup>T</sup>	3995, 3883, 3812	3

Se nadaljuje

## Nadaljevanje

Preglednica 5: Uvrstitev izolatov v taksonomske skupine in celokupno število izolatov znotraj identificiranih vrst

	Ex oznake	število izolatov
<i>Filobasidium</i> sp.; 5Δbp od <i>Filobasidium floriforme</i> CBS 6241 <sup>T</sup> /Cryptococcus sp.; 5Δbp od <i>Cryptococcus magnus</i> CBS 140 <sup>T</sup>	4067	1
Cystofilobasidiales		
<i>Guehomyces pullulans</i> CBS 2532 <sup>T</sup>	4008	1
Tremellales		
<i>Dioszegia fristlingensis</i> CBS 10052 <sup>T</sup>	3983	1
Filogenetska skupina <i>victoriae</i>		
<i>Cryptococcus tephrensis</i> CBS 8935 <sup>T</sup>	4072, 4021, 3749	3
<i>Cryptococcus victoriae</i> MZKI K-435/ <i>Cryptococcus tephrensis</i> CBS 8935 <sup>T</sup> ; 1Δbp	3875	1
<i>Cryptococcus victoriae</i> MZKI K-435/ <i>Cryptococcus tephrensis</i> – podoben; 3Δbp od CBS 8935 <sup>T</sup>	3999	1
<i>Cryptococcus victoriae</i> CBS 8685 <sup>T</sup>	4085, 4020, 4011, 3923, 3912, 3832, 3831, 3748, 3721, 3711	10
<i>Cryptococcus victoriae</i> CBS 8685 <sup>T</sup> ; 2Δbp/ <i>Cryptococcus victoriae</i> CBS 8908	4012	1
Filobasidiales		
<i>Cryptococcus gilvescens</i> CBS 7252 <sup>T</sup>	4030, 3944, 3719	3
Filogenetska skupina <i>floriforme</i>		
<i>Cryptococcus magnus</i> CBS 140 <sup>T</sup>	4233	1
Filogenetska skupina <i>albidus</i>		
<i>Cryptococcus albidosimilis</i> CBS 7711 <sup>T</sup>	4229, 3996	2
<i>Cryptococcus albidosimilis</i> CBS 7711 <sup>T</sup> ; 1Δbp	3680, 4050, 3834	3
<i>Cryptococcus albidosimilis</i> CBS 7711 <sup>T</sup> ; 2Δbp	3982, 3968, 3979	3
<i>Cryptococcus albidosimilis</i> – podoben; 3Δbp od CBS 7711 <sup>T</sup>	4949	1
<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i> CBS 142 <sup>T</sup>	4000, 3941	2
<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>kuetzingii</i> CBS 6086/ <i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i> CBS 142 <sup>T</sup>	4002	1
<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>kuetzingii</i> CBS 6086/ <i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i> CBS 142T; 1Δbp	4084	1

#### 4.1 DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA DOMENE D1/D2 26S rDNA IZOLIRANIH SEVOV IN IZDELAVA FILOGENETSKIH DREVES

Preglednice 6–25 prikazujejo identifikacijo sevov po posameznih vrstah, ki smo jih določili na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov. Slike 3–6 prikazujejo filogenetska drevesa, ki vključujejo nekatere seve izbranih vrst.

##### 4.1.1 Rod *Cryptococcus*

Devet sevov smo na podlagi primerjave zaporedij domene D1/D2 26S rDNA z uporabo orodja BLAST določili kot vrsto *C. albidosimilis* (Preglednica 6), ki spada v filogenetsko skupino *albidus* reda Filobasidiales. Zaporedja večine sevov so se razlikovala do 2 bp v primerjavi z zaporedjem tipskega seva CBS 7711 (oznaka AF137601 v podatkovni bazi GenBank) (Preglednici 5, 6). Ker se je zaporedje seva EXF-4949 razlikovalo za 3 bp, smo ta sev poimenovali *C. albidosimilis* – podoben (Preglednici 5, 6).

Preglednica 6: Ex oznake sevov za rod *Cryptococcus*, skupino *C. albidosimilis* in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov

Ex oznaka	Določena vrsta	Ujemanje nt zaporedja z zaporedjem zadetka GenBank	Odstopanje (Δbp)	GenBank oznaka zadetka
EXF-3680	<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	501/501	0	AF137601 <sup>T</sup>
EXF-4229	<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	531/533	2	AF137601 <sup>T</sup>
EXF-4050	<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	554/555	1	AF137601 <sup>T</sup>
EXF-3996	<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	509/511	2	AF137601 <sup>T</sup>
EXF-3979	<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	490/492	2	AF137601 <sup>T</sup>
EXF-3968	<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	488/490	2	AF137601 <sup>T</sup>
EXF-3834	<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	496/497	1	AF137601 <sup>T</sup>
EXF-4949	<i>Cryptococcus albidosimilis</i> – podoben	466/469	3	AF137601 <sup>T</sup>
EXF-3982	<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	500/502	2	AF137601 <sup>T</sup>

Iz filogenetskega drevesa (Slika 3) je razvidno, da izbrani sevi skupine *C. albidosimilis* tvorijo skupaj s tipskim sevom samostojno skupino.

Dva seva verjetno predstavljata novo vrsto, ki je sorodna vrstam *C. laurentii* in *C. rajasthanensis* iz filogenetske skupine Bulleromyces reda Tremellales (Slika 5). Od tipskega seva *C. laurentii* CBS 139 se razlikujeta v zaporedju D1/D2 za več kot 6 bp (Preglednici 5, 7).

Preglednica 7: Ex oznake sevov za rod *Cryptococcus*, skupino *C. gilvescens* in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov

Ex oznaka	Določena vrsta	Ujemanje nt zaporedja z zaporedjem zadetka GenBank	Odstopanje (Δbp)	GenBank oznaka zadetka
EXF-4030	<i>Cryptococcus gilvescens</i>	469/469	0	AF181547 <sup>T</sup>
EXF-3944	<i>Cryptococcus gilvescens</i>	461/461	0	AF181547 <sup>T</sup>
EXF-3719	<i>Cryptococcus gilvescens</i>	470/470	0	AF181547 <sup>T</sup>

V vrsto *C. albidus*, ki jo uvrščajo tudi v filogenetsko skupino *albidus* reda Filobasidiales, smo uvrstili 4 seve, katerih zaporedja večinoma niso odstopala od zaporedja D1/D2 domene tipskega seva CBS 142 vrste *C. albidus* in zaporedja seva podvrste *C. albidus* var. *kuetzingii*, dostopnega pod oznako AF181546 v podatkovni bazi GenBank (Preglednici 5, 8).

Preglednica 8: Ex oznake sevov za rod *Cryptococcus*, skupino *C. albidus* in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov

Ex oznaka	Določena vrsta	Ujemanje nt zaporedja z zaporedjem zadetka GenBank	Odstopanje (Δbp)	GenBank oznaka zadetka
EXF-4000	<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i>	517/518	1	AF335982 <sup>T</sup>
EXF-3941	<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i>	507/507	0	AF075474 <sup>T</sup>
EXF-4084	<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>kuetzingii</i>	559/559	0	AF181546
	<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i>	558/559	1	AF075474 <sup>T</sup>
EXF-4002	<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>kuetzingii</i>	529/529	0	AF181546
	<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i>	529/529	0	AF075474 <sup>T</sup>

V izdelavo filogenetskega drevesa (Slika 1) so bili vključeni le sevi EXF-4002, -3941 in -4000. Na drevesu so zajeti v isto, samostojno skupino, najbljiže sevom *C. albidus* var. *ovali* in *C. adeliensis*. Tipska seva *C. albidus* var. *kuetzingii* in *C. albidus* var. *albidus* nista bila zajeta v izdelavo filogenetskega drevesa.

Tri seve smo na osnovi zaporedja D1/D2 določili kot vrsto *C. tephrensis*, vrsta spada v filogenetsko skupino *victoriae* reda Tremelalles (Preglednica 5). Le v primeru seva EXF-4021 je zaporedje domene D1/D2 odstopalo za 1 bp od zaporedja tipskega seva CBS 8935 (Preglednici 5, 9). Na filogenetskem drevesu (Slika 5) sta se seva EXF-3749 in -4021, ki sta bila zajeta v izdelavo filogenetskega drevesa, umestila poleg tipskega seva vrste *C. tephrensis*.

Preglednica 9: Ex oznake sevov za rod *Cryptococcus*, skupino *C. tephrensis* in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov

Ex oznaka	Določena vrsta	Ujemanje nt zaporedja z zaporedjem zadetka GenBank	Odstopanje (Δbp)	GenBank oznaka zadetka
EXF-4072	<i>Cryptococcus tephrensis</i>	565/565	0	DQ000318 <sup>T</sup>
EXF-4021	<i>Cryptococcus tephrensis</i>	584/585	1	DQ000318 <sup>T</sup>
EXF-3749	<i>Cryptococcus tephrensis</i>	506/506	0	DQ000318 <sup>T</sup>

Na osnovi zaporedja D1/D2 sevov, navedenih v Preglednici 10 nismo uspeli določiti do nivoja vrste, ker ozkosorodnih vrst *C. chernovii*, *C. magnus* in *F. floriforme*, iz filogenetske skupine *floriforme* reda Filobasidiales, na osnovi D1/D2 zaporedja ne moremo ločiti med seboj (Fell in sod., 2000).

Preglednica 10: Ex oznake sevov za skupino *C. magnus/C. chernovii/F. floriforme* in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov

Ex oznaka	Določena vrsta	Ujemanje nt zaporedja z zaporedjem zadetka GenBank	Odstopanje (Δbp)	GenBank oznaka zadetka
EXF-4233	<i>Cryptococcus magnus</i>	546/546	0	AF181851 <sup>T</sup>
EXF-3823	<i>Cryptococcus chernovii</i>	505/506	1	AF181530
	<i>Filobasidium</i> sp.*	505/506	1	JX067781
	<i>Cryptococcus magnus</i>	502/506	4	AF181851
	<i>Filobasidium floriforme</i> *	502/506	4	AM748535
EXF-3917	<i>Cryptococcus magnus</i>	534/535	1	AF181851 <sup>T</sup>
	<i>Filobasidium floriforme</i>	534/535	1	AF075498 <sup>T</sup>
	<i>Cryptococcus chernovii</i>	533/535	2	AF181530 <sup>T</sup>
EXF-3883	<i>Cryptococcus magnus</i>	528/528	0	AF181851 <sup>T</sup>
	<i>Filobasidium floriforme</i>	528/528	0	AF075498 <sup>T</sup>
EXF-3812	<i>Cryptococcus magnus</i>	529/529	0	AF181851 <sup>T</sup>
	<i>Filobasidium floriforme</i>	529/529	0	AF075498 <sup>T</sup>
EXF-4067	<i>Filobasidium</i> sp.			
	<i>Filobasidium floriforme</i>	548/553	5	AF075498 <sup>T</sup>
	<i>Cryptococcus</i> sp.			
	<i>Cryptococcus magnus</i>	548/553	5	AF181851 <sup>T</sup>
EXF-3995	<i>Cryptococcus magnus</i>	540/540	0	AF181851 <sup>T</sup>
	<i>Filobasidium floriforme</i>	540/540	0	AF075498 <sup>T</sup>

Legenda: \* neobjavljen članek

Sevi zajeti v filogenetsko analizo, so se razporedili v dve skupini, in sicer EXF-3917 in EXF-3823 sta na filogenetskem drevesu skupaj v skupini s tipskim sevom *C. steposus*; EXF-3883 in EXF-3812 pa s tipskim sevom *C. magnus* (Slika 3).

2 seva verjetno predstavljata novo vrsto, ki je sorodna vrstam *C. laurentii* in *C. rajasthanensis* iz klada Bulleromyces linije Tremellales (Slika 5). Od tipskega seva *C. laurentii* CBS 139 se razlikujeta v zaporedju D1/D2 za več kot 6 bp (Preglednica 5, 11).

Preglednica 11: Ex oznake sevov za rod *Cryptococcus*, skupino *Cryptococcus* sp. in določene vrste na osnovi sekvenciranja D1/D2 domene 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov

Ex oznaka	Določena vrsta	Ujemanje nt zaporedja z zaporedjem zadetka GenBank	Odstopanje (Δbp)	GenBank oznaka zadetka
EXF-4087	<i>Cryptococcus</i> sp.			
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	542/553	11	AF075469
EXF-3926	<i>Cryptococcus</i> sp.			
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	494/501	7	AF075469

Večino sevov, navedenih v Preglednici 12, smo uvrstili v vrsto *C. victoriae*, filogenetsko skupino *victoriae* reda Tremeliales, ki so se razlikovali v manj kot 3 bp v primerjavi s tipskim sevom CBS 8685. Na filogenetskem drevesu pa so se ti sevi razvrstili v tri podskupine (Slika 3), ena od teh bližje vrsti *C. tephrensis*.

Preglednica 12: Ex oznake sevov za rod *Cryptococcus*, skupino *C. victoriae* in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov.

<b>Ex oznaka</b>	<b>Določena vrsta</b>	<b>Ujemanje nt zaporedja z zaporedjem zadetka GenBank</b>	<b>Odstopanje (Δbp)</b>	<b>GenBank oznaka zadetka</b>
EXF-4085	<i>Cryptococcus victoriae</i>	576/576	0	AF363647 <sup>T</sup>
EXF-4020	<i>Cryptococcus victoriae</i>	542/544	2	AF363647 <sup>T</sup>
EXF-4012	<i>Cryptococcus victoriae</i>	536/538	2	AF363647 <sup>T</sup>
EXF-4011	<i>Cryptococcus victoriae</i>	544/546	2	AF363647 <sup>T</sup>
EXF-3923	<i>Cryptococcus victoriae</i>	503/504	1	AF363647 <sup>T</sup>
EXF-3912	<i>Cryptococcus victoriae</i>	529/529	0	AF363647 <sup>T</sup>
EXF-3832	<i>Cryptococcus victoriae</i>	515/515	0	AF363647 <sup>T</sup>
EXF-3831	<i>Cryptococcus victoriae</i>	518/518	0	AF363647 <sup>T</sup>
EXF-3748	<i>Cryptococcus victoriae</i>	514/514	0	AF363647 <sup>T</sup>
EXF-3721	<i>Cryptococcus victoriae</i>	525/525	0	AF363647 <sup>T</sup>
EXF-3711	<i>Cryptococcus victoriae</i>	537/537	0	AF363647 <sup>T</sup>
EXF-3999	<i>Cryptococcus victoriae</i>	521/521	0	DQ640490
	<i>Cryptococcus tephrensis</i> – podoben	518/521	3	DQ000318 <sup>T</sup>
EXF-3875	<i>Cryptococcus victoriae</i>	527/527	0	DQ640490
	<i>Cryptococcus tephrensis</i>	527/528	1	DQ000318 <sup>T</sup>

#### 4.1.2 Rod *Leucosporidiella*

Sev EXF-3952 smo uvrstili v rod *Leucosporidiella*, ki spada v razred Microbotryomycetes in red Leucosporidiales, ker se je zaporedje D1/D2 popolnoma ujemalo z zaporedjem tipskega seva CBS 6921 vrste *L. muscorum* (Preglednici 5, 13).

Preglednica 13: Ex oznake sevov za rod *Leucosporidiella*, skupino *L.muscorum* in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov

<b>Ex oznaka</b>	<b>Določena vrsta</b>	<b>Ujemanje nt zaporedja z zaporedjem zadetka GenBank</b>	<b>Odstopanje (Δbp)</b>	<b>GenBank oznaka zadetka</b>
EXF-3952	<i>Leucosporidiella muscorum</i>	504/504	0	AF070433 <sup>T</sup>

Na filogenetskem drevesu (Slika 4) se je sev EXF-3952 razporedil poleg skupine sevov z ozkosordinimi vrstami *L. creatinivora*, *L. scottii* in *L. yakutica*, v samo filogenetsko analizo tipski sev CBS 6921<sup>T</sup> vrste *L. muscorum* ni bil vključen.

Preostali sevi rodu *Leucosporidiella* tvorijo na filogenetskem drevesu skupino z ozkosordinimi vrstami *L. creatinivora*, *L. scottii* in *L. yakutica* (Slika 4). Sev EXF-4013 se popolnoma ujema v D1/D2 zaporedju s tipskim sevom CBS 6921<sup>T</sup> *L. creatinivora*, seva EXF-3967 in EXF-3918 pa s tipskih sevov CBS 8621<sup>T</sup> vrste *L. yakutica*<sup>T</sup> (Preglednica 14).

Preglednica 14: Ex oznake sevov za rod *Leucosporidiella*, skupino *L. creatinivora/Le. scottii/L. yacutica* in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov

Ex oznaka	Določena vrsta	Ujemanje nt zaporedja z zaporedjem zadetka GenBank	Odstopanje (Δbp)	GenBank oznaka zadetka
EXF-4013	<i>Leucosporidiella creatinivora</i>	492/492	0	AF189925 <sup>T</sup>
	<i>Leucosporidium scottii</i>	491/492	1	AF189908 <sup>T</sup>
	<i>Leucosporidiella yakutica</i>	480/481	1	AY213001 <sup>T</sup>
EXF-3967	<i>Leucosporidiella creatinivora</i>	504/505	1	AF189925 <sup>T</sup>
	<i>Leucosporidium scottii</i>	503/505	2	AF189908 <sup>T</sup>
	<i>Leucosporidiella yakutica</i>	492/492	0	AY213001 <sup>T</sup>
EXF-3918	<i>Leucosporidiella creatinivora</i>	491/492	1	AF189925 <sup>T</sup>
	<i>Leucosporidium scottii</i>	490/492	2	AF189908 <sup>T</sup>
	<i>Leucosporidiella yakutica</i>	478/478	0	AY213001 <sup>T</sup>

#### 4.1.3 Rod *Kondoa*

Iz rodu *Kondoa* (razred Agaricostilbomycetes) smo določili 2 seva vrste *K. aeria*, ki se v zaporedju domene D1/D2 nista razlikovala od tipskega seva CBS 8352 (Preglednici 5, 15). Se je pa sev EXF-4073 razlikoval za 7 bp od tipskega seva CBS 8352 (Preglednici 5, 15).

Preglednica 15: Ex oznake sevov za rod *Kondoa* in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov

Ex oznaka	Določena vrsta	Ujemanje nt zaporedja z zaporedjem zadetka GenBank	Odstopanje (Δbp)	GenBank oznaka zadetka
EXF-3908	<i>Kondoa aeria</i>	541/541	0	AF189901 <sup>T</sup>
EXF-4238	<i>Kondoa aeria</i>	566/566	0	AF189901 <sup>T</sup>
EXF-4073	<i>Kondoa</i> sp.	559/566	3	AF189901 <sup>T</sup>
	<i>Bensingtonia</i> sp.	566/567	1	JX124716

#### 4.1.4 Rod *Dioszegia*

Iz rodu *Dioszegia* (Agaricomycotina, Tremellomycetes, Tremellales) smo določili vrsto *D. frisingensis*, zaporedje seva EXF-3982 namreč ni odstopalo od tipskega seva CBS 10052 (Preglednica 16).

Preglednica 16: Ex oznake sevov za rod *Dioszegia* in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov

Ex oznaka	Določena vrsta	Ujemanje nt zaporedja z zaporedjem zadetka GenBank	Odstopanje (Δbp)	GenBank oznaka zadetka
EXF-3983	<i>Dioszegia frisingensis</i>	502/502	0	AY562146 <sup>T</sup>

Na filogenetskem drevesu (Slika 4) se je sev uvrstil poleg *D. frisingensis*<sup>T</sup>.

#### 4.1.5 Rod *Sporobolomyces*

Iz filogenetske skupine *johsonii*, roda *Sporidiobolus*, smo na osnovi zaporedja D1/D2 uvrstili sev EXF-4026 v vrsto *Sp. roseus*, ker se je od tipskega seva CBS 486 razlikoval le v 1 bp (Preglednica 17). Sev EXF-4026 je bil na filogenetskem drevesu blizu skupine, ki so jo tvorili ostali sevi rodu *Sporobolomyces* (Slika 4).

Ostali sevi rodu *Sporobolomyces* se od zaporedja D1/D2 seva CBS 7501 podvrste *Sp. ruberrimus* var. *albus* ne razlikujejo, od zaporedja seva CBS 491 vrste *S. pararoseus* pa se običajno razlikujejo v 2–3 bp (Preglednica 17). Izjema je zaporedje D1/D2 seva EXF-3894, ki se ne razlikuje od zaporedij podvrste *Sp. ruberrimus* var. *albus* in vrste *S. pararoseus* (Preglednica 17).

Preglednica 17: Ex oznake sevov za rod *Sporobolomyces*, skupino *Sp. roseus/Sp. ruberrimus/S. pararoseus* in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov

Ex oznaka	Določena vrsta	Ujemanje nt zaporedja z zaporedjem zadetka GenBank	Odstopanje ( $\Delta$ bp)	GenBank oznaka zadetka
EXF-4026	<i>Sporobolomyces roseus</i>	505/506	1	AF070441 <sup>T</sup>
EXF-4223	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i> var. <i>albus</i>	515/515	0	AF189993
	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	513/515	2	AF189977 <sup>T</sup>
EXF-3894	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i> var. <i>albus</i>	482/482	0	AF189993
	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	480/480	0	AF189977 <sup>T</sup>
EXF-3815	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i> var. <i>albus</i>	520/520	0	AF189993
	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	518/520	2	AF189977 <sup>T</sup>
EXF-4070	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i> var. <i>albus</i>	543/543	0	AF189993
	<i>Sporidiobolus pararoseus</i> – podoben	529/532	4	AF189977 <sup>T</sup>
EXF-3833	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i> var. <i>albus</i>	488/488	0	AF189993
	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	486/488	2	AF189977 <sup>T</sup>
EXF-3879	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i> var. <i>albus</i>	511/511	0	AF189993
	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	509/511	2	AF189977 <sup>T</sup>
EXF-3825	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i> var. <i>albus</i>	482/482	0	AF189993
	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	480/482	2	AF189977 <sup>T</sup>
EXF-4237	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i> var. <i>albus</i>	519/519	0	AF189993
	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	517/519	2	AF189977 <sup>T</sup>
EXF-3822	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i> var. <i>albus</i>	490/490	0	AF189993
	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	488/490	2	AF189977 <sup>T</sup>

#### 4.1.6 Rod *Guehomyces*

Sev EXF-4008 smo določili kot vrsto *G. pullulans*, ker se je v zaporedju D1/D2 razlikoval v 2 bp od tipskega seva CBS 2532 (Preglednici 5, 18).

Preglednica 18: Ex oznake sevov za rod *Guehomyces* in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov

Ex oznaka	Določena vrsta	Ujemanje nt zaporedja z zaporedjem zadetka GenBank	Odstopanje ( $\Delta$ bp)	GenBank oznaka zadetka
EXF-4008	<i>Guehomyces pullulans</i>	543/545	2	AF105394 <sup>T</sup>

#### 4.1.7 Rod *Sakaguchia*

Iz rodu *Sakaguchia* (Pucciniomycotina, Cystobasidiomycetes, Erythrobasidiales) smo določili sev vrste *S. dacryoidea*, ki se v zaporedju domene D1/D2 ni razlikoval od tipskega seva CBS 6353 (Preglednici 5, 19).

Preglednica 19: Ex oznake sevov za rod *Sakaguchia* in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov

Ex oznaka	Določena vrsta	Ujemanje nt zaporedja z zaporedjem zadetka GenBank	Odstopanje (Δbp)	GenBank oznaka zadetka
EXF-3910	<i>Sakaguchia dacryoidea</i>	480/480	0	AF189973 <sup>T</sup>

#### 4.1.8 Rod *Rhodosporidium*

Več sevov smo izolirali, ki so na filogenetskem drevesu (Slika 4) tvorili skupino, ki je verjetno sorodna ozkosordnima vrstama *Rh. lusitanie* in *R. colostri*. Ti sevi, ki so bili vključeni v filogenetsko analizo pri izdelavi filogenetskega drevesa in se od tipskih sevov (CBS 7604, CBS 348) obeh vrst niso razlikovali za več kot 6 bp, medtem ko so se nekateri sevi navedeni v Preglednici 20 razlikovali za več kot 6 bp od tipskih sevov in bi lahko predstavljali novo vrsto.

Preglednica 20: Ex oznake sevov za skupino *Rhodosporidium* sp./*Rhodotorula* sp. in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov

Ex oznaka	Določena vrsta	Ujemanje nt zaporedja z zaporedjem zadetka GenBank	Odstopanje (Δbp)	GenBank oznaka zadetka
EXF-4948	<i>Rhodosporidium</i> sp.			
	<i>Rhodosporidium lusitanie</i>	551/559	8	AF070423 <sup>T</sup>
EXF-4947	<i>Rhodotorula</i> sp.			
	<i>Rhodotorula colostri</i>	538/545	6	AY372177 <sup>T</sup>
EXF-4235	<i>Rhodosporidium</i> sp.			
	<i>Rhodosporidium lusitanie</i>	536/543	7	AF070423 <sup>T</sup>
EXF-4230	<i>Rhodotorula</i> sp.			
	<i>Rhodotorula colostri</i>	528/533	5	AY372177 <sup>T</sup>
EXF-4228	<i>Rhodosporidium</i> sp.			
	<i>Rhodosporidium lusitanie</i>	566/578	12	AF070423 <sup>T</sup>
	<i>Rhodotorula</i> sp.			
	<i>Rhodotorula colostri</i>	556/567	11	AY372177 <sup>T</sup>
	<i>Rhodosporidium</i> sp.			
	<i>Rhodosporidium lusitanie</i>	551/559	8	AF070423 <sup>T</sup>
	<i>Rhodotorula</i> sp.			
	<i>Rhodotorula colostri</i>	539/546	7	AY372177 <sup>T</sup>
	<i>Rhodosporidium</i> sp.			
	<i>Rhodosporidium lusitanie</i>	511/516	5	AF070423 <sup>T</sup>
	<i>Rhodotorula</i> sp.			
	<i>Rhodotorula colostri</i>	501/506	5	AY372177 <sup>T</sup>

Se nadaljuje

## Nadaljevanje

Preglednica 21: Ex oznake sevov za skupino *Rhodosporidium* sp./*Rhodotorula* sp. in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov

Ex oznaka	Določena vrsta	Ujemanje nt zaporedba z zaporejem zadetka GenBank	Odstopanje (Δbp)	GenBank oznaka zadetka
EXF-3820	<i>Rhodosporidium lusitanie</i> – podoben <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Rhodotorula colostri</i>	504/507 488/493	3 5	AF070423 <sup>T</sup> AY372177 <sup>T</sup>
EXF-3880	<i>Rhodosporidium lusitanie</i> – podoben <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Rhodotorula colostri</i>	507/511 492/497	4 5	AF070423 <sup>T</sup> AY372177 <sup>T</sup>
EXF-3884	<i>Rhodosporidium lusitanie</i> – podoben <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Rhodotorula colostri</i>	496/499 480/485	3 5	AF070423 <sup>T</sup> AY372177 <sup>T</sup>
EXF-3936	<i>Rhodosporidium lusitanie</i> – podoben <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Rhodotorula colostri</i>	511/515 498/503	4 5	AF070423 <sup>T</sup> AY372177 <sup>T</sup>
EXF-3935	<i>Rhodosporidium lusitanie</i> – podoben <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Rhodotorula colostri</i>	496/499 480/485	3 5	AF070423 <sup>T</sup> AY372177 <sup>T</sup>
EXF-3934	<i>Rhodosporidium lusitanie</i> – podoben <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Rhodotorula colostri</i>	487/490 472/477	3 5	AF070423 <sup>T</sup> AY372177 <sup>T</sup>
EXF-3933	<i>Rhodosporidium lusitanie</i> – podoben <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Rhodotorula colostri</i>	497/500 482/487	3 5	AF070423 <sup>T</sup> AY372177 <sup>T</sup>
EXF-3970	<i>Rhodosporidium lusitanie</i> – podoben <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Rhodotorula colostri</i>	503/506 489/494	3 5	AF070423 <sup>T</sup> AY372177 <sup>T</sup>
EXF-3969	<i>Rhodosporidium</i> sp. <i>Rhodosporidium lusitanie</i> <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Rhodotorula colostri</i>	524/529 511/516	5 5	AF070423 <sup>T</sup> AY372177 <sup>T</sup>
EXF-4018	<i>Rhodosporidium lusitanie</i> – podoben <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Rhodotorula colostri</i>	486/489 470/475	3 5	AF070423 <sup>T</sup> AY372177 <sup>T</sup>
EXF-3986	<i>Rhodosporidium</i> sp. <i>Rhodosporidium lusitanie</i> <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Rhodotorula colostri</i>	520/525 507/512	5 5	AF070423 <sup>T</sup> AY372177 <sup>T</sup>
EXF-3881	<i>Rhodosporidium lusitanie</i> – podoben <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Rhodotorula colostri</i>	488/491 471/476	3 5	AF070423 <sup>T</sup> AY372177 <sup>T</sup>

2 seva EXF-4006 in -4029 na filogenetskem drevesu (Slika 4), ki sta tvorila samostojno skupino, smo glede na poravnano zaporedij D1/D2 uvrstili v skupino *R. glutinis sensu stricto*. Ker imata zaporedji D1/D2 na mestu 437 nukleotid G, ki je značilen za vrsti *R. graminins/Rh. babjevae* (Sampaio, 2011a), verjetno ne gre za vrsto *R. glutinis* (Preglednica 21).

Preglednica 22: Ex oznake sevov za skupino *R. graminis/Rh. babjevae/Rh. diobovatum/R. glutinis* in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov

Ex oznaka	Določena vrsta	Ujemanje nt zaporedja z zaporedjem zadetka GenBank	Odstopanje (Δbp)	GenBank oznaka zadetka
EXF-4006	<i>Rhodotorula graminis</i>	496/496	0	AF070431 <sup>T</sup>
	<i>Rhodosporidium babjevae</i>	495/496	1	AF070420 <sup>T</sup>
	<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	495/496	1	AF070421 <sup>T</sup>
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	495/496	1	AF070430 <sup>T</sup>
EXF-4029	<i>Rhodotorula graminis</i>	486/486	0	AF070431 <sup>T</sup>
	<i>Rhodosporidium babjevae</i>	485/486	1	AF070420 <sup>T</sup>
	<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	485/486	1	AF070421 <sup>T</sup>
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	485/486	1	AF070430 <sup>T</sup>
EXF-4236	<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	546/547	1	AF070421 <sup>T</sup>
	<i>Rhodotorula graminis</i>	545/547	2	AF070431 <sup>T</sup>
	<i>Rhodosporidium babjevae – podoben</i>	544/547	3	AF070420 <sup>T</sup>
	<i>Rhodotorula glutinis – podoben</i>	544/547	3	AF070430 <sup>T</sup>

#### 4.1.9 Rod *Rhodotorula*

Seve, navedene v Preglednici 22 smo uvrstili v rod *Rhodotorula* (Microbotryomycetes, Sporidiobolales), in sicer v vrsto *R. mucilaginosa*, ker se sevi niso razlikovali v zaporedju D1/D2 od tipskega seva CBS 316 (Preglednica 22).

Preglednica 23: Ex oznake sevov za rod *Rhodotorula*, skupino *R. mucilaginosa* in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov

Ex oznaka	Določena vrsta	Ujemanje nt zaporedja z zaporedjem zadetka GenBank	Odstopanje (Δbp)	GenBank oznaka zadetka
EXF-4015	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	517/517	0	AF070432 <sup>T</sup>
EXF-3988	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	500/500	0	AF070432 <sup>T</sup>
EXF-3980	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	475/475	0	AF070432 <sup>T</sup>
EXF-3913	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	475/475	0	AF070432 <sup>T</sup>
EXF-3906	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	460/460	0	AF070432 <sup>T</sup>
EXF-3899	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	488/488	0	AF070432 <sup>T</sup>
EXF-3898	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	483/483	0	AF070432 <sup>T</sup>
EXF-3878	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	524/524	0	AF070432 <sup>T</sup>

Na filogeneskem drevesu (Slika 4) so EXF-3878, -3906, -3913, -3898, -3988, -4015 v skupini skupaj z *R. mucilaginosa*<sup>T</sup>.

Glede na filogenetsko drevo se je večina sevov navedenih v Preglednici 23 uvrstila v rod *Rhodotorula*, in sicer vrsto *R. laryngis* (Slika 4). Zaporedja D1/D2 teh sevov običajno odstopajo od tipskega seva CBS 2221 do 3 bp (Preglednici 5, 25). Do 3 bp odstopajo tudi od *Erythrobasidium* sp. CBS 8923, še neopisane anatarktične kvasovke (Preglednici 5, 23).

Preglednica 24: Ex oznake sevov za rod *Rhodotorula*, skupino *R. laryngis/Erythrobasidium* klad sp. CBS 8923 in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov

Ex oznaka	Določena vrsta	Ujemanje nt zaporedja z zaporedjem zadetka GenBank	Odstopanje (Δbp)	GenBank oznaka zadetka
EXF-3909	<i>Rhodotorula laryngis</i>	522/522	0	AF189937 <sup>T</sup>
EXF-4243	<i>Rhodotorula laryngis</i>	577/579	2	AF189937 <sup>T</sup>
EXF-4242	<i>Rhodotorula laryngis</i> – podoben <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923*	544/547 546/547	3 1	AF189937 <sup>T</sup> AY033643
EXF-4224	<i>Rhodotorula laryngis</i> <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923* – podoben	569/570 567/570	1 3	AF189937 <sup>T</sup> AY033643
EXF-4068	<i>Rhodotorula laryngis</i> – podoben <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923*	488/491 492/493	3 1	AF189937 <sup>T</sup> AY033643
EXF-4032	<i>Rhodotorula laryngis</i> – podoben <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923*	506/509 508/509	3 1	AF189937 <sup>T</sup> AY033643
EXF-4014	<i>Rhodotorula laryngis</i> <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923* – podoben	524/525 522/525	1 3	AF189937 <sup>T</sup> AY033643
EXF-4003	<i>Rhodotorula</i> sp <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923*	491/495 494/495	4 1	AF189937 <sup>T</sup> AY033643
EXF-3989	<i>Rhodotorula laryngis</i> <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923*	519/520 519/520	1 1	AF189937 <sup>T</sup> AY033643
EXF-3873	<i>Rhodotorula laryngis</i> <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923*	494/496 494/496	2 2	AF189937 <sup>T</sup> AY033643
EXF-3712	<i>Rhodotorula laryngis</i> – podoben <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923* – podoben	482/483 482/483	1 1	AF189937 <sup>T</sup> AY033643
EXF-3824	<i>Rhodotorula laryngis</i> – podoben <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923* – podoben	486/489 489/490	3 1	AF189937 <sup>T</sup> AY033643
EXF-3973	<i>Rhodotorula</i> sp* <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923*	518/518 511/518	0 7	FN868153 AY040648

Legenda: \* neobjavljen članek

Medtem ko so na filogenetskem drevesu (Slika 4) sevi EXF-3824, -3873, -3989, -4014, -4003 in -4068 tvorili isto skupino, pa je predstavljal sev EXF-3973 samostojno vejo z istim izhodiščem kot prej našteti sevi in *R. minuta*<sup>T</sup>.

Sev EXF-3922 smo uvrstili tudi v rod *Rhodotorula*, in sicer vrsto *Rhodotorula glacialis*, ker se sev ni razlikoval v zaporedju D1/D2 od tipskega seva CBS 10436 (Preglednica 24).

Preglednica 25: Ex oznake sevov za rod *Rhodotorula*, skupino *R. glacialis* in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov

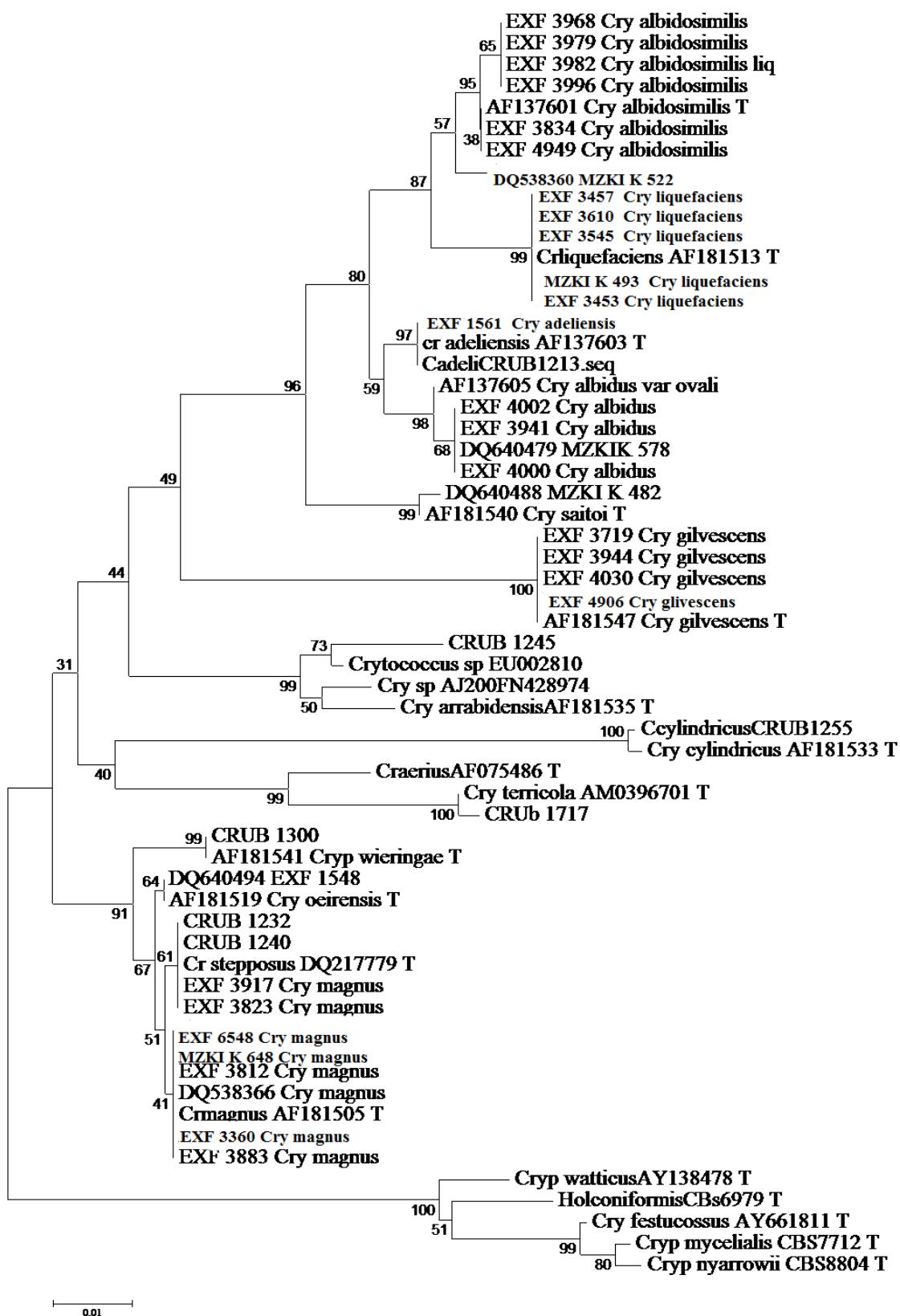
Ex oznaka	Določena vrsta	Ujemanje nt zaporedja z zaporedjem zadetka GenBank	Odstopanje (Δbp)	GenBank oznaka zadetka
EXF-3922	<i>Rhodotorula glacialis</i>	563/563	0	EF151258 <sup>T</sup>

Na filogenetskem drevesu (Slika 4) je sev poleg *R. glacialis*<sup>T</sup>.

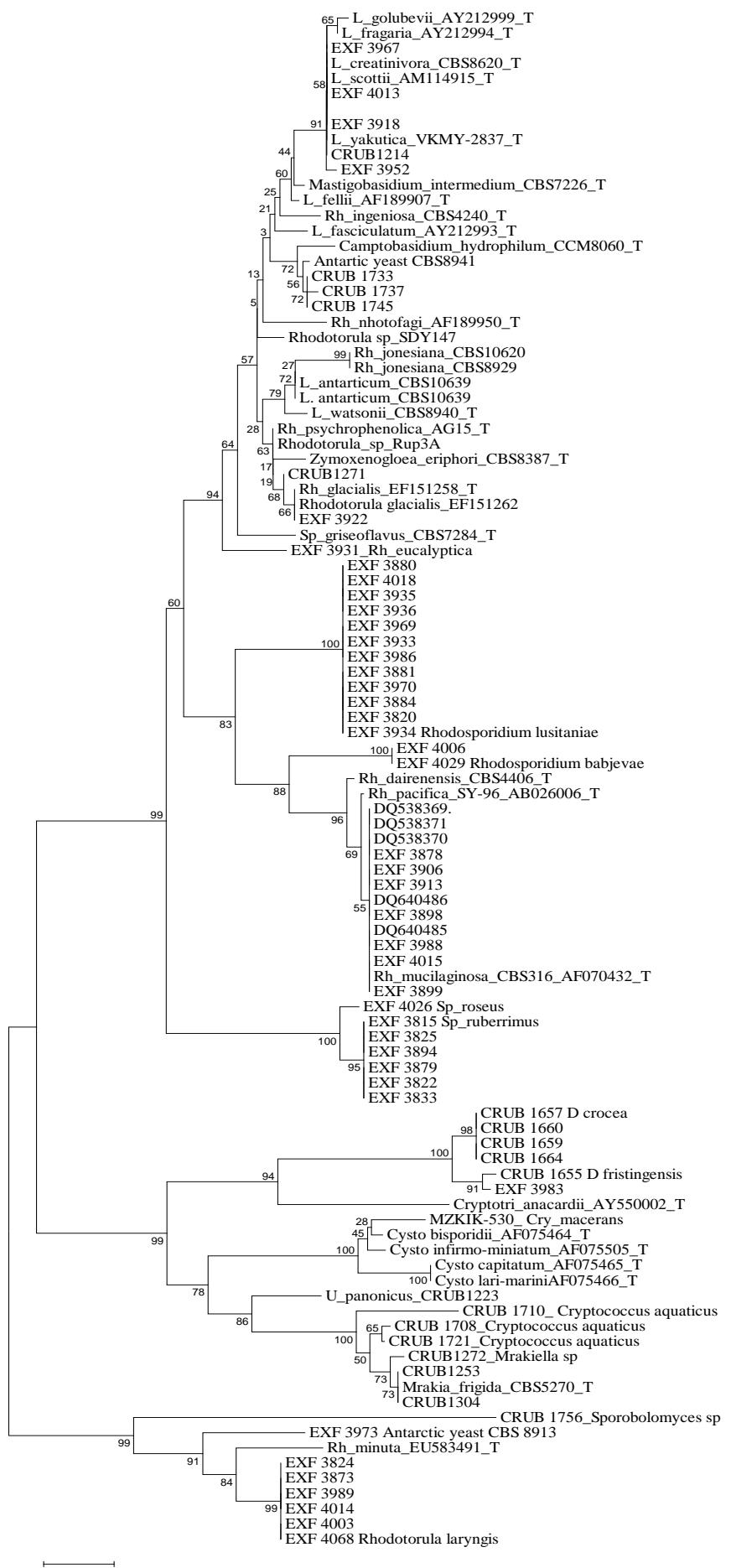
Trije sevi, ki so se razlikovali v zaporedju D1/D2 za več kot 6 bp od tipskega seva CBS 8499 vrste *R. eucalyptica*, verjetno predstavljajo novo vrsto (Preglednici 5, 25).

Preglednica 26: Ex oznake sevov za rod *Rhodotorula*, skupino *R. eucalyptica/R. phylia* in določene vrste na osnovi določanja nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 26S rDNA ter pripadajoče GenBank oznake zadetkov

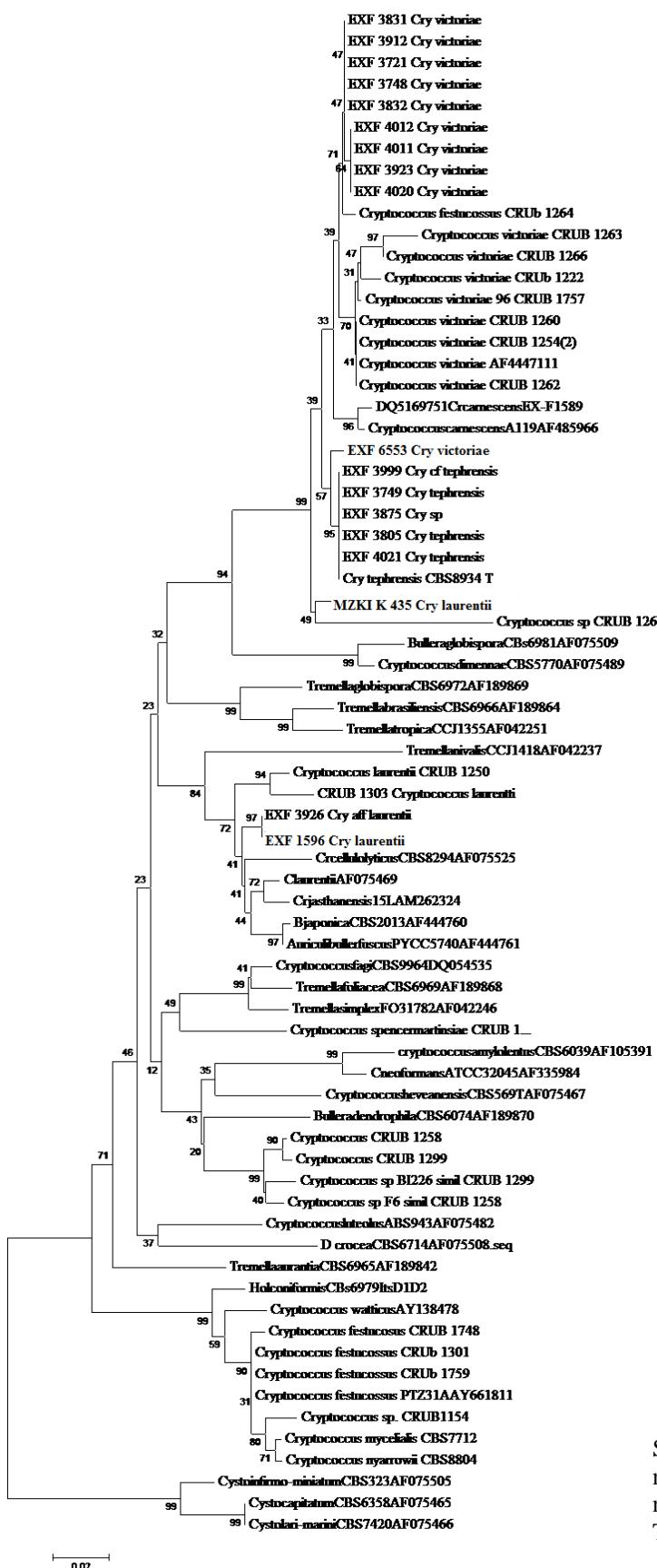
<b>Ex oznaka</b>	<b>Določena vrsta</b>	<b>Ujemanje nt zaporedja z zaporedjem zadetka GenBank</b>	<b>Odstopanje (Δbp)</b>	<b>GenBank oznaka zadetka</b>
EXF-4232	<i>Rhodotorula sp.</i> <i>Rhodotorula eucalyptica</i>	532/553	1	EU075183 <sup>T</sup>
EXF-4227	<i>Rhodotorula sp.</i> <i>Rhodotorula eucalyptica</i>	544/560	6	EU075183 <sup>T</sup>
EXF-3931	<i>Rhodotorula sp.</i> <i>Rhodotorula eucalyptica</i> <i>Rhodotorula phylia</i>	471/480 469/481	9 2	EU075183 <sup>T</sup> AF075471 <sup>T</sup>



Slika 3: Filogenetsko drevo izdelano po metodi distančnega združevanja najbližjega soseda a izolate iz reda Filobasidiales



Slika 4: Filogenetsko drevo izdelano po metodi distančnega združevanja najbližnjega soseda za izolate iz družine Microbotryomycetes



Slika 5: Filogenetsko drevo izdelano po metodi distančnega združevanja najbljižjega soseda za izolate iz družine Tremelalles

## 4.2 FIZIOLOŠKI TESTI

Preglednice 26-37 prikazujejo rezultate fizioloških testov izbranih izolatov v primerjavi z rezultati za pripadajoče tipske seve, ki so jih objavili različni avtorji v knjigi The Yeasts, a taxonomic study (Fonseca in sod., 2011; Sampaio, 2011a; Sampaio, 2011d; Kyung, 2011)

### 4.2.1 *Cryptococcus albidosimilis*

Kot pričakovano glukoze ni fermentiral noben izmed testiranih sevov, test DBB je bil za vse seve pozitiven, ekstracelularni škrob so tvorili vsi, razen EXF-3996 (Preglednica 26). Na gojišču s cikloheksimidom v koncentraciji 0,01 % so rastli vsi sevi, čeprav nekateri z zakasnitvijo oz. šibko (Preglednica 26). Tipski sev na gojišču s cikloheksimidom ni rastel (Preglednica 26). Na gojišču brez vitaminov sta rastla seva EXF-3979 in EXF-4949, kar ne sovpada s tipskim sevom (Preglednica 26). Arbutin so hidrolizirali vsi sevi, podatka za tipski sev nimamo. (Preglednica 26) Vsi sevi, razen EXF-4949, so hidrolizirali ureo (Preglednica 26).

Preglednica 27: Rezultati izbranih fizioloških testov za seve vrste *C. albidosimilis*

Test	EXF-3968	EXF-3979	EXF-3982	EXF-3996	EXF-3834	EXF-4949	CBS 7711
Fermentacija glukoze	–	–	–	–	–	–	–
Rast v prisotnosti cikloheksimida 100 ppm 0,01 %	1	1	1	+	w	1	–
Rast v gojišču brez vitaminov	–	+	–	–	–	+	–
DBB reakcija	+	+	+	+	+	+	+
Hidroliza uree	+	+	+	+	+	–	+
Hidroliza arbutina	+	+	+	+	+	+	/
Tvorba ekstracelularnega škroba	+	+	+	–	+	+	+

Legenda: Fermentacijski test in test odpornosti na cikloheksimid sta bila ocenjena po treh, sedmih, štirinajstih in enaindvajsetih dneh. Rezultat "–" označuje negativen rezultat, "+" označuje pozitiven rezultat, "s" počasno pozitiven rezultat, "1" zakasnen rezultat in "w" šibko reakcijo. Ostali testi so bili ocenjeni po različnih časih inkubacije (opisano v poglavju 3.5.1). Rezultat "+" označuje pozitiven rezultat, "–" pa negativen rezultat.

Podatkov o rasti tipskega seva na nitritu, kreatinu in kreatininu nimamo; rast na L-lizinu je variabilna. Zaznali smo rast na nitratu (razen EXF-3996), nitritu (razen EXF-3996), L-lizinu in kadaverinu (Preglednica 27). Na kreatinu, kreatininu in D-glikozaminu ni bilo rasti (Preglednica 27). Rezultati se, razen za sev EXF-3996, ujemajo z dostopnimi rezultati tipskega seva (Preglednica 27). Na gojišču z etilaminom ni bilo rasti, je bila šibka ali zakasnjena; pričakovali smo pozitiven oziroma počasi pozitiven rezultat (Preglednica 27).

Preglednica 28: Rezultati asimilacijskih testov za različne vire dušika sevov vrste *C. albidosimilis*

Dušikova spojina	EXF-3968	EXF-3979	EXF-3982	EXF-3996	EXF-3834	EXF-4949	CBS 7711
YCB	–	–	–	–	–	–	/
Nitrat	+	1	+	–	+	+	+
Nitrit	+	1	1	–	+	1	/
Etilamin	1	–	w	–	w	1	+/s
L-lizin	1	1	+	1	1	1	v
Kadaverin	+	1	+	+	1	1	+
Kreatin	–	–	–	–	–	–	/
Kreatinin	–	–	–	–	–	–	/
D-glukozamin	–	w	–	–	–	1	–

Legenda: Test je bil ocenjen po enem in po treh tednih. Temperatura inkubacije: 20 °C. Rezultat "–" označuje negativen rezultat, "+" označuje pozitiven rezultat, "s" počasno pozitiven rezultat, "1" zakasnjen rezultat in "w" šibko reakcijo.

V skladu s pričakovanji so sevi rastli na gojišču z D-glukozo, D-galaktozo, D-ksilozo, L-arabinozo, L-ramnozo, saharozo, maltozo,  $\alpha,\alpha$  trehalozo, celobiozo, salicinom, melezitozo, laktozo (razen EXF-3996 in -3834), glicerolom (razen EXF-3979, -3982 in -3996), sukcinatom, citratom, D-manitolom, etanolom (razen EXF-4949), L-malatom in galatom (razen EXF-3996 in -4949) (Preglednica 28). Na  $\alpha$ -metil-D-glukozidu, glicerolu, ribitolu, ksilitolu, D-glucitolu, mio-inozitolu, D-glukoronatu, proteokatehojski kislini in vanilni kislini so rastli vsi sevi (skupaj s tipskim) razen EXF-3996 (Preglednica 28).

Kot pričakovano sevi niso rastli na YNB, inulinu, metanolu, L-vinski kislini, galaktaratu in gentistični kislini (Preglednica 28).

Na D-arabinozi in melibiozi nismo pričakovali rasti, pa so rastli vsi sevi (Preglednica 27). Nasprotno na saharatu in D-glukonatu pri izbranih sevih ni bilo rasti, rezultati tipskega seva pa so pozitivni (Preglednica 28).

Tudi rast na D-ribozi in L-sorbozi je skladna s tipskim sevom, saj je ni bilo oziroma je bila šibka (razen EXF-3968, ki je rastel na D-ribozi ter EXF-4949, ki je raste na sorbozi) (Preglednica 28).

Podatkov o rasti tipskega seva na glukono- $\delta$ -laktonu, D-vinski kislini, m-vinski kislini, ferulični, veratrični, p-hidroksibenzojski, m-hidroksibenzojski in salicilni kislini, kateholu in fenolu nimamo; rast na škrobu je variabilna (Preglednica 28).

Preglednica 29: Rezultati asimilacijskih testov za različne vire ogljika sevov vrste *C. albidosimilis*

Ogljikova spojina	EXF-3968	EXF-3979	EXF-3982	EXF-3996	EXF-3834	EXF-4949	CBS 7711
YNB	—	—	—	—	—	—	—
D-glukoza	+	+	1	+	+	+	+
D-galaktoza	1	s	s	1	1	1	w/s
L-sorboza	w	w	v	—	w	+	—/s
D-riboza	+	w	—	w	w	—	—/s
D-ksiloza	1	1	+	w	+	1	+
L-arabinoza	+	s	1	s	1	1	+
D-arabinoza	1	1	+	s	+	+	—/s
L-ramnoza	+	1	1	w	1	+	+
Saharoza	1	+	+	+	+	+	+
Maltoza	+	+	+	1	+	+	+
α,α trehaloza	+	+	+	s	1	1	+
α-metil-D-glukozid	+	+	1	—	+	1	+
Celobioza	+	+	+	s	+	1	+
Salicin	+	+	+	+	+	1	+
Melibioza	+	+	+	1	+	+	—/s
Laktoza	1	1	1	—	—	+	+/s
Melezitoza	+	+	+	s	+	+	+
Inulin	w	—	w	w	w	—	—
Škrob	w	—	—	—	w	w	v
Glicerol	w	—	—	—	s	1	+
Ribitol	1	s	s	—	s	+	+/s
Ksilitol	+	1	s	—	1	1	+
D-glucitol	+	1	1	—	+	1	+
D-manitol	1	+	1	1	1	1	+
Galaktitol	1	1	w	w	w	1	—
mio-inozitol	s	s	s	—	s	1	+
Glukono-δ-lakton	w	—	—	1	—	1	/
D-glukonat	w	—	w	—	—	—	+/s
D-glukuronat	1	+	+	—	+	+	+
Sukcinate	+	s	1	1	1	1	+
Citrat	+	+	1	1	1	1	+
Metanol	w	—	w	—	w	—	—
Etanol	+	s	s	+	1	—	+
L-malat	+	+	+	1	+	1	+
L-vinska kislina	—	—	—	—	—	—	—
D- vinska kislina	—	—	—	—	—	—	/
m- vinska kislina	1	s	s	—	—	—	/
Saharat	—	—	—	—	—	—	+
Galaktarat	—	—	—	—	—	—	—
Proteokatehojska kislina	w	w	w	—	w	w	+
Vanilna kislina	w	w	w	—	w	w	+
Ferulična kislina	w	-	-	—	w	w	/
p-hidroksibenzojska kislina	w	1	w	—	1	w	/
m-hidroksibenzojska kislina	1	1	1	s	1	w	/
Galat	w	w	w	—	w	—	+
Salicilna kislina	—	—	—	—	—	—	/
Gentistična kislina	—	—	—	—	—	—	—
Katehol	—	—	—	—	—	—	/
Fenol	—	—	—	—	—	—	/

Legenda: Test je bil ocenjen po enem in po treh tednih. Temperatura inkubacije: 20 °C. Rezultat "—" označuje negativen rezultat, "+" označuje pozitiven rezultat, "s" počasno pozitiven rezultat, "1" zakasnen rezultat in "w" šibko reakcijo.



Slika 6: Kulture nekaterih sevov rodu *Cryptococcus* na poševnikih z MEA gojiščem.

Od leve proti desni: EXF-3912 (*C. victoriae*), EXF-3982 (*C. albidosimilis*), EXF-4012 (*C. victoriae*), EXF-3979 (*Rhodotorula* sp./*Erythrobasidium* klad sp. CBS 8923), EXF-4020 (*C. victoriae*), EXF-3968 (*C. albidosimilis*), EXF-3996 (*C. albidosimilis*).

**4.2.2 *Cryptococcus magnus/ Cryptococcus chernovii/ Filobasidium floriforme***  
Glukoze ni fermentiral noben izmed testiranih sevov (Preglednica 29). Prav tako so bili pozitivni test DBB, hidroliza arbutina in tvorba ekstracelularnega škroba. Rezultati so enaki tudi pri vseh treh tipskih sevih (Preglednica 29). Oba testirana seva sta rastla tudi na gojišču s cikloheskimidom in sta hidrolizirala arbutin, podatkov za tipske seve nimamo (Preglednica 29). Testirani in tipski sevi ne rastejo na gojišču brez vitaminov (Preglednica 29).

Preglednica 30: Rezultati izbranih fizioloških testov za seve *Cryptococcus magnus*/ *Cryptococcus chernovii*/ *Filobasidium floriforme*

Test	EXF- 3917	EXF- 3823	CBS 140	CBS 8679	CBS 6241
Fermentacija glukoze	—	—	—	—	—
Rast v prisotnosti cikloheksimida 100 ppm 0,01 %	+	w	/	/	/
Rast v gojišču brez vitaminov	—	—	—	—	—
DBB reakcija	+	+	+	+	+
Hidroliza uree	+	+	+	+	+
Hidroliza arbutina	+	+	/	/	/
Tvorba ekstracelularnega škroba	+	+	+	+	+

Legenda: Fermentacijski test in test odpornosti na cikloheksimid sta bila ocenjena po treh, sedmih, štirinajstih in enaindvajsetih dneh. Rezultat "—" označuje negativen rezultat, "+" označuje pozitiven rezultat, "s" počasno pozitiven rezultat, "1" zakasnen rezultat in "w" šibko reakcijo. Ostali testi so bili ocenjeni po različnih časih inkubacije (opisano v poglavju 3.5.1). Rezultat "+" označuje pozitiven rezultat, "—" pa negativen rezultat.

Glede na dostopne rezultate vsi tipski sevi in oba testirana seva rasteta na D-glukozi, D-galaktozi, D-ksilozi, L-arabinozi, D-arabinozi, saharozi, maltozi,  $\alpha,\alpha$  trehalozi, salicinu, laktozi, melezitozi, ksilitolu, D-glucitolu, D-manitolu, galaktikolu, sukcinatu, citratu in L-malatu (Preglednica 30). Na inulinu, melibiozi in gentistični kislini so bili vsi rezultati negativni (Preglednica 30).

Na L-sorbozi, ribitolu in L-ramnozi EXF-3917 ni rastel, EXF-3823, CBS 8679 in CBS 6241 imajo pozitiven, CBS 140 pa variabilen rezultat (Preglednica 30). Na D-ribozi se negativen rezultat naših izolatov ujema z rezultatom CBS 8679 oziroma CBS 140, kjer so rezultati variabilni (Preglednica 30). EXF-3823 in tipski sevi asimilirajo  $\alpha$ -metil-D-glukozid, celobiozo, *mio*-inozitol in D-glukuronat, EXF-3917 pa ne (Preglednica 30). Na D-glukonatu, D-vinski kislini, L-vinski kislini, proteokatehojski kislini, vanilni in salicilni kislini se rezultati ne skladajo s pričakovanimi – pri obeh testiranih sevih nismo zaznali rasti (Preglednica 30). EXF-3823 ni asimiliral škroba in se ne sklada s tipskimi sevi (Preglednica 30). EXF-3823 ni rastel na etanolu, tipska seva in EXF-3917 so asimilirali etanol, CBS 140 pa ima variabilne rezultate (Preglednica 30).

Za asimilacijo *m*-vinske kisline, ferulične, veratrične, *p*-hidroksibenzojske in *m*-hidroksibenzojske kisline ter katehola in fenola za tipske seve nimamo podatkov (Preglednica 30).

Preglednica 31: Rezultati za asimilacijskih testov za različne vire ogljika za seve *Cryptococcus magnus/ Cryptococcus chernovii/ Filobasidium floriforme*

<b>Spojina</b>	<b>EXF- 3917</b>	<b>EXF- 3823</b>	<b>CBS 140</b>	<b>CBS 8679</b>	<b>CBS 6241</b>
D-glukoza	+	+	+	+	+
D-galaktoza	1	1	+	+	+
L-sorboza	-	w	v	+	+/s
D-riboza	-	-	v	-	+/s
D-ksiloza	1	+	+	+	/
L-arabinoza	1	w	+	+	+
D-arabinoza	1	+	v	+	+/s
L-ramnoza	-	+	v	+	+
Saharoza	+	1	+	+	+
Maltoza	+	+	+	+	+
$\alpha,\alpha$ trehaloza	1	1	+	+	+
$\alpha$ -metil-D-glukozid	-	1	+	+	+
Celobioza	-	1	+	+	+
Salicin	w	1	+	+	v
Melibioza	-	w	-	-	-
Laktoza	1	1	+	+	+
Melezitoza	1	1	v	+	+
Inulin	-	-	v	-	-
Škrob	+	-	+	+	+/w
Glicerol	1	1	v	-	+/s
Ribitol	-	w	v	+	+/s
Ksilitol	1	w	+	+	/
D-glucitol	1	+	+	+	+
D-manitol	1	1	+	+	+/s
galaktitol	w	w	+/s	+	+/s
<i>mio</i> -inozitol	-	1	+	+	+
D-glukonat	-	-	+	+	s
D-glukuronat	-	1	+	+	/
Sukcinate	1	w	+	+	+
Citrat	s	w	+	+	+
Metanol	-	w	-	-	-
Etanol	1	-	v	+	w/s
L-malat	1	1	+	+	/
D- vinska kislina	-	-	+	+	/
L- vinska kislina	-	-	+	+	/
<i>m</i> - vinska kislina	-	1	/	/	/
Saharat	w	-	+	-	+
Galaktarat	w	-	+	-	/
Proteokatehojska kislina	-	-	+	+	/
Vanilna kislina	w	-	+	+	/
Ferulična kislina	w	-	/	/	/
Veratrična kislina	-	-	/	/	/
<i>p</i> -hidroksibenzojska kislina	w	-	/	/	/
<i>m</i> -hidroksibenzojska kislina	+	-	/	/	/
Galat	-	-	-	+	/
Salicilna kislina	-	-	+	+	+
Gentistična kislina	-	-	-	-	/
Katehol	-	-	/	/	/
Fenol	-	-	/	/	/

Legenda: Test je bil ocenjen po enem in po treh tednih. Rezultat "—" označuje negativen rezultat, "+" označuje pozitiven rezultat, "s" počasno pozitiven rezultat, "1" zakasnjen rezultat in "w" šibko reakcijo.

Testirana seva EXF-3917 in -3823 ter tipski sevi CBS 140, 8679 in 6241 asimilirajo etilamin, L-lizin, kadaverin, kreatinin in D-glukozamin (Preglednica 31). Na gojišču z nitratom ter kreatinom EXF-3917 ni rastel, EXF-3823 in tipska seva CBS 8679 in 6241 rasteta, za CBS 140 so rezultati variabilni (Preglednica 31). Na nitritu EXF-3917 ni rastel, EXF-3823 je rastel, o rasti tipskih sevov pa nimamo podatkov (Preglednica 31).

Preglednica 32: Rezultati asimilacijskih testov za različne vire dušika za seve *Cryptococcus magnus/ Cryptococcus chernovii/ Filobasidium floriforme*

Dušikova spojina	EXF-3917	EXF-3823	CBS 140	CBS 8679	CBS 6241
YCB	—	—	—	—	—
Nitrat	—	1	v	+	+
Nitrit	—	1	/	/	/
Etilamin	1	1	+	+	+
L-lizin	1	w	v	+	+/w
Kadaverin	1	1	+	+	/
Kreatin	—	w	v	+	+
Kreatinin	1	1	+	+	+
D-glukozamin	1	w	v	+	+/w

Legenda: Test je bil ocenjen po enem in po treh tednih. Rezultat "—" označuje negativen rezultat, "+" označuje pozitiven rezultat, "s" počasno pozitiven rezultat, "1" zakasnjen rezultat in "w" šibko reakcijo

#### 4.2.3 *Rhodosporidium lusitanie/ Rhodotorula colostri*

Fiziološki testi izbranih sevov filogenetske skupine *Rh. lusitanie/R. colostri* so prikazani v Preglednicah 32–34.

Kot pričakovano testirani sevi niso fermentirali glukoze, niso rastli na gojišču s cikloheksimidom in niso tvorili ekstracelularnega škroba (Preglednica 32). Test DBB je bil pri vseh sevih pozitiven, kar sovpada s tipskima sevoma (Preglednica 32). Vsi testirani sevi so hidrolizirali ureo in niso hidrolizirali arbutina; za tipska seva nimamo podatkov (Preglednica 32). Rast testiranih sevov na gojišču brez vitaminov se sklada z rezultatom tipskega seva CBS 7604 vrste *Rh. lusitanie*; tipski sev CBS 348 vrste *R. colostri* na gojišču brez vitaminov ne raste (Preglednica 32). Sposobnost rasti na gojišču brez vitaminov je fiziološki test, ki ločuje ti dve vrsti (Preglednica 32).

Preglednica 33: Rezultati izbranih fizioloških testov

Test	EXF-3934	EXF-4018	EXF-3881	CBS 7604	CBS 348
Fermentacija glukoze	—	—	—	—	—
Rast v prisotnosti cikloheksimida 100 ppm 0,01 %	—	—	—	—	-/w
Rast v gojišču brez vitaminov	+	+	+	+	—
DBB reakcija	+	+	+	+	+
Hidroliza uree	+	+	+	/	/
Hidroliza arbutina	—	—	—	/	/
Tvorba ekstracelularnega škroba	—	—	—	—	—

Legenda: Fermentacijski test in test odpornosti na cikloheksimid sta bila ocenjena po treh, sedmih, štirinajstih in enaindvajsetih dneh. Rezultat "—" označuje negativen rezultat, "+" označuje pozitiven rezultat, "s" počasno pozitiven rezultat, "1" zakasnjen rezultat in "w" šibko reakcijo. Ostali testi so bili ocenjeni po različnih časih inkubacije (opisano v poglavju 3.5.1). Rezultat "+" označuje pozitiven rezultat, "—" pa negativen rezultat

Testirani sevi na gojiščih z različnimi viri dušika niso rastli, razen na etilaminu z zakasnitvijo (Preglednica 33). Kot pričakovano na D-glukozaminu ni bilo rasti (Preglednica 33). Glede na rezultate tipskih sevov bi na nitratu in nitritu pričakovali rast (Preglednica 33). Za druge vire dušika nimamo podatkov o tipskih sevih.

Preglednica 34: Rezultati asimilacijskih testov za različne vire dušika za seve *Rhodosporidium lusitanie*/  
*Rhodotorula colostri*

Dušikova spojina	EXF-3934	EXF-4018	EXF-3881	CBS 7604	CBS 348
YCB	-	-	-	/	/
Nitrat	-	-	-	+	+
Nitrit	-	-	-	+	+
Etilamin	1	1	1	/	/
L-lizin	-	-	-	/	/
Kadaverin	-	-	-	/	/
Kreatin	-	-	-	/	/
Kreatinin	-	-	-	/	/
D-glukozamin	-	-	-	v	-

Legenda: Test je bil ocenjen po enem in po treh tednih. Temperatura inkubacije: 20 °C. Rezultat "—" označuje negativen rezultat, "+" označuje pozitiven rezultat, "s" počasno pozitiven rezultat, "1" zakasnen rezultat in "w" šibko reakcijo.

Glede asimilacije glukono- $\delta$ -laktona, L-malata, D-vinske kisline, m-vinske kisline, galaktarata, proteokatehojske in salicilne kisline ter katehola in fenola, za tipske seve nimamo podatkov (Preglednica 34).

Pri vseh testiranih in tipskih sevih je bila rast prisotna na D-glukozi, D-galaktozi,  $\alpha,\alpha$  trehalozi, salicinu, glicerolu, ribitolu, ksilitolu, D-glucitolu, D-manitolu, sukcinatu in etanolu (Preglednica 34). Pri vseh so bili rezultati negativni za asimilacijo D-riboze, L-ramnoze,  $\alpha$ -metil-D-glukozida, melibioze, laktoze, inulina, škroba, mio-inozitola, D-glukuronata, metanola in veratrične kisline (Preglednica 34).

Na gojišču z D-ksilozo so testirani sevi in CBS 7604 rastli, CBS 348 pa variabilno (Preglednica 34). Na melezitozi sevi niso rastli, za CBS 348 so značilni variabilni rezultati (Preglednica 34). Enako velja za CBS 7604 na saharatu; drugi sevi saharata niso asimilirali (Preglednica 34).

Rezultati testiranih sevov na L-arabinozi (razen EXF-3881), D-arabinozi, celobiozi, D-glukonatu in citratu (razen EXF-3881) ne ustrezajo rezultatom tipskih sevov (Preglednica 34).

Na podlagi dobljenih rezultatov fizioloških testov (kot so rast brez vitaminov, asimilacija saharoze in galaktikola), ki med seboj ločujejo vrsti *Rh. lusitanie* in *R. colostri* (Sampaio, 2011a), nam ni uspelo identificirati sevov do nivoja vrste (Preglednica 34).

Preglednica 35: Rezultati asimilacijskih testov za različne vire ogljika za seve *Rhodosporidium lusitanie*/  
*Rhodotorula colostri*

Ogljikova spojina	EXF-3934	EXF-4018	EXF-3881	CBS 7604	CBS 348
YNB	—	—	—	—	—
D-glukoza	+	1	+	+	+
D-galaktoza	1	s	1	+	+/s/w
L-sorboza	—	s	w	+	—
D-riboza	—	w	—	—	—
D-ksiloza	+	s	s	+	v
L-arabinoza	s	w	—	—	—
D-arabinoza	s	s	1	—	—
L-ramnoza	—	—	—	—	—
Saharoza	1	1	1	—	+/s
Maltoza	—	—	—	—	+/w/s
$\alpha,\alpha$ trehaloza	1	1	1	+	+
$\alpha$ -metil-D-glukozid	—	—	—	—	-/w
celobioza	—	—	—	v	+/w/s
Salicin	s	1	1	+	+/w/s
Melibioza	—	—	—	—	—
Laktoza	—	—	—	—	—
Melezitoza	—	—	—	—	v
Inulin	—	—	—	—	—
Škrob	—	—	—	—	—
Glicerol	w	+	s	+	+
Ribitol	1	s	1	+	+
Ksilitol	s	1	1	+	+
D-glucitol	1	s	s	+	+
D-manitol	s	s	1	+	+
Galaktitol	—	w	—	+	—
<i>mio</i> -inozitol	—	—	—	—	—
Glukono- $\delta$ -lakton	1	+	+	/	/
D-glukonat	—	—	—	+	w/s
D-glukuronat	—	—	—	—	—
Sukcinate	w	1	s	+	+/s
Citrat	—	—	w	+	+/s
Metanol	—	—	—	—	—
Etanol	s	s	+	+	+
L-malat	—	w	—	/	/
L-vinska kislina	—	—	—	+	—
D-vinska kislina	—	—	—	/	/
<i>m</i> -vinska kislina	—	—	—	/	/
Saharat	w	—	w	V	—
Galaktarat	—	—	-	/	/
Proteokatehojska kislina	—	—	w	/	/
Vanilna kislina	—	—	w	+	—
Ferulična kislina	—	—	—	+	—
Veratrična kislina	—	—	—	—	—
<i>p</i> -hidroksibenzojska kislina	w	w	w	+	—
<i>m</i> -hidroksibenzojska kislina	—	—	—	+	—
Galat	—	—	—	+	—
Salicilna kislina	—	—	—	/	+/w/s
Gentistična kislina	—	—	—	—	—
Katehol	w	w	w	/	/
Fenol	w	w	w	/	/

Legenda: Test je bil ocenjen po enem in po treh tednih. Temperatura inkubacije: 20 °C. Rezultat "—" označuje negativen rezultat, "+" označuje pozitiven rezultat, "s" počasno pozitiven rezultat, "1" zakasnjen rezultat in "w" šibko.

#### **4.2.4 *Erythrobasidium* klad sp. CBS 8923**

Sev EXF-3973 ni fermentiral glukoze, ni rastel na gojišču s cikloheksimidom in gojišču brez vitaminov in ni tvoril ekstracelularnega škroba (Preglednica 35). Test DBB je bil pozitiven, sev je hidroliziral ureo in arbutin (Preglednica 35).

Preglednica 36: Rezultati izbranih fizioloških testov za *Erythrobasidium* klad sp. CBS 8923

Test	EXF-3973
Fermentacija glukoze	—
Rast v prisotnosti cikloheksimida 100 ppm 0,01 %	—
Rast v gojišču brez vitaminov	—
DBB reakcija	+
Hidroliza uree	+
Hidroliza arbutina	+
Tvorba ekstracelularnega škroba	—

Legenda: Fermentacijski test in test odpornost na cikloheksimid sta bila ocenjena po treh, sedmih, štirinajstih in enaindvajsetih dneh. Rezultat "—" označuje negativen rezultat, "+" označuje pozitiven rezultat, "s" počasno pozitiven rezultat, "1" zakasnjen rezultat in "w" šibko reakcijo. Ostali testi so bili ocenjeni po različnih časih inkubacije (opisano v poglavju 3.5.1). Rezultat "+" označuje pozitiven rezultat, "—" pa negativen rezultat.

Rast na organskih spojinah: na citratu sev ni rastel, na sukcinatu je bila rast šibka (Preglednica 36). Na metanolu sev ni rastel, na etanolu je bila rast šibka (Preglednica 36).

Rast na aldaričnih kislinah je bila variabilna: sev ni rastel na L-malatu, na saharatu je bila rast zapoznela, na L-, D- in m-vinski kislini in galaktaratu pa ni rastel (Preglednica 36).

Na aromatičnih spojinah sev ni rastel (*m*-hidroksibenzojska, salicilna in gentistična kislina, galat in fenol) ozziroma je rastel šibko (proteokatehojska, vanilna, ferulična, veratrična in *p*-hidroksibenzojska kislina in katehol) (Preglednica 36).

Na ostalih ogljikovih spojinah je bila rast variabilna: sev ni rastel na L-sorbozi, maltozi,  $\alpha$ -metil-D-glukozidu, celobiozi, melibiozi, lakozi, ribitolu, ksilitolu, D-glucitolu, galaktikolu, *mio*-inozitolu in D-glukonatu. Rezultat je bil pozitiven na D-glukozni in D-ksilozi (Preglednica 36). Zakasnjen pozitiven rezultat je bil na L- in D- arabinozi, inulinu, škrobu, glicerolu in D-glukuronatu; počasno pozitiven na saharozi in glukono- $\delta$ -laktonu (Preglednica 36). Rast je bila šibka na D-galaktozi, D-ribozi, L-ramnozi,  $\alpha,\alpha$  trehalozi, salicinu, melezitozi in D-manitolu (Preglednica 36).

Preglednica 37: Rezultati asimilacijskih testov za različne vire ogljika seva *Erythrobasidium* klad sp. CBS 8923

Ogljikova spojina	EXF-3973
YNB	-
D-glukoza	+
D-galaktoza	w
L-sorboza	-
D-riboza	w
D-ksiloza	+
L-arabinoza	1
D-arabinoza	1
L-ramnoza	w
Saharoza	s
Maltoza	-
$\alpha,\alpha$ trehaloza	w
$\alpha$ -metil-D-glukozid	-
Celobioza	-
Salicin	w
Melibioza	-
Laktoza	-
Melezitoza	w
Inulin	1
Škrob	1
Glicerol	1
Ribitol	-
Ksilitol	-
D-glucitol	-
D-manitol	w
Galaktitol	-
<i>mio</i> -inozitol	-
Glukono- $\delta$ -lakton	s
D-glukonat	-
D-glukuronat	1
Sukcinate	w
Citrat	-
Metanol	-
Etanol	w
L-malat	+
L-vinska kislina	-
D-vinska kislina	-
<i>m</i> -vinska kislina	-
Saharat	1
Galaktarat	-
Proteokatehoj-ska kislina	w
Vanilna kislina	w
Ferulična kislina	w
Veratrična kislina	w
<i>p</i> -hidroksibenzojska kislina	w
<i>m</i> -hidroksibenzojska kislina	-
Galat	-
Salicilna kislina	-
Gentistična kislina	-
Katehol	w
Fenol	-

Legenda: Test je bil ocenjen po enem in po treh tednih. Temperatura inkubacije: 20 °C. Rezultat "-" označuje negativen rezultat, "+" označuje pozitiven rezultat, "s" počasno pozitiven rezultat, "1" zakasnen rezultat in "w" šibko reakcijo.

Sev EXF-3973 je šibko rastel na L-lizinu (Preglednica 37). Na drugih dušikovih spojinah ni rastel (Preglednica 37).

Preglednica 38: Rezultati asimilacijskih testov za različne vire dušika seva *Erythrobasidium* klad sp. CBS 8923

Dušikova spojina	EXF-3973
YCB	—
Nitrat	—
Nitrit	—
Etilamin	—
L-lizin	w
Kadaverin	—
Kreatin	—
Kreatinin	—
D-glukozamin	—

Legenda: Test je bil ocenjen po enem in po treh tednih. Temperatura inkubacije: 20 °C. Rezultat "—" označuje negativen rezultat, "+" označuje pozitiven rezultat, "s" počasno pozitiven rezultat, "1" zakasnen rezultat in "w" šibko reakcijo.

#### 4.3 DODATNI TESTI EKOLOŠKO ZANIMIVIH VRST

Zanimala nas je encimska aktivnost izbranih sevov, in sicer smo ugotavljali aktivnost amilaz, proteaz, esteraz, pektinaz in celulaz. Teste smo izvedli pri 5 in 25 °C, test za pektinazno aktivnost pa tudi pri dveh pH vrednostih (pH 5 in 7). Tvorbo sideroforjev smo ugotavljali v tekočem in na trdnem gojišču pri temperaturah 15 in 25 °C. Izbranim sevom smo merili velikost celic in kapsul po inkubaciji pri temperaturi 4 in 20 °C ter opazovali rast pri različnih temperaturah (4, 12, 20, 25, 30, 35, 37 in 42 °C). Rezultate encimskih testov, tvorbe sideroforjev, meritev celic in kapsul ter rasti pri različnih temperaturah prikazujejo Preglednice 38–41.

Med testiranimi sevi je bila amilazna aktivnost prisotna pri sevu EXF-3815 vrste *Sp. ruberrimus* var. *albus*/*S. pararoseus* pri obeh temperaturah ter pri sevu EXF-3983 vrste *D. frisingensis* pri nižji temperaturi (Preglednica 39). Proteazne aktivnosti pri 5 °C nismo ugotovili, pri 20 °C pa pri sevu EXF-3815 vrste *Sp. ruberrimus* var. *albus*/*S. pararoseus*, pri sevu EXF-3881 vrste *Rh. lusitanie* – podoben/*R. colostri* – podoben in sevu EXF-4003 vrste *R. laryngis* – podoben/*Erythrobasidium* klad sp. CBS 8923 (Preglednica 39, Slika 8). Esterazna aktivnost je bila prisotna pri 20 °C pri sevu EXF-3823 vrste *C. magnus*/*C. chernovii*/*Filobasidium* sp., pri obeh temperaturah pa pri sevu EXF-3926 *Cryptococcus* sp., sevu EXF-3748 vrste *C. victoriae*, sevu EXF-4021 vrste *C. tephrensis*, sevu EXF-4026 vrste *Sp. roseus*, sevu EXF-3815 vrste *Sp. ruberrimus* var. *albus*/*S. pararoseus* ter sevu EXF-3983 vrste *D. frisingensis* (Preglednica 38, Slika 7).

Hidrolizo pektina smo pordili le pri pri sevu EXF-3926 *Cryptococcus* sp., in sicer pri obeh temperaturah in pH vrednostih (Preglednica 39). Celulazna aktivnost je bila prisotna pri sevu EXF-3815 vrste *Sp. ruberrimus* var. *albus*/*S. pararoseus* le pri 5 °C, pri sevu EXF-3881 vrste *Rh. lusitanie* – podoben/*R. colostri* – podoben le pri 20 °C, pri obeh temperaturah pa pri sevu EXF-3968 vrste *C. albidosimilis*, sevu EXF-3823 vrste *C. magnus*/*C. chernovii*/*Filobasidium* sp., sevu EXF-3926 *Cryptococcus* sp., sevu EXF-3748 vrste *C. victoriae*, sevu EXF-4021 vrste *C. tephrensis*, in sevu EXF-3983 vrste *D. frisingensis* (Preglednica 38).

Sev EXF-3913 vrste *R. mucilaginosa* in sev EXF-3917 vrste *C. magnus*/*C. chernovii*/*F. floriforme* sta bila edina seva, pri katerih nismo potrdili nobene od zasledovanih encimskih aktivnosti (Preglednica 38).

Hadalin Baša N. Reševanje taksonomskih dilem pri bazidiomicetnih kvasovkah iz arktičnih ledenikov.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije

Preglednica 39: Rezultati encimskih testov za izbrane seve

Sev	Oznaka seva (EXF-)	Encim/T inkubacije v °C											
		Amilaza		Proteaza		Esteraza		Pektinaza pH 5		Pektinilaza pH 7		Celulaza	
		5	20	5	20	5	20	5	20	5	20	5	20
<i>C. albidosimilis</i>	3968	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
<i>C. magnus/C. chernovii/Filobasidium</i> sp.	3823	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+
<i>C. magnus/C. chernovii/Filobasidium floriforme</i>	3917	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Cryptococcus</i> sp.	3926	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. victoriae</i>	3748	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	+
<i>C. tephrensis</i>	4021	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	+
<i>C. albidus</i> var. <i>albidus</i> /var. <i>kuetzingii</i>	4002	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
<i>R. mucilaginosa</i>	3913	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Sp. roseus</i>	4026	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i> var. <i>albus</i> / <i>Sporidiobolus pararoseus</i>	3815	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	+	—
<i>D. frisingensis</i>	3983	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	+
<i>Rhodotorula</i> sp./ <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923	3973	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Rhodosporidium lusitanie</i> – podoben/ <i>Rhodotorula colostri</i> – podoben	3881	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	+
<i>R. laryngis</i> – podoben/ <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923*	4003	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—

Legenda: "+" označuje pozitiven rezultat, "—" označuje negativen rezultat, "w" pa šibek rezultat



Slika 7: Testiranje esterazne aktivnosti. Plošča po 5-dnevni inkubaciji na 20 °C.

Levi stolpec od zgoraj navzdol: EXF-4002 (*C. albidus*), -3931 (*Rhodotorula* sp.), -4021 (*C. tephrensis*); desni stolpec: EXF-3983 (*C. albidus* var. *kuetzingii*/ *C. albidus* var. *albidus*), -3748 (*C. victoriae*), -3926 (*Cryptococcus* sp.). Vidni beli obroči okoli kolonij, ki so precipitacije kalcijevih snovi, ki se oborijo zaradi kratkih maščobnih kislin, ki se sprostijo v agar.



Slika 8: Testiranje proteazne aktivnosti. Plošča po 5-dnevni inkubaciji na 20 °C.

Levi stolpec zgoraj EXF-3815 (*Sp. ruberrimus* var. *albus*/*S. pararoseus*), spodaj EXF-3913 (*R. mucilaginosa*), desni stolpec zgoraj EXF-3979 (*Rhodotorula* sp./*Erythrobasidium* klad sp. CBS 8923), spodaj EXF-3823 (*C. chernovii*/*C. magnus*/*F. floriforme*). Pri EXF-3815 viden prosojen kolobar okolji kolonije (cona razgradnje).

Šest sevov vrste *C. albidosimilis*, 4 seve vrste *C. victoriae* in 1 sev potencialno nove vrste *Rhodotorula* sp. smo testirali ali so sposobni tvoriti sideroforje pri dveh različnih temperaturah (15 in 25 °C) na trdnem in tekočem gojišču (Slika 9).



Slika 9: Testiranje producije sideroforjev. Gojišča po 14-dnevni inkubaciji na 15 °C.

Od leve proti desni EXF-4949 (*C. albidosimilis*), -3979 (*C. albidosimilis*), -3923 (*C. victoriae*), -3996 (*C. albidosimilis*), -3834 (*C. albidosimilis*), -4012 (*C. victoriae*), -3973 (*Rhodotorula* sp./*Erythrobasidium* klad sp. CBS 8923).

Tvorbo sideroforjev smo ugotovili le pri dveh sevih vrste *C. albidosimilis*. Pri EXF-3968 le v tekočem gojišču pri temperaturi 15 °C, pri EXF-3996 pa v tekočem gojišču pri temperaturah 15 in 25 °C in na trdnem gojišču pri 25 °C (Preglednica 39).

Preglednica 40: Rezultati testiranja produkcije sideroforjev v tekočem in na trdnem gojišču za izbrane seve

Sev	T inkubacije v °C	Oznaka seva (EXF-)	OD <sub>480 nm</sub>	c (mg/ml)	OD <sub>480 nm</sub>	c (mg/ml)	Test na trdnem gojišču	
		15	25	15	25			
<i>C. albidosimilis</i>	3968	0,279	0,329	0	0	–	–	–
	3996	0,299	0,355	0,281	0,256	–	+	–
	4949	0	0	0	0	–	–	–
	3834	0	0	0	0	–	–	–
	3979	0	0	0	0	–	–	–
	3982	0	0	0	0	–	–	–
<i>C.victoriae</i>	4020	0	0	0	0	–	–	–
	3923	0	0	0	0	–	–	–
	3912	0	0	0	0	–	–	–
	3748	0	0	0	0	–	–	–
<i>Rhodotorula</i> sp./ <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923	3973	0	0	0	0	–	–	–

Legenda: OD<sub>480 nm</sub> predstavlja največjo izmerjeno OD<sub>480 nm</sub>. Koncentracija c (mg/ml) je določena s pomočjo umeritvene krivulje deferoksiamin mezilata. Pri testu na trdnem gojišču rezultat "–" predstavlja negativen rezultat, "+" pa pozitiven rezultat.

Pri vseh opazovanih sevih je bila prisotna polisaharidna kapsula. Nismo ugotovili razlik v debelini kapsul ter velikostjo celic, če smo kulture inkubirali pri različnih temperaturah (Preglednica 40).

Preglednica 41: Rezultati meritev širine in dolžine celic ter debeline kapsule

Sev	Oznaka seva (EXF-)	T ( °C)	Širina celic (µm)	SD	Dolžina celic (µm)	SD	Debelina kapsule (µm)	SD
<i>C. albidosimilis</i>	3968	4	4,49	0,89	4,71	1,07	1,42	0,70
		20	3,77	0,06	4,35	1,37	1,21	0,68
<i>C. victoriae</i>	3926	4	4,06	0,85	4,09	0,95	0,91	0,51
		20	4,10	1,07	4,12	1,45	0,92	0,18
<i>C. victoriae</i>	3748	4	2,90	0,58	4,46	0,48	0,88	0,35
		20	2,80	0,47	4,33	0,68	0,87	0,23
<i>C. tephrensis</i>	4021	4	3,36	0,50	4,41	0,65	0,69	0,15
		20	3,37	0,71	4,46	0,96	0,84	0,36
<i>C. albidus</i> var. <i>kuetzingii</i> / <i>C. albidus</i> var. <i>albidus</i>	4002	4	6,48	1,57	6,81	1,68	1,16	0,40
		20	7,42	1,20	7,71	1,07	0,91	0,23
<i>R. mucilaginosa</i>	3913	4	3,80	0,71	3,97	0,75	0,80	0,28
		20	3,58	0,62	4,06	0,82	0,72	0,34
<i>Sporobolomyces roseus</i>	4026	4	3,86	0,63	5,42	0,89	0,90	0,41
		20	3,83	0,65	5,26	1,26	0,81	0,15
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i> var. <i>albus</i> / <i>Sporidiobolus pararoseus</i>	3815	4	4,05	1,06	6,93	1,17	0,82	0,19
		20	3,82	0,58	7,08	1,75	0,99	0,19
<i>D. frisingensis</i>	3983	4	3,13	0,54	5,27	0,65	0,23	0,20
		20	3,22	0,85	5,53	1,30	0,38	0,17
<i>Rhodotorula</i> sp./ <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923	3973	4	3,81	0,37	5,88	0,50	0,67	0,18
		20	3,72	0,68	5,77	0,41	0,66	0,19
<i>Rhodotorula</i> sp./ <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923	4003	4	3,24	0,70	3,58	0,55	0,79	0,42
		20	3,09	0,76	3,24	1,02	0,62	0,24

Celice so iz mlade kulture na gojišču YMA, inkubirane na dveh različnih temperaturah (T). Podano je povprečje rezultatov 20 meritev in pripadajoči standardni odklon (SD).

Vsi opazovani sevi rastejo v temperaturnem razponu od 4 do 30 °C (Preglednica 41). Sevi *C. magnus/C. chernovii/F. floriforme*, *Rhodosporidium lusitanie* – podoben/*Rhodotorula colostri* in *Rhodosporidium lusitanie* – podoben/*Rhodotorula colostri* – podoben pa šibko rastejo vse do 42 °C (Preglednica 41).

Preglednica 42: Rezultati testiranja rasti pri različnih temperaturah

<b>Sev</b>	<b>EXF oznaka seva</b>	<b>Temperatura inkubacije v °C</b>							
		<b>4</b>	<b>12</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>35</b>	<b>37</b>	<b>42</b>
<i>C. magnus/C. chernovii/F. floriforme</i>	3917	+	+	+	+	+	+	w	w
<i>C. magnus/C. chernovii/ Filobasidium</i> sp.	3823	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Rhodosporidium lusitanie</i> – podoben/ <i>Rhodotorula colostri</i>	3934	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Rhodosporidium lusitanie</i> – podoben/ <i>Rhodotorula colostri</i>	4018	+	+	+	+	w	w	w	w
<i>Rhodosporidium lusitanie</i> – podoben/ <i>Rhodotorula colostri</i> – podoben	3881	+	+	+	+	+	+	w	w
<i>Rhodotorula</i> sp./ <i>Erythrobasidium</i> klad sp. CBS 8923	3973	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>C. albidosimilis</i>	3968	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>C. albidosimilis</i>	3979	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>C. albidosimilis</i>	3982	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>C. albidosimilis</i>	3996	+	+	+	+	w	-	-	-
<i>C. albidosimilis</i>	3834	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>C. albidosimilis</i>	4949	+	+	+	+	+	-	-	-

Legenda: "+" označuje rast, "w" označuje šibko rast, "-" predstavlja negativni rezultat.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Led v polarnih okoljih je bil do nedavnega smatran kot izredno stabilno okolje, v katerem so mikroorganizmi zgolj naključno ujeti. Izkazalo se je, da so led in ledeniki na mikroskali veliko bolj dinamični. Raziskave na področju ekstremofilne mikrobiologije so bile v prvi vrsti namenjene študijam prokariontskih mikroorganizmov iz prepričanja, da so evkarionti nezmožni naseljevati taka območja. Študije zadnjih let pa odkrivajo prisotnost različnih evakariontskih organizmov v ekstremnih okoljih (Gunde - Cimerman in sod., 2005; Butinar in sod., 2006).

Prof. Nina Gunde - Cimerman in sodelavci s Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov se že nekaj let ukvarjajo s preučevanjem gliv v skrajnostnih okoljih – slanih vodah solin, slanih jezer in skrajno hladnih okolij. Izolati kvasovk, ki so preučevani v tem diplomskem delu, so bili leta 2003 zbrani na otočju Svalbard na Norveškem. Od skupno 115 sevov smo določili 8 askomicetnih in 107 bazidiomicetnih kvasovk.

Vsem izoliranim sevom smo določili nukleotidna zaporedja domene D1/D2 26S rDNA. S pomočjo uporabe orodja BLAST in podatkovne baze GenBank smo seve uvrstili v takson.

Znotraj debla Basidiomycota identificirane seve razvrstimo znotraj poddebla Pucciniomycotina in Agaricomycotina. V Pucciniomycotina imamo predstavnike razreda Agaricostilbomycetes (*Kondoa* sp.), Microbotryomycetes (*Rhodotorula* sp., *Leucosporidium* sp., *Rhodosporidium* sp., *Sporobolomyces* sp. in *Sporidiobolus* sp.) in Cystobasidiomycetes (*Sakaguchia* sp., *Erythrobasidium* klad sp. CBS 8923). V poddeblu Agaricomycotina smo določili seve znotraj razreda Tremellomycetes (*Cryptococcus* sp., *Filobasidium* sp., *Guehomyces* sp. in *Dioszegia* sp.).

Izolirane bazidiomicetne kvasovke smo umestili v 9 rodov, in sicer *Cryptococcus* (41 sevov), *Leucosporidiella* (4 sevi), *Sporobolomyces* (10 sevov), *Kondoa* (3 sevi), *Dioszegia* (1 sev), *Guehomyces* (1 sev), *Sakaguchia* (1 sev), *Rhodosporidium* (20 sevov) in *Rhodotorula* (25 sevov).

#### 5.1.1 Rod *Cryptococcus*

Spolno razmnoževanje pri rodu *Cryptococcus* ni znano, nekatere vrste so anamorfne oblike rodov iz redov Cystofilobasidiales, Filobasidiales in Tremellales. Vse vrste izrabljajo D-glukuronat in večina vrst tvori ekstracelularne, škrobu podobne polisaharide; vrste, ki ne tvorijo škrobu podobne polisaharide pa lahko izrabljajo mio-inozitol ter D-glukuronat. To jih razlikuje od večine vrst rodu *Rhodotorula*. Vrste rodu *Cryptococcus* niso sposobne fermentacije. Test DBB in ureazni test sta pozitivna (Fonseca in sod., 2011)

Posamezne vrste zavzemajo ekološko in geografsko zelo raznolika okolja, znani so tudi izolati iz skrajno hladnih okolij: *C. albidosimilis* (antarktična prst, arktični ledeniški led), *C. albidus* (led), *C. magnus* (ledeniški led), *C. glivescens* je omejen na hladna območja, znani so izolati iz humusa arktične tundre in ledeniškega ledu. Slednja vrsta je opisana tudi kot dominantna vrsta v prsti, ledu in ledeniški vodi dveh alpskih ledenikov v Italiji. *C. victoriae* so med drugim izolirali iz ledeniškega ledu na Arktiki in prsti (Aljaska, Sibirija) (Fonseca in sod., 2011).

Enainštirideset izolatov smo uvrstili v rod *Cryptococcus*. Osem izolatov smo določili kot *C. albidosimilis* in 1 izolat kot *C. albidosimilis* – podoben. Sedem izolatov izhaja iz vzorca ledeniškega ledu, 1 izolat iz ledu tik nad vzorcem 13 (tj. led ob robu ledenika) in 1 izolat iz vzorca subglacialnega ledu. V vrsto *C. albidus* smo uvrstili 4 seve, ki izhajajo iz različnih vzorcev: izcedna voda, subglacialni led, morska voda ob ledeniku in morska voda ob izhodu iz fjorda. Iz vsakega vzorca po 1 sev. Tri preučevane seve smo določili kot vrsto *C. glivescens*. Izolirani so iz vzorcev vode iz bistrega potoka, ledeniškega ledu in izcedne vode. Tri seve iz rodu *Cryptococcus* smo uvrstili v vrsto *C. tephrensis*. Dva seva izhajata iz vzorca morske vode ob ledeniku in 1 sev iz izcedne vode. Trinajst sevov, ki so večinoma določeni kot *C. victoriae*, prihaja iz različnih vzorcev: voda iz bistrega potoka, izcedna voda, subglacialni led, morska voda ob ledeniku, morska voda ob izhodu iz fjorda. Dva seva (EXF -4087 in -3926) iz rodu *Cryptococcus* verjetno predstavlja novo vrsto, ki je sorodna vrstam *C. laurentii* in *C. rajasthanensis*. Oba seva izhajata iz vzorca subglacialnega ledu. Sedem sevov nam ni uspelo določiti do nivoja vrste, ker pripadajo ozkosorodnim *C. chernovii*, *C. magnus* in *F. floriforme*. Izhajajo iz vzorcev subglacialnega ledu, ledeniškega ledu, morske vode ob ledeniku in morske vode ob izhodu iz fjorda (Preglednici 4, 5).

Znotraj izoliranih sevov iz rodu *Cryptococcus* ostajajo nekateri izolati, za katere bi bila potrebna dodatna analiza zaporedij ITS. Ta je nujna za razlikovanje med podvrstami znotraj vrste *C. albidus*. Sevi podvrst *kuetzingii* in *albidus* se razlikujejo le v treh nukleotidih. Prav tako razlikovanje med *C. victoriae* in drugimi vrstami znotraj filogenetske skupine *victoriae* ni možno na fiziološkem nivoju, ampak zahteva primerjavo zaporedij D1/D2 in/ali zaporedij ITS (Fonseca in sod., 2011).

Dodatne analize (ITS, fiziološki testi) bi bile potrebne tudi za skupino vrst *C. chernovii/C. magnus/Filobasidium floriforme*. *C. magnus* je ozkosoroden s *F. floriforme* in *F. elegans*, zato je razlikovanje možno le z analizo zaporedij ITS. *C. chernovii* od *C. magnus* ločimo po tem, da lahko izrablja galat, toda ne saharata ali galaktarata. Glede na rezultate fizioloških testov bi EXF-3917 določili kot *C. magnus*, ker ne asimilira galata, saharat in galaktarat pa. Za razlikovanje od *F. floriforme* pa bi bila potrebna analiza zaporedja ITS (Fonseca in sod., 2011).

### **5.1.2 Rod *Leucosporidiella* in rod *Leucosporidium***

Kvasovke iz rodu *Leucosporidiella* so anamorfi teleomorfnega rodu *Leucosporidium* (Sampaio, 2011c). Pripadniki obenih rodov ne fermentirajo glukoze, ne asimilirajo mio-inozitola, ne proizvajajo škroba. DBB in ureazni test sta pozitivna (Sampaio, 2011c; Sampaio, 2011d).

Pri vrsti *L. yacutica* je poznan samo en sev, izoliran iz trajno zamrznjene prsti v Sibiriji. Od tam je izolirana tudi *L. creatinivora*, pa tudi iz subglacialnih sedimentov alpskega ledenika v Italiji in alpske prsti. Glede na poznane izolate je kvasovka, katere glavno okolje je prst in je prilagojena na hladna okolja (Sampaio, 2011c).

*Le. scotii* so izolirali iz zemlje in zamrznjene govedine v Avstraliji ter različnih okolij na Antarktiki (morska voda, zemlja, mah in slana jezera). Kot kaže je *Le. scotii* precej razširjena vrsta tako v hladnih kot zmernih podnebjjih. Najden je bil tudi kot prevladujoča kvasovka v gozdni prsti (Slovaška), v prsti tundre (Rusija), na morskih algah, v onesnaženih rekah na Portugalskem in listnem odpadu v mediteranskih gozdovih. Filogenetsko soroden z *L. fellii*, *L. golubevii*, štirimi vrstami rodu *Leucosporidiella* in *Mastigobasidium intermedium*. Skupaj tvorijo red Leucosporidiales. Ločimo jih glede na fiziološke teste in analizo domene D1/D2 ter domene ITS (Sampaio, 2011d).

Trije izolati pripadajo ozkosorodnim vrstam *L.creatinivora*, *Le. scotii* in *L. yakutica* ter so izolirani iz morske vode ob ledeniku. En sev smo določili kot *L. muscorum*. Izhaja iz vzorca izcedne vode (Preglednice 4, 13, 14) .

Ker je *L. creatinivora* ozkosorodna z *L. yakutica* (1 razlika v domeni D1/D2 in 3 razlike v domeni ITS) in *Le. scotii* (1 razlika v domeni D1/D2 in 4 razlike v domeni ITS), bi za seve EXF-4013, -3967, -3918 morali izvesti dodatne analize zaporedja ITS in fiziološke teste (Sampaio, 2011c).

### **5.1.3 Rod *Sporobolomyces* in rod *Sporidiobolus***

Pripadniki rodu *Sporobolomyces* ne fermentirajo sladkorjev, ne producirajo škrobu podobnih snovi, test DBB in ureazni test sta pozitivna (Hamamoto in sod., 2011). Kvasovke iz rodu *Sporidiobolus* ne fermentirajo sladkorjev, ne asimilirajo D-glukuronata in mio-inozitola. Uporaba nitrata je variabilna. Ne tvorijo škrobu podobnih snovi (Sampaio, 2011e).

Vrsti *Sp. roseus* in *Sp. ruberrimus* do sedaj nista bili izolirani iz izjemno hladnih okolij. Kot navaja Hamamoto in sod., 2011 je *Sp. roseus* razširjen v filosferi različnih vrst rastlin, zraku in morski vodi, poznani so sevi iz geografsko različnih okolij Evrope, Somalije ter Indonezije. Za *Sp. ruberrimus* (sinonim *Sporobolomyces ruberrimus* var. *albus*) so znani samo izolati iz zraka na Japonskem.

*S. pararoseus*: Anamorf je vrsta *Sporobolomyces shibatanus*. Izoliran je bil iz zemlje, zraka, različnih rastlinskih materialov in morske vode pretežno iz Azije ter Severne

Amerike. Uvrščamo ga v filogenetsko skupino *pararoseus – metaroseus*, ki vključuje tudi več nespolnih vrst (*Sporobolomyces* spp.) in *S. metaroseus*. *S. pararoseus* in *S. metaroseus* imata teliospore elipsoidne oblike, medtem ko so teliospore ostalih vrst rodu *Sporidiobolus* sferične oblike. Filogenetska skupina zajema vrste, ki so med seboj težko ločljive na podlagi fenotipskih kriterijev. Vrsto *S. pararoseus* od drugih vrst v rodu loči nezmožnost rasti na nitratu (razen *S. longisculus*) in D-ribozi (ki je pozitivna za druge vrste in spremenljiva za *S. johnsonii* in *S. salmonicolor*) (Sampaio, 2011e).

V to skupino smo uvrstili 10 izolatov. En izolat iz vzorca morske vode ob ledeniku, smo določili kot *Sp. roseus*. Ostale smo določili kot *Sporobolomyces ruberrimus* var. *albus/Sporidiobolus pararoseus*. Izolirani so bili iz različnih vzorcev: 4 izolati iz subglacialnega ledu, 2 izolata iz ledu ob robu ledenika in 2 izolata iz vzorcev ledeniškega ledu (Preglednici 4, 5).

Za končno določitev sevov EXF-4223, -3894, -3815, -4070, -3833, -3879, -3825, -4237 in -3822, bi morali analizirati še zaporedja ITS in/ali izvesti fiziološke teste.

#### **5.1.4 Rod *Rhodosporidium***

Geografska razširjenost *Rh. lusitanie* je za zdaj omejena na Portugalsko, kjer je bil izoliran iz gozdne prsti in listnega odpada. Razširjenost in pogostost vrste *Rh. babjevae* je izjemna. Znani so izolati iz Evrope, Južne in Severne Amerike ter Azije. Najdemo jo na različnem rastlinskem materialu – prsti, zraku, sladki in slani vodi. Večina sevov *Rh. diobovatum* je bila izoliranih iz morskih in rečnih okolij. Naseljuje zelo raznolika vodna okolja vključno s koralnimi grebeni na Floridi in hidrotermalnimi vrelci. Drugi izolirani sevi so iz kopenskih okolij, najpogosteje iz prsti in rastlinskega materiala (Sampaio, 2011b).

Iz različnih vzorcev – morska voda ob ledeniku, ledeniški led in subglacialni led, smo izolirali 17 sevov, ki so sorodni vrstama *Rh. lusitanie* ter *R. colostri*. Od teh se 7 sevov razlikuje od tipskih sevov za več kot 6 bp in bi lahko predstavljali novo vrsto. Tri seve smo uvrstili v skupino *R. glutinis sensu stricto*. Izhajajo iz vzorca ledeniškega ledu (Preglednici 4, 5).

*Rh. lusitanie* je glede na analize zaporedij domene D1/D2 LSU rRNA ozkosoroden z *Rhodotorula colostri*. Zaporedji se razlikujeta v 11 nukleotidih. Za razlikovanje so pomembni tudi določeni fiziološki testi (kot so asimilacija saharoze, galaktikola in rast brez vitaminov) (Sampaio, 2011b). Ker nam na podlagi dobljenih rezultatov teh ključnih fizioloških testov, ki ločujejo med seboj vrsti *Rh. lusitanie* in *R. colostri* (Sampaio, 2011b), ni uspelo določiti sevov do nivoja vrste, bi bilo treba v prihodnje ponoviti fiziološke teste in vključiti čim več sevov.

#### **5.1.5 Rod *Rhodotorula***

*R. mucilaginosa* je ena najbolj ubikvitarnih bazidiomicetnih kvasovk. Najdemo jo v različnih naravnih habitatih – v zemlji, razpadajočem rastlinskem materialu kot tudi

sladkih jezerih, celinskih vodah, oceanih in globokomorskih okolijih. Prisotna je tudi v skrajnih okolijih, kot so izjemno kisle izcedne vode rudnikov urana in hladna okolja. Je tudi del normalne mikroflore ljudi (Sampaio, 2011a). *R. glacialis* so izolirali iz blata iz območja taljenja na jeziku ledenika in ledeniške kriokonitne kotanje (Margesin in sod., 2007). Pri *R. laryngis* so poznani izolati v povezavi s človekom in iz naravnih okolij (morska voda in led). Vrsta *R. colostri* je relativno pogosta, najdena v povezavi z rastlinami, razpadajočim rastlinskim materialom, v kopenskih okolijih in sladki vodi. Znani so izolati iz Evrope (Portugalska, Nemčija, Rusija) in Južne Amerike (Argentina) (Sampaio, 2011d). *R. eucalyptica* so izolirali iz prsti nasada evkaliptov (Pohl in sod., 2011), izolati *R. phylia* pa so iz okolij v povezavi z rastlinami, razpadajočega lesa, hroščev, ki živijo v lesu (Sampaio, 2011a). Znani so širje izolati *R. glutinis*: iz zraka in sadja v Evropi ter morske vode na Floridi (Sampaio, 2011a).

Iz rodu *Rhodotorula* smo 8 sevov določili kot vrsto *Rhodotorula mucilaginosa*. Izhajajo iz vzorcev subglacialnega ledu, morske vode ob ledeniku in ledeniškega ledu. En sev smo uvrstili v vrsto *R. glacialis*. Izhaja iz vzorca izcedne vode. Trije sevi se za več kot 6 bp razlikujejo od tipskega seva *R. eucalyptica* in verjetno predstavljajo novo vrsto. Ti sevi so izolirani iz vzorca subglacialnega ledu in ledeniškega ledu. Dva seva iz rodu *Rhodotorula* smo določili kot vrsto *R. laryngis*. Izhajata iz morske vode ob ledeniku in subglacialnega ledu. Tudi preostalih 11 sevov, ki izhajajo iz različnih vzorcev (zemlja kontaminirana z nafto, subglacialni led, morska voda ob ledeniku in ledeniški led) najverjetneje pripada vrsti *R. laryngis* (Preglednici 4, 5).

Včasih je bila *R. glutinis* smatrana za zelo razširjeno vrsto, ki je vključevala 370 sevov. Ta uvrstitev je temeljila le na nekaj fizioloških testih in značilnostih, kot so produkcija rdečega ali oranžnega pigmenta. Veliko rezultatov fizioloških testov je bilo definiranih kot variabilni. Sledile so različne molekularne raziskave, ki so predlagale različne uvrstiteve. Nazadnje so oblikovali *R. glutinis sensu stricto* skupino, ki poleg *R. glutinis* zajema še *R. graminis* in *Rh. babjevae*. Večina sevov, ki so bili prej smatrani za *R. glutinis*, je uvrščenih v vrsto *Rh. babjevae* in *Rh. kratochvilovae*. Razlikovanje med vrstami znotraj skupine *R. glutinis sensu stricto* temelji na fizioloških testih zmožnosti asimilacije D-ksiloze, D-riboze, ribitol, D-manitola, D-glucitol in ksilitola ter na molekularnih analizah zaporedij domene D1/D2 in domene ITS (Sampaio, 2011a). V diplomskem delu v to skupino spadajo sevi EXF-4006, 4029 in -4236.

Iz rodu *Kondoa* smo določili 2 seva vrste *K. aeria*, ki sta izolirana iz subglacialnega ledu in morske vode ob ledeniku. En sev smo določili kot *Kondoa* sp. Izhaja iz subglacialnega ledu (Preglednici 4, 5).

Iz rodov *Dioszegia*, *Guehomyces* in *Sakaguchia* smo izolirali po 1 sev. Kot *D. frisingensis* smo določili izolat iz morske vode ob obali na sredini zaliva; *G. pullulans* izhaja iz vzorca morske vode ob ledeniku, *S. dacryoidea* pa smo izolirali iz morske vode ob ledeniku (Preglednici 4, 5).

Kot smo že omenili so se izoblikovale skupine, katerih natančna določitev do vrste znotraj naših raziskav ni bila dovolj uspešna. Potrebne bi bile predvsem dodatne analize na molekularnem nivoju (analiza zaporedij ITS in IGS) in fiziološki testi na nekaterih skupinah, ki niso bile vključene v obravnavo na fiziološkem nivoju. Dodatne raziskave bi vodile v razvrstitev v že znane, najverjetnejše pa tudi v še neopisane taksone.

Na izbranih sevih ekološko zanimivih vrst smo izvedli tudi nekatera testiranja na ekološkem nivoju: encimska aktivnost, tvorba sideroforjev, rast pri različnih temperaturah, velikost celic in kapsul.

Samo pri dveh od štirinajstih testiranih sevov nismo potrdili nobene encimske aktivnosti. Pogosteje smo ugotovili esterazno in celulazno aktivnost. Razgradnjo pektina smo potrdili le pri enem izmed testiranih sevov. Raziskave encimskih aktivnosti dajejo pozitivne rezultate tudi pri nizkih temperaturah, kar je biotehnološko zanimivo. Izjema je proteazna aktivnost, ki smo jo ugotovili le pri 20 °C (Preglednica, 38). V raziskavi, ki jo je izvedla Selbmann in sod. (2014), so izolate kvasovk iz vzorcev skal iz različnih izjemno hladnih okolij testirali za različne encimske aktivnosti pri 4 °C. Pogosteje so ugotovili esterazno in ureazno aktivnost, proteazne in celulazne aktivnosti niso potrdili. Celulolitične aktivnosti prav tako ni ugotovila Brizzio in sod. (2007).

Pri dveh sevih vrste *C. albidosimilis* smo ugotovili tvorbo sideroforjev (Preglednica 39). Glede na to, da je sposobnost tvorjenja sideroforjev ena od prilagoditev mikroorganizmov na osiromašeno okolje, smo pričakovali, da bomo tvorbo sideroforjev ugotovili pri več izolatih. Connell in sod. (2011) so potrdili tvorjenje sideroforjev pri izolatih iz izjemno hladnih okolij iz roda *Dioszegia*.

Testiranje rasti pri različnih temperaturah je razkrilo, da obravnavane kvasovke ne zadostujejo kriterijem psihrofilnosti, saj rastejo tudi pri temperaturah višjih od 25 °C (Preglednica 41).

Vsi opazovani sevi imajo kapsulo. V rezultatih ne vidimo signifikantne razlike v debelini kapsule in velikosti celic glede na različne temperature (Preglednica 40). Pri nižji temperaturi smo pričakovali debelejšo kapsulo, glede na hipotezo, da je kapsula glavna

zaščita celice pred zamrzovanjem in posledicami zamrzovanja. Zaključimo lahko le, da prisotnost kapsule omogoča preživetje v ekstremnih okoljih. Z raziskavo s širšim naborom sevov, vključeno kontrolo, ki bi lahko bila bazidiomicetna kvasovka iz nekega drugega okolja in mogoče optimizirano (natančnejšo) metodo, bi potencialno lahko prišli do drugačnih rezultatov.

## 5.2 SKLEPI

- Arktični ledeniki so okolje, ki ga izmed gliv naseljujejo predvsem bazidiomicetne kvasovke.
- S taksonomsko analizo na različnih nivojih smo določili 8 askomicetnih in 107 bazidiomicetnih kvasovk. Izolirane bazidiomicetne kvasovke smo uvrstili v 9 rodov. In sicer *Cryptococcus* (41 sevov), *Leucosporidiella* (4 sevi), *Sporobolomyces* (10 sevov), *Kondoa* (3 sevi), *Dioszegia* (1 sev), *Guehomyces* (1 sev), *Sakaguchia* (1 sev), *Rhodosporidium* (20 sevov) in *Rhodotorula* (25 sevov). En sev smo določili le kot Basidiomycota sp.
- Pri kvasovkah, izoliranih iz izjemno hladnih okolij smo potrdili kapsulo, ki celice ščiti med procesi zamrzovanja in odtaljevanja.
- Pri dveh sevih vrste *C. albidosimilis* smo ugotovili tvorjenje sideroforjev.
- Pri nekaterih sevih izbranih vrst smo potrdili amilazno, proteazno, esterazno, pektinazno in celulazno aktivnost. Pri testiranih sevih sta bili pogostejši esterazna in celulazna aktivnost.
- Encimi so aktivni tudi pri nizkih temperaturah.
- Testirane kvasovke ne zadostujejo kriterijem psihrofilnosti, saj rastejo tudi pri temperaturah višjih od 25 °C.

## 6 POVZETEK

Izjemno hladna okolja Arktičnih ledenikov so mikrobiološko slabo raziskana. Študije zadnjih let odkrivajo prisotnost evkariontskih organizmov v teh ekstremnih okoljih. Glice so bile izolirane iz različnih habitatov – rastlinje, permafrost, voda, sneg in ledeniški led. Izjemno hladna okolja povezujemo z mnogimi okoljskimi stresnimi dejavniki, katerim pa uspešno kljubujejo mikroorganizmi, ki so razvili različne morfološke in fiziološke prilagoditve.

Predmet raziskovanja tega diplomskega dela so kvasovke iz vzorcev nabranih leta 2003 na otočju Svalbard na Norveškem. S taksonomsko analizo na več nivojih smo izolirane kvasovke identificirali in uvrstili v znane taksone. Vsem kvasovkam smo določili nukleotidno zaporedje domene D1/D2 26S rDNA. Izdelali smo filogenetska drevesa na podlagi katerih smo na izbranih skupinah izvedli še dodatne taksonomske analize – fiziološke teste, kot so asimilacija različnih virov ogljika in dušika, fermentacija glukoze, hidroliza arbutina ter uree, rast na gojišču s cikloheksimidom in gojišču brez vitaminov, test DBB ter ugotavljanje tvorjenja ekstracelularnega škroba. Sledili so dodatni testi ekološko zanimivih skupin. Izbrane seve smo testirali za aktivnost amilaze, proteaze, esteraze, pektinaze in celulaze; ugotavliali smo tvorbo sideroforjev na trdnem in v tekočem gojišču in merili velikost celic in debelino kapsul po inkubaciji pri temperaturi 4 in 20 °C.

Od skupno 115 sevov smo določili 8 askomicetnih in 107 bazidiomicetnih kvasovk. Bazidiomicetne smo razvrstili v dve poddebbli. Sevi iz poddebla Pucciniomycotina so razvrščeni v 3 razrede, od tega je 46 izolatov iz razreda Microbotryomycetes in 14 iz Cystobasidiomycetes. 3 izolati so iz razreda Agaricostibolomycetes. Vseh 43 sevov iz poddebla Agaricomycotina je iz razreda Tremellomycetes. Izolirane bazidiomicetne kvasovke smo umestili v 9 rodov, in sicer *Cryptococcus* (41 sevov), *Leucosporidiella* (4 sevi), *Sporobolomyces* (10 sevov), *Kondoa* (3 sevi), *Dioszegia* (1 sev), *Guehomyces* (1 sev), *Sakaguchia* (1 sev), *Rhodosporidium* (20 sevov) in *Rhodotorula* (25 sevov). Določili smo naslednje vrste: *C. albidosimilis*, *C. albidus*, *C. glivescens*, *C. tephrensis*, *C. victoriae*, *L. muscorum*, *Sp. roseus*, *K. aeria*, *D. frisingensis*, *G. pullulans*, *S. dacryoidea*, *R. mucilaginosa* in *R. glacialis*. 3 sevi iz rodu *Rhodotorula* in 2 seva iz rodu *Cryptococcus* najverjetneje predstavljajo novo vrsto. Oblikovale so se tudi nekatere skupine ozko sorodnih sevov, kjer analiza D1/D2 ni zadostovala za določitev do vrste in bi bile potrebne dodatne analize zaporedij ITS ter določeni fiziološki testi.

Pri ekološko zanimivih skupinah smo pri določenih sevih potrdili prisotnost nekaterih encimskih aktivnosti in tvorbo sideroforjev (*C. albidosimilis*). Pri testiranih vrstah iz rodu *Cryptococcus* sta pogosteji esterazna in celulazna aktivnost, pri tistih iz rodu *Rhodotorula* pa proteazna ter celulazna aktivnost, obe samo pri 20 °C. Pri vrsti *D. frisingensis* smo potrdili esterazno in celulazno aktivnost pri obeh temperaturah ter amilazno pri 5 °C. *Sp. roseus* ima prisotno estreznou aktivnost, *Sporobolomyces ruberrimus* var.

*albus/Sporidiobolus pararoseus* pa amilazno, estrezano in celulazno aktivnost pri obeh temperaturah ter proteazno aktivnost pri 20 °C.

Vsi opazovani sevi imajo polisaharidno kapsulo, povezave med debelino kapsule in temperaturo pa nismo našli.

## 7 VIRI

- Anesio A. M., Hodson A. J., Fritz A., Psenner R., Sattler B. 2009. High microbial activity on glaciers: importance to the global carbon cycle. *Global Change Biology*, 15: 955–960
- Atkin C. L., Neilands J. B., Phaff H. J. 1970. Rhodotorulic acid from species of *Leucosporidium*, *Rhodosporidium*, *Sporidiobolus* and *Sporobolomyces* and a new alanine-containing ferrichrome from *Cryptococcus melibiosum*. *Journal of Bacteriology*, 1970, 3: 722–733
- Boekhout, T., Fell J.W., O'Donnell K. 1995. Molecular systematics of some yeast-like anamorphs belonging to the Ustilaginales and Tilletiales. *Studies in Mycology*, 38: 175–183
- Brizzio S., Turchetti B., de Garcia V., Libkind D., Buzzini P., van Broock M. 2007. Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). *Canadian Journal of Microbiology*, 53: 519–525
- Calvente V., de Orellano M. E., Sansone G., Benuzzi D., Sanz de Tosetti M. I. 2001. A simple agar plate assay for screening siderophore producer yeasts. *Journal of Microbiological Methods*, 47: 273–279
- Cavicchioli R., Khawar S.S., Andrews D., Sowers K. R. 2002. Low – temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 252–261
- Connell L., Redman R., Rodriguez R., Barrett A., Iszard M., Fonseca A. 2010 *Dioszegia antarctica* sp. nov. and *Dioszegia cryoxerica* sp. nov., psychrophilic basidiomycetous yeasts from polar desert soils in Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 1466–1472
- Fell J. W., Boekhout T., Fonseca A., Scorzetti G., Statzell - Tallman A. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 1351–1371
- Faizutdinova R. N., Suzina N. E., Duda V. I., Petrovskaya L. E., Gilichinsky D. A. 2005. Yeasts isolated from ancient permafrost. V: Life in ancient ice. Castello J. D., Rogers S. O. (eds.). New Jersey, Princeton University Press: 118–126

- Foght J., Aislabie J., Turner S., Brown C. E., Ryburn J., Saul D. J., Lawson W. 2004. Culturable bacteria in subglacial sediments and ice from two southern hemisphere glaciers. *Microbial Ecology*, 47: 329–340
- Fonseca A. 1992. Utilization of tartaric acid and related compounds by yeasts: taxonomic applications. *Canadian Journal of Microbiology*, 38: 1242–1251
- Fonseca A., Boekhout T., Fell J. W. 2011. *Cryptococcus* Vuillemin (1901). V: The yeasts, a taxonomic study. Vol 3. Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.). 5<sup>th</sup> ed. London, Elsevier: 1661–1737
- Fugelsang K. C., Edwards C. G. 2007. Wine microbiology: practical applications and procedures. New York, Springer: 393 str.
- Gopinath S. C. B., Anbu P., Hilda A. 2005. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience*, 46: 119–126
- Gunde - Cimerman N., Butinar L., Sonjak S., Turk M., Uršič V., Zalar P., Plemenitaš A. 2005. Halotolerant and halophilic fungi from coastal environment in the Arctic. V: Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria and Eucarya. Gunde - Cimerman N., Oren A., Plemenitaš A. (eds.). Dordrecht, Springer: 397–423
- Gunde - Cimerman N., Sonjak S., Zalar P., Frisvad J.C., Diderichsen B., Plemenitaš A. 2003. Extremophilic fungi in arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity. *Physics and Chemistry of the Earth*, 28:1273–1278
- Hamamoto M., Boekhout T., Nakase T. 2011. *Sporobolomyces* Kluyver & van Niel (1924). V: The yeasts, a taxonomic study. Vol 3. Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.). 5<sup>th</sup> ed. London, Elsevier: 1929–1990
- Hannemann N. 2010. Arctic. Washington, Environmental Information Coalition: 1 str. <http://www.eoearth.org/view/article/150179/> (avgust 2014)
- Hankin L., Anagnostakis S. L. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67: 597–607
- Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T., Robert V. 2011a. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. V: The yeasts, a taxonomic study. Vol 3. Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.). 5<sup>th</sup> ed. London, Elsevier: 87–110
- Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. 2011b. Gene sequence analyses and other DNA-based methods for yeast species recognition. V: The yeasts, a taxonomic study. Vol 3. Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.). 5<sup>th</sup> ed. London, Elsevier: 137–144

- Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. 2011c. Definition, clasification and nomenclature of the yeasts. V: The yeasts, a taxonomic study. Vol 3. Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.). 5<sup>th</sup> ed. London, Elsevier: 65–87
- Kyung L. 2011. *Filobasidium* Olive (1968). V: The yeasts, a taxonomic study. Vol 3. Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.). 5<sup>th</sup> ed. London, Elsevier: 1457–1465
- Larose C., Berger, S., Ferrari C., Navarro E., Dommergue A., Schneider D., Vogel T. M. 2010. Microbial sequences retrieved from environmental samples from Arctic snow and meltwater from Svalbard, Norway. *Extremophiles*, 14: 205–212
- Likar M. 1987. Leksikoni Cankarjeve založbe: Mikrobiologija. Ljubljana, Cankarjeva založba: 391 str.
- Ma L., Catranis C. N., Starmer W. T., Rogers S. O. 2005. The significance and implications of the discovery of filamentous fungi in glacial ice. V: Life in ancient ice. Castello J. D., Rogers S. O. (eds.). New Jersey, Princeton University Press: 140–158
- Madigan M. T., Martinko J.M. 2006. Biology of microorganisms. 11<sup>th</sup> ed. San Francisco, Pearson Education Inc.: 992 str.
- Margesin R., Fonteyne P. A., Schinner F., Sampaio J. P. 2007. *Rhodotorula psychrophila* sp. nov., *Rhodotorula psychrophenolica* sp. nov. and *Rhodotorula glacialis* sp. nov., novel psychrophilic basidiomycetous yeast species isolated from alpine environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2179–2184
- Neilands J. B. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 45: 26723–26726
- NCBI. 2009. BLAST – Basic Local Alignment Search Tool. Bethesda, National Center for Biotechnology information: baza podatkov.  
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (oktober 2013)
- Nichols D. S. 2005. The growth of prokaryotes in Antarctic sea ice: implications for ancient ice communities. V: Life in ancient ice. Castello J. D., Rogers S. O. (eds.). New Jersey, Princeton University Press: 41–67
- Norwegian Polar Institute. 2014. TopoSvalbard. Tromsø, Norwegian polar Institute: 1 str.  
<http://www.npolar.no/en/services/maps/interactive/> (avgust 2014)
- Ostenso N. A. 2013a. Arctic. Chigaco, Encyclopaedia Britannica, Inc.: 8 str.  
<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/33100/Arctic> (avgust 2014)

Ostenso N. A. 2013b. Arctic ocean. Chigaco, Encyclopaedia Britannica, Inc.: 4 str.  
<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/33188/Arctic-Ocean> (avgust 2014)

Pidwirny M. 2006. Introduction to the ocean. V: Fundamentals of physical geography. 2nd edition. Kelowna, University of British Columbia Okanagan:  
<http://www.physicalgeography.net/fundamentals/contents.html> (avgust 2014)

Pohl C. H., Smit M. S., Albertyn J. 2011. *Rhodotorula blomfonteinensis* sp. nov., *Rhodotorula eucalyptica* sp. nov., *Rhodotorula orientis* sp. nov. and *Rhodotorula pini* sp. nov., yeasts isolated from monoterpane-rich environments. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61: 2320–2327

Przybylak R. 2003. The climate of the Arctic. Dordrecht, Springer: 272 str. Cit. po Sonjak S. 2006. Biološka raznovrstnost rodu *Penicillium* v ledeniškem ledu Arktike (Svalbard) in genomska variabilnost najpogosteje vrste *P. crustosum*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 72 str.

Raspor P. 1996. Kvasovke. V: Biotehnologija. Raspor P. (ur.). Ljubljana, BIA: 69–93

Rivkina E. M., Friedmann E. I., McKay C. P., Gilichinsky D. A. 2000. Metabolic activity of permafrost bacteria below the freezing point. Applied and Environmental Microbiology, 66: 3230–3233

Ruisi S., Barreca D., Selbmann L., Zucconi L., Onofri S. 2007. Fungi in Antarctica. Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 6: 127–141

Sampaio J. P. 1999. Utilization of low molecular weight aromatic compounds by heterobasidiomycetous yeasts: taxonomic applications. Canadian Journal of Microbiology, 45: 491–512

Sampaio J. P. 2011a. *Rhodotorula* Harrison (1928). V: The yeasts, a taxonomic study. Vol 3. Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.) 5<sup>th</sup> ed. London, Elsevier: 1873–1927

Sampaio J. P. 2011b. *Rhodosporidium* Banno (1967). V: The yeasts, a taxonomic study. Vol 3. Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.) 5<sup>th</sup> ed. London, Elsevier: 1523–1539

Sampaio J. P. 2011c. *Leucosporidiella* Sampaio (2003). V: The yeasts, a taxonomic study. Vol 3. Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.) 5<sup>th</sup> ed. London, Elsevier: 1801–1806

- Sampaio J. P. 2011d. *Leucosporidium* Fell, Statzell, I. L. Hunter & Phaff (1969). V: The yeasts, a taxonomic study. Vol 3. Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.) 5<sup>th</sup> ed. London, Elsevier: 1485–1494
- Sampaio J. P. 2011e. *Sporidiobolus* Nyland (1949). V: The yeasts, a taxonomic study. Vol 3. Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.) 5<sup>th</sup> ed. London, Elsevier: 1549–1561
- Selbmann L., de Hoog G. S., Mazzaglia A., Friedmann E. I., Onofri S. 2005. Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from Antarctic desert. Studies in Mycology, 51: 1–32
- Selbmann L., Zucconi L., Onofri S., Cecchini C., Isola D., Turchetti B., Buzzoni P. 2014. Taxonomic and phenotypic characterization of yeasts isolated from worldwide cold rock-associated habitats. Fungal Biology, 118: 61–71
- Stibal M., Tranter M., Benning L. G., Rehak J. 2008. Microbial primary production on an Arctic glacier is insignificant in comparison with allochthonous organic carbon input. Environmental Microbiology, 10, 8: 2172–2178
- Strmole T. 2007. Halotolerantne askomicetne kvasovke osamljene iz arktičnega okolja. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 144 str.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24: 1596–1599
- Thomas D. N., Dieckmann G. S. 2002. Antarctic sea ice – a habitat for extremophiles. Science, 295: 641–644
- Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D. G. 1997. The Clustal\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25: 4876–4882
- Turk M., Mejanelle L., Šentjurc M., Grimalt J. O., Gunde - Cimerman N., Plemenitaš A. 2004. Salt-induced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeast-like melanized fungi. Extremophiles, 8: 53–61
- Vishniac H. S. 1987. Psychrophily and systematics of yeast-like fungi. Studies in Mycology, 30: 389–402
- Vishnivetskaya T. A., Erokhina L. G., Spirina E. V., Shatilovich A. V., Vorobyova E. A., Tsapin A. I., Gilichinsky D. A. 2005. Viable phototrophs: Cyanobacteria and green algae from permafrost darkness. V. Life in ancient ice. Castello J. D., Rogers S. O. (eds.). New Jersey, Princeton University Press: 140–158

Wang W., Chi Z., Liu G., Buzdar M. A., Chi Z., Gu Q. 2009. Chemical and biological characterization of siderophore produced by the marine-derived *Aureobasidium pullulans* HN6.2 and its antibacterial activity. *Biometals*, 6: 965–972

Winkelmann G. 2007. Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *Biometals*, 20: 379–392

Zalar P., Gunde - Cimerman, N. 2002. Taksonomija in identifikacija gliv. Ljubljana, Študentska založba: 91 str.

## ZAHVALA

Zahvalila bi se mentorici prof. dr. Nini Gunde - Cimerman, somentorici doc. dr. Loreni Butinar in doc. dr. Poloni Zalar. Vsem trem hvala za strokovno pomoč in usmerjanje, prilagodljivost ter potrpežljivost.

Hvala kadru Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Univerze v Ljubljani in Visoke šole za vinogradništvo in vinarstvo Univerze v Novi Gorici za pomoč pri praktičnem delu. Posebna hvala Mii Ličen.

Hvala doc. dr. Neži Čadež za recenzijo diplomskega dela.

Hvala mami in sestri Poloni ter Majdi in Rafaelu za pomoč ter spodbudo.

Hvala Gregorju, Tinetu, Ani in Juretu. Hvala, ker ste moja družina.