

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Pavlina MÜLLER KROUPA

EKOFIZIOLOGIJA VARIETET GLIVE
Aureobasidium pullulans

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Pavlina MÜLLER KROUPA

EKOFIZIOLOGIJA VARIETET GLIVE *Aureobasidium pullulans*

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

ECOPHYSIOLOGY OF VARIETIES OF THE FUNGUS *Aureobasidium pullulans*

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2013

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. SEC-MALS kromatografija in NMR spektroskopija sta bili opravljeni na Kemiskem inštitutu v Ljubljani.

Za mentorico je imenovana doc. dr. Polona Zalar, za somentorico prof. dr. Nina Gunde-Cimerman, za recenzentko prof. dr. Ana Plemenitaš.

Mentorica: doc. dr. Polona Zalar

Somentorica: prof. dr. Nina Gunde-Cimerman

Recenzentka: prof. dr. Ana Plemenitaš

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Polona Zalar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Nina Gunde-Cimerman

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Ana Plemenitaš

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

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.

Pavlina Müller Kroupa

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 579.22+579.26:579.8.063:582.282.31(043)=163.6
KG glice/*Aureobasidium pullulans*/fiziologija gliv/nove varietete/delitev znotraj vrste/asimilacija/reklasifikacija/zunajcelični polisaharidi/pululan
AV MÜLLER KROUPA, Pavlina
SA ZALAR, Polona (mentorica) / GUNDE-CIMERMAN, Nina (somentorica) / PLEMENITAŠ, Ana (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2013
IN EKOFLIOLOGIJA VARIETET GLIVE *Aureobasidium pullulans*
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP XVIII, 100 str., 16 pregl., 57 sl., 2 pril., 163 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Gliva *A. pullulans* je kozmopolit, ki naseljuje najrazličnejše in številne habitate v vseh podnebnih pasovih. Našli so jo tako v skrajno hladnih polarnih območjih kot tudi v tropih. Zmožnost prilagajanja tako različnim habitatom lahko nakazuje na pestro fenotipsko in genotipsko raznolikost. Njen širok spekter prehranjevanja in mehanizmi odpore na stres ji omogočajo primarno kolonizacijo najrazličnejših površin. Gliva je tudi biotehnološko pomembna zaradi encimov in zunajceličnih polisaharidov. Zmeda v poimenovanju se pojavlja že vse od odkritja te glive leta 1866. Mikromorfologija in makromorfologija sta zelo pestri, prav tako se organizem prilagaja različnim razmeram v okolini. Da bi potrdili dosedanjo klasifikacijo in odkrili morebitne nove varietete, ki jih napoveduje literatura, smo skupino sevov, izoliranih iz najrazličnejših habitatov genotipsko, makro- in mikromorfološko ter fiziološko karakterizirali ter preučili strukturo izločanih zunajceličnih polisaharidov. Pri tem smo preizkusili tudi ustreznost posamezne metode za klasifikacijo in ugotovili, da sta za ločevanje varietet primerni primerjava ITS zaporedij rDNA in analiza temperaturnega ter melanizacijskega profila sevov. Asimilacija različnih virov ogljika in dušika ter strukutra izločanega pululana nista ustrezena znaka za ločevanje med varietetami znotraj vrste *A. pullulans*. Na podlagi opravljenih poskusov sklepamo, da znotraj vrste *A. pullulans* obstaja še pet novih varietet, v rodu *Aureobasidium* pa dve še neopisani vrsti. Možno, da bodo varietete dvignili na nivo vrst.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.22+579.26:579.8.063:582.282.31(043)=163.6
CX fungi/*Aureobasidium pullulans*/physiology of fungi/new varieties/intra-species classification/asimilation/reclassification/extracellular polysaccharides/pullulan
AU MÜLLER KROUPA, Pavlina
AA ZALAR, Polona (supervisor) / GUNDE-CIMERMAN, Nina (co-advisor) / PLEMENITAŠ, Ana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2013
TI ECOPHYSIOLOGY OF VARIETIES OF THE FUNGUS *Aureobasidium pullulans*
DT Graduation thesis (University studies)
NO XVIII, 100 str., 16 pregl., 57 sl., 2 pril., 163 vir.
LA sl
AL sl/en
AB The fungus *Aureobasidium pullulans* is a cosmopolitan that colonizes numerous different habitats of all climatic zones. It has also been discovered in extremely cold polar and warm tropical areas. Its ability to adjust to climatic conditions that differ so much can indicate a phenotypic and genotypic diversity. Its wide assimilation spectrum and stress resistance mechanisms support its primary colonization of different surfaces. This fungus is also biotechnologically important because of its enzymes and extracellular polysaccharides. There has been a confusion in the nomenclature since the fungus was discovered in 1866. Micromorphology and macromorphology of this fungus are variable, and the organism is able to adjust to many different conditions. To confirm the current classification and possibly discover new varieties that are predicted by different literary sources, we studied a group of strains, isolated from various habitats, characterized them genotypically, physiologically, micro and macromorphologically, and studied the structure of secreted extracellular polysaccharides. By doing so we tested the adequacy of various classification methods and discovered that the comparison of ITS sequence of rDNA and the analyses of temperature and melanization profile of the strains are appropriate for separating varieties. The assimilation of different carbon and nitrogen sources and the structure of the secreted pullulan are not adequate taxonomic markers to distinguish between the varieties of *A. pullulans* species. After the testing we can assume that there are five more varieties in the *A. pullulans* species, and two so far undescribed species can be expected in the *Aureobasidium* genus.

KAZALO VSEBINE

	STR.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	IV
KEY WORDS DOCUMENTATION	V
KAZALO VSEBINE	VI
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XIV
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XV
SLOVARČEK	XVIII
1 UVOD	1
1.1 CILJI IN HIPOTEZE DIPLOMSKEGA DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 <i>AUREOBASIDIUM PULLULANS</i>	3
2.1.1 Prvi opis in zgodovina poimenovanja	3
2.1.2 Morfološke značilnosti <i>A. pullulans</i>	3
2.1.2.1 Makromorfologija	3
2.1.2.2 Mikromorfologija	4
2.1.2.3 Dimorfizem	4
2.1.3 Fiziologija	5
2.1.3.1 Rast na različnih virih ogljika in dušika	5
2.1.3.2 Halotoleranca	7
2.1.4 Ekologija	8
2.1.5 Patogeneza	9
2.1.5.1 Mehanizmi virulence	10
2.1.5.2 Klinični primeri	10
2.1.6 Taksonomija	11
2.1.6.1 Metode za identifikacijo	12
2.1.6.2 Trenutno veljavna delitev na varietete znotraj vrste <i>A. pullulans</i>	14
2.1.7 Biotehnološki potencial	16

2.1.7.1	Encimi	16
2.1.7.2	Aureobazidin	17
2.1.7.3	Pululan	18
2.1.7.3.1	Značilnosti	18
2.1.7.3.2	Pridobivanje	20
2.1.7.3.3	Uporaba	21
3	MATERIALI IN METODE	23
3.1	MATERIALI	23
3.1.1	Laboratorijski pribor	23
3.1.2	Laboratorijske naprave	24
3.1.3	Kemikalije in reagenti	25
3.1.4	Raztopine in pufri	27
3.1.5	Gojišča	28
3.1.6	Uporabljeni mikroorganizmi	31
3.1.7	Programska oprema	33
3.1.8	Oligonukleotidni začetniki	33
3.2	METODE	33
3.2.1	Mikroskopija	33
3.2.2	Fiziologija	34
3.2.2.1	Asimilacijski testi	34
3.2.2.1.1	Asimilacija ogljika	34
3.2.2.1.2	Asimilacija dušika	34
3.2.2.2	Producija pululana	35
3.2.3	Analiza zaporedij DNA	38
3.2.4	Temperaturni testi	39
4	REZULTATI	40
4.1	FENETSKO DREVO	40
4.2	IDENTIFIKACIJA SEVOV RODU <i>AUREOBASIDIUM</i> SHRANJENIH V EX ZBIRKI NA OSNOVI ITS rDNA ZAPOREDIJ	41
4.3	MIKROMORFOLOGIJA PREUČEVANIH SEVOV	43
4.4	TEMPERATURNI TESTI IN MELANIZACIJA	47
4.4.1	Fotografije plošč <i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	51

4.4.2	Fotografije plošč <i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>namibiae</i>	55
4.4.3	Fotografije plošč <i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>subglaciale</i>	57
4.4.4	Fotografije plošč <i>Aureobasidium pullulans</i> var. »nova«	57
4.4.5	Fotografije plošč <i>Aureobasidium pullulans</i> var. »nova 1«	59
4.4.6	Fotografije plošč <i>Aureobasidium leucospermi</i> sp. nov.	61
4.4.7	Fotografije plošč varietete »nova 3«	61
4.5	KOEKSISTENCA AUREOBASIDIUM PULLULANS IN EXOPHIALA <i>DERMATITIDIS</i>	62
4.6	ASIMILACIJSKI TESTI	62
4.7	ANALIZA SINTEZE PULULANA	66
4.7.1	Analiza donosa pululana	66
4.7.2	Povprečja in porazdelitev molskih mas, določene s SEC-MALS kromatografijo	66
4.7.3	Rezultati ^{13}C NMR spektroskopije	69
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	74
5.1	RAZPRAVA	74
5.2	SKLEPI	83
6	POVZETEK	84
6.1	POVZETEK	84
6.2	SUMMARY	85
7	VIRI	86
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Preglednica 1:	Sprememba barve kolonije <i>Aureobasidium pullulans</i> glede na razpoložljiv vir ogljika (Lingappa in sod., 1963)	5
Preglednica 2:	Sprememba barve kolonij <i>Aureobasidium pullulans</i> glede na vrsto gojišča in čas kultivacije (Takesako in sod., 1991)	6
Preglednica 3:	Povzetek glavnih značilnosti štirih do sedaj opisanih varietet vrste <i>Aureobasidium pullulans</i> (Zalar in sod., 2008)	15
Preglednica 4:	Povzetek kvalitativnih lastnosti pululana (Singh in sod., 2008)	19
Preglednica 5:	Laboratorijski pribor, uporabljen pri raziskovalnem delu	23
Preglednica 6:	Laboratorijske naprave, uporabljene pri raziskovalnem delu	24
Preglednica 7:	Kemikalije in reagenti, uporabljeni pri raziskovalnem delu	25
Preglednica 8:	Seznam uporabljenih sevov in izvor vzorca	31
Preglednica 9:	Oligonukleotidni začetniki, nukleotidna zaporedja in uporaba	33
Preglednica 10:	Razvrstitev do sedaj še nerazvrščenih sevov v obstoječe in nove, predlagane varietete znotraj vrste <i>A. pullulans</i>	41
Preglednica 11:	Premeri kolonij v mm in ocena melanizacije (0-5) pri različnih temperaturah inkubacije sevov vrste <i>Aureobasidium pullulans</i>	48
Preglednica 12:	Rast sevov <i>Aureobasidium pullulans</i> na različnih virih ogljika in dušika na 5. dan	63
Preglednica 13:	Rast sevov <i>Aureobasidium pullulans</i> na različnih virih ogljika in dušika na 10. dan	64
Preglednica 14:	Rast sevov <i>Aureobasidium pullulans</i> na različnih virih ogljika in dušika na 15. dan	65
Preglednica 15:	Donos pululana glede na čas fermentacije in postopek ekstrakcije	66
Preglednica 16:	Številčna in utežna povprečja molskih mas (M _n in M _w) in disperznost (DM = M _w /M _n) analiziranih polisaharidov, določena s SEC-MALS kromatografsko tehniko	69

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Struktura aureobazidina A (Inami in sod., 1996)	17
Slika 2: Aminokislinsko zaporedje aureobazidina A (Endo in sod., 1997)	18
Slika 3: Najpogosteje opažena konformacija pululana (Leathers, 2003)	20
Slika 4: Fenetsko drevo sevov <i>A. pullulans</i> in sorodnih vrst na osnovi ITS rDNA zaporedij izrisano po metodi najbližjega soseda	40
Slika 5: Kolaž mikrografij <i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	43
Slika 6: Kolaž mikrografij <i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>pullulans</i>	44
Slika 7: Kolaž mikrografij <i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>subglaciale</i>	45
Slika 8: Kolaž mikrografij <i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>namibiae</i>	46
Slika 9: Kolaž mikrografij še nerazvrščenih sevov <i>A. pullulans</i>	47
Slika 10: Standardi za ocenitev melanizacije	47
Slika 11: Rast in melanizacija seva EXF-924 pri različnih temperaturah po 21 dneh	51
Slika 12: Rast in melanizacija seva EXF-926 pri različnih temperaturah po 21 dneh	51
Slika 13: Rast in melanizacija seva EXF-3382 pri različnih temperaturah po 21 dneh	51
Slika 14: Rast in melanizacija seva EXF-3383 pri različnih temperaturah po 21 dneh	52
Slika 15: Rast in melanizacija seva EXF-3399 pri različnih temperaturah po 21 dneh	52
Slika 16: Rast in melanizacija seva EXF-3401 pri različnih temperaturah po 21 dneh	52
Slika 17: Rast in melanizacija seva EXF-4445 pri različnih temperaturah po 21 dneh	53
Slika 18: Rast in melanizacija seva EXF-5590 pri različnih temperaturah po 21 dneh	53

	str.
Slika 19: Rast in melanizacija seva EXF-7295 pri različnih temperaturah po 21 dneh	53
Slika 20: Rast in melanizacija seva EXF-7296 pri različnih temperaturah po 21 dneh	54
Slika 21: Rast in melanizacija seva EXF-7300 pri različnih temperaturah po 21 dneh	54
Slika 22: Rast in melanizacija seva EXF-7308 pri različnih temperaturah po 21 dneh	54
Slika 23: Rast in melanizacija seva EXF-3398 pri različnih temperaturah po 21 dneh	55
Slika 24: Rast in melanizacija seva EXF-3375 pri različnih temperaturah po 21 dneh	55
Slika 25: Rast in melanizacija seva EXF-3793 pri različnih temperaturah po 21 dneh	55
Slika 26: Rast in melanizacija seva EXF-4255 pri različnih temperaturah po 21 dneh	56
Slika 27: Rast in melanizacija seva EXF-5628 pri različnih temperaturah po 21 dneh	56
Slika 28: Rast in melanizacija seva EXF-6176 pri različnih temperaturah po 21 dneh	56
Slika 29: Rast in melanizacija seva EXF-2479 pri različnih temperaturah po 21 dneh	57
Slika 30: Rast in melanizacija seva EXF-2491 pri različnih temperaturah po 21 dneh	57
Slika 31: Rast in melanizacija seva EXF-4454 pri različnih temperaturah po 21 dneh	57
Slika 32: Rast in melanizacija seva EXF-6524 pri različnih temperaturah po 21 dneh	58
Slika 33: Rast in melanizacija seva EXF-7292 pri različnih temperaturah po 21 dneh	58

	str.
Slika 34: Rast in melanizacija seva EXF-7301 pri različnih temperaturah po 21 dneh	58
Slika 35: Rast in melanizacija seva EXF-7303 pri različnih temperaturah po 21 dneh	59
Slika 36: Rast in melanizacija seva EXF-7305 pri različnih temperaturah po 21 dneh	59
Slika 37: Rast in melanizacija seva EXF-7293 pri različnih temperaturah po 21 dneh	59
Slika 38: Rast in melanizacija seva EXF-7294 pri različnih temperaturah po 21 dneh	60
Slika 39: Rast in melanizacija seva EXF-7298 pri različnih temperaturah po 21 dneh	60
Slika 40: Rast in melanizacija seva EXF-7306 pri različnih temperaturah po 21 dneh	60
Slika 41: Rast in melanizacija seva EXF-3400 pri različnih temperaturah po 21 dneh	61
Slika 42: Rast in melanizacija seva EXF-7304 pri različnih temperaturah po 21 dneh	61
Slika 43: Rast in melanizacija seva EXF-7302 pri različnih temperaturah po 21 dneh	61
Slika 44: Koeksistenco <i>Exophiala</i> spp. in <i>Aureobasidium pullulans</i>	63
Slika 45: SEC-MALS kromatogram vzorca polisaharida, ki ga izloča sev EXF-3398	67
Slika 46: SEC-MALS kromatogram vzorca polisaharida, ki ga izloča sev EXF-3399	67
Slika 47: SEC-MALS kromatogram vzorca polisaharida, ki ga izloča sev EXF-3374	67
Slika 48: SEC-MALS kromatogram vzorca polisaharida, ki ga izloča sev EXF-3375	68
Slika 49: Združeni SEC-MALS kromatogrami vzorcev	68

str.

Slika 50:	NMR spektrogram vzorca polisaharida seva <i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>namibiae</i> EXF-3398 (pululan), ekstrahiran po postopku poskusa 2, po 6 dneh fermentacije	69
Slika 51:	NMR spektrogram vzorca polisaharida seva <i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>pullulans</i> EXF-3375 (pululan), ekstrahiran po postopku poskusa 1, po 3 dneh fermentacije	70
Slika 52:	NMR spektrogram vzorca polisaharida seva <i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>subglaciale</i> EXF-2491 (pululan s primesmi), ekstrahiran po postopku poskusa 1, po 3 dneh fermentacije	70
Slika 53:	NMR spektrogram vzorca polisaharida seva <i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>subglaciale</i> EXF-2479 (pululan s primesmi), ekstrahiran po postopku poskusa 1, po 3 dneh fermentacije	71
Slika 54:	NMR spektrogram vzorca polisaharida seva <i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> EXF-3399 (pululan s primesmi), ekstrahiran po postopku poskusa 1, po 3 dneh fermentacije	71
Slika 55:	NMR spektrogram vzorca polisaharida seva <i>Aureobasidium pullulans</i> , nova varieteta, EXF-5629 (pululan), ekstrahiran po postopku poskusa 2, po 6 dneh fermentacije	72
Slika 56:	NMR spektrogram vzorca polisaharida seva <i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>pullulans</i> EXF-6298 (pululan), ekstrahiran po postopku poskusa 2, po 6 dneh fermentacije	72
Slika 57:	Primerjava ^{13}C NMR spektrov analiziranih različic zunajceličnega polisaharida iz 3 različnih varietet <i>Aureobasidium pullulans</i>	73

KAZALO PRILOG

Priloga A: Premer rasti in melanizacija pri različnih temperaturah inkubacije sevov *A.*

pullulans po 7 dneh

Priloga B: Premer rasti in melanizacija pri različnih temperaturah inkubacije sevov *A.*

pullulans po 21 dneh

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ap-PCR	angl. angl. arbitrary primed PCR
ARG	mednarodni simbol za Argentino
AQ	mednarodni simbol za Antarktiko
BLAST	angl. Basic Local Alignment Search Tool
bp	bazni pari
BR	mednarodni simbol za Brazilijo
BTUB	del gena, ki kodira β -tubulin
CBS	centralna zbirka glivnih kultur (nl. Centraalbureau voor Schimmelcultures)
CMA	koruzni agar (angl. Corn Meal Agar)
CR	mednarodni simbol za Hrvaško
CTAB	cetyltrimetilamonijev bromid
CYA	Czapek Yeast Autolysate agar
dH ₂ O	destilirana voda
DIC	diferencialna interferencčna kontrastna mikroskopija (angl. Differential Interference Contrast microscopy)
DMSO- <i>d</i> ₆	devteriran dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. Deoxyribonucleic Acid)
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat (angl. Deoxyribonucleotide Triphosphate)
EDTA	etilendiamintetraacetat
EF	elongacijski translacijski faktor
ELO	del gena, ki kodira encim elongazo
EPS	izvencelični polimeri (angl. Extracellular Polymeric Substances)
EXF	Zbirka ekstremofilnih mikroorganizmov, IC MYCOSMO, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta (angl. Culture Collection of Extremophilic Microorganisms)
fAFLP	naključno pomnožena fluorescenčno označena polimorfna DNA (angl. fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism)
GR	mednarodni simbol za Grčijo
ISR	mednarodni simbol za Izrael
ITS	regija notranjega distančnika (angl. Internal Transcribed Spacer) v rDNA

JP	mednarodni simbol za Japonsko
kDa	kilodalton
LSU	velika ribosomska podenota (angl. L arge S ubunit) v rDNA
M	molarna koncentracija
m/V	razmerje med maso in prostornino
MEA	sladni ekstrakt agar (angl. M alt E xtract A gar)
MEGA	angl. M olecular E volutionary G enetic A nalysis
MiliQ	bidestilirana voda
NMR	nuklearna magnetna resonanca
NO	mednarodni simbol za Norveško
np	ni podatka
NT	neotipski sev
OA	trdno gojišče iz ovsenih kosmičev (angl. O atmeal A gar)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. P olymerase C hain R eaction)
PDA	krompirjev dekstrozni agar (angl. P otato D extrose A gar)
PL	mednarodni simbol za Poljsko
PR	mednarodni simbol za Portoriko
PPM	gojišče za proizvodnjo pululana (angl. P ullulan P roduction M edium)
pPVC	plastificiran polivinilklorid (angl. p lasticized P oly V inyl C hloride)
RAPD	polimorfizem dolžine pomnoženih fluorescentno označenih restrikcijskih fragmentov (angl. R andom A mplification of P olymorphic D NA)
rDNA	ribosomska deoksiribonukleinska kislina (r ibosomal D eoxy R ibonucleic A cid)
RFLP	polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (angl. R estriction F ragment L ength P olymorphism)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. R ibonucleic A cid)
rpm	število obratov v minuti (angl. r otations p er m inute)
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina (angl. r ibosomal R ibonucleic A cid)
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata (angl. S odium D odecyl S ulfate P olyacrylamide G el E lectrophoresis)

SEC-MALS	velikostna izključitvena kromatografija, sklopljena z detektorjem na sipanje svetlobe pri več kotih (angl. exclusion chromatography coupled to a multi-angle light scattering detector)
SI	mednarodni simbol za Slovenijo
SSU	mala podenota (angl. Small Subunit) v rDNA
TAE	Tris, ocetna kislina in EDTA pufer (angl. Tris, Acetic acid, EDTA)
TH	mednarodni simbol za Tajske
TRIS	tris (hidroksimetil) aminometan
UP-PCR	angl. Universally Primed Polymerase Chain Reaction
USA	mednarodni simbol za Združene države Amerike
YCB	gojišče z univerzalnim virom ogljika in brez vira dušika (angl. Yeast Carbon Base)
YNB	gojišče z univerzalnim virom dušika in brez vira ogljika (angl. Yeast Nitrose Base)
YpSs	agarno gojišče s kvasnim ekstraktom in topnim škrobom (angl. Yeast powder extract Soluble starch agar)
ZAF	mednarodni simbol za Južnoafriško republiko

SLOVARČEK

EC oznaka	številčna klasifikacija encimov, ki jo glede na katalitično aktivnost encima izda »Enzyme commission«.
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 merilo za kislost ali alkalnost raztopine.
U/μL	1 enota (angl. unit) je opredeljena kot količina encima, potrebnega za popolno razgradnjo 1 μL DNA v 10 minutah pri 37 °C.

1 UVOD

Aureobasidium pullulans je kozmopolitska vrsta, ki naseljuje najrazličnejše in številne habitate v vseh podnebnih pasovih, najpogosteje pa je opisana kot epifit na površini rastlin. Našli so jo v skrajno hladnih polarnih območjih, kot tudi v tropih. Zmožnost prilagajanja različnim habitatom lahko nakazuje na pestro fenotipsko in genotipsko raznolikost. Njen širok spekter prehranjevanja in mehanizmi odpore na stres ji omogočajo primarno kolonizacijo najrazličnejših habitatov.

Zmeda v poimenovanju se pojavlja že vse od odkritja te glive leta 1866. Mikromorfologija in makromorfologija sta zelo pestri, prav tako se organizem prilagaja različnim razmeram v okolini; tako na primer spreminja pigmentacijo in obliko rasti glede na temperaturo in gojišče.

Zaradi vse večje pojavnosti bolezni, ki oslabijo človekov imunski sistem, je v porastu tudi število oportunističnih glivnih okužb. Literatura kaže, da lahko takšne okužbe povzroča tudi *A. pullulans*. Potek bolezni je lahko zapleten in življenje ogrožajoč, zato je dobro poznavanje metabolizma glive ključno pri odkrivanju in zdravljenju okužb.

Gliva je zelo pomembna tudi v biotehnoškem smislu, saj jo uporabljam za sintezo hidrolitičnih encimov, uporabljam pa jo tudi za sintezo pululana, industrijsko zelo zanimivega zunajceličnega polisaharida. V literaturi zasledimo, da bi zunajcelični polisaharidi lahko bili tudi taksonomski marker, zato bomo preučili, ali se struktura molekule spreminja glede na sev, ki izloča določeno vrsto pululana.

Taksonomsko je bila vrsta preurejena v letu 2008, pri klasifikaciji pa so uporabili tako fenotipske kot tudi genotipske metode. Trenutno je veljavna delitev na 4 varietete znotraj vrste *A. pullulans*: *A. pullulans* var. *melanogenum*, *A. pullulans* var. *namibiae*, *A. pullulans* var. *pullulans*, *A. pullulans* var. *subglaciale*.

Naš cilj je ugotoviti, ali lahko seve znotraj vrste *A. pullulans* na osnovi novih izolatov iz raznolikih okolij razvrstimo v več varietet kot je trenutno opisanih. Avtorji, ki so pripravili zadnjo delitev, namigujejo, da naj bi bilo znotraj te vrste najmanj šest varietet, do sedaj pa

so na podlagi molekularnih markerjev opisali štiri filogenetsko opredeljene varietete (Zalar in sod., 2008).

1.1 CILJI IN HIPOTEZE DIPLOMSKEGA DELA

Identifikacija in karakterizacija večjega števila sevov znotraj rodu *Aureobasidium* na osnovi zaporedij ITS (regija notranjega distančnika; angl. Internal Transcribed Spacer) rDNA (ribosomska DNA).

Fiziološka karakterizacija novo izoliranih in že proučevanih sevov različnih varietet: asimilacijski, melanizacijski ter temperaturni profil.

Karakterizacija zunajceličnih polimerov sevov različnih varietet.

Predvidevamo, da:

- je na osnovi izbora novih izolatov iz raznolikih okolij in geografskih področij na osnovi ITS rDNA regije možno odkritje še neopisanih varietet,
- se bodo varietete razlikovale v temperaturnem profilu in da bo temperatura inkubacije vplivala na tvorbo pigmenta melanina,
- predstavniki različnih varietet ne tvorijo strukturno identičnega zunajceličnega polisaharida.

2 PREGLED OBJAV

2.1 AUREOBASIDIUM PULLULANS

A. pullulans je kot saprofitska gliva v okolju močno razširjena, največkrat izolirana z rastlinskih ostankov, tal, lesa, tkanin, pojavlja pa se tudi v človeškem okolju (Girardi in sod., 1993). Je temno pigmentirana gliva zaradi pigmenta melanina, ki se nahaja v celični steni (Rinaldi, 1996). Sodi v deblo Ascomycota.

Vrsta je zanimiva zaradi obširnega bioteknološkega potenciala in ubikvitarnosti, v zadnjem času pa so jo zasledili tudi v ekstremnih okoljih (Zalar in sod., 2008).

2.1.1 Prvi opis in zgodovina poimenovanja

Prvi je ta organizem opisal Heinrich Anton de Bary leta 1866 kot *Dematium pullulans* de Bary, l. 1918 pa je Arnaud opisal *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud. Kot obligatni sinonimi se prištevajo še: *Pullularia pullulans* (de Bary) Berkhout (l. 1923), *Anthostomella pullulans* (de Bary) F.T. Benn. (l. 1928), *Hormonema pullulans* (de Bary) Lagerb. & Melin (l. 1932), *Aureobasidium pullulans* (De Bary) G. Arnaud ex Cif., Ribaldi & Corte (l. 1957). Kot fakultativna sinonima pa Mycobank baza (Crous in sod., 2004) omenja vrsti *Phymatotrichum baccarum* Oudem (1900) in *Dematoidium nigrescens* Stautz (1931).

Rodovno ime *Aureobasidium* izhaja iz latinske besede »aurum«, ki pomeni zlato, in »basidium«, ki pomeni kij. Durrell je ime označil za neprimerno, saj naj bi namigovalo na sorodnost debelu Basidiomycota in je zato leta 1967 predlagal ponovno uveljavitev rodovnega imena *Pullularia* ali *Dematium*, a se je kljub vsemu ohranilo Arnaudovo poimenovanje, ki velja še danes. Taksonomsko sta to vrsto karakterizirala Yurlova in de Hoog leta 1994 (de Hoog in Yurlova, 1994).

2.1.2 Morfološke značilnosti *A. pullulans*

2.1.2.1 Makromorfologija

Kolonije na gojiščih CYA (angl. Czapek Yeast Autolysate Agar) in MEA (angl. Malt Extract Agar) v sedmih do desetih dneh dosežejo premer od 25 do 35 mm, so nizke in sluzaste (Pitt in Hocking, 1999), na trdnem gojišču MEA hitro rastoče, gladke, kmalu

prekrite z eksudatom (de Hoog in sod., 2000). Običajno svetlo rožnate barve, kasneje se lahko pojavijo sivi do črni sektorji, reverz je podobnih barv (Pitt in Hocking, 1999). Včasih tvorijo puhast zračni micelij (Samson in sod., 2004).

2.1.2.2 Mikromorfologija

A. pullulans je pleomorfna gliva, ki lahko spreminja način rasti iz brstenja v hifno obliko in obratno. Njen življenjski cikel vključuje tvorbo blastokonidijev, ki vzkalijo v promicelij, ta pa se lahko razvije bodisi v zračni micelij, katerega hife izločajo septirane hlamidospore (artrokonidije), ki vzbrstijo bodisi v blastokonidije, bodisi v hife s prečnimi izrasti blastokonidijev, ki sekundarno tvorijo hlamidospore z melaniziranimi celičnimi stenami. Te se sprostijo s hif in brstijo v neobarvane blastokonidije (Pechak in Crang, 1977; Kockova-Kratochwilova in sod., 1980). Vegetativne hife so široke od 3 do 12 µm, neobarvane, dihotomno razvezjane, lokalno zasledimo debelostenske, pigmentirane hlamidospore. Konidiogene celice niso diferencirane, najdemo jih interkalarno v hifah. Mikromorfološko je podobna in jo lahko zamenjamo za vrsto *Hormonema dermatitidis* (de Hoog in sod., 2000).

2.1.2.3 Dimorfizem

Pleomorfnost pri glivah lahko imenujemo tudi »fenotipska plastičnost«, ki je opredeljena kot sposobnost nekega organizma, da odgovori na signale iz okolja s spremembami morfologije, fiziološkega stanja ali vedenja (West-Eberhard, 1989).

Znano je, da glive pogosto odgovorijo na spremembe v okolju tako, da preklopijo med oblikami rasti (Rayner in Coates, 1987). To je njihov mehanizem preživetja, razširjanja in razmnoževanja, ki jim je omogočil preživetje in razvoj v samostojno kraljestvo (Bemann, 1981).

Bemann je v letu 1981 pripravil pregled 260 člankov, ki opisujejo okoljske dejavnike, ki vplivajo na glivni dimorfizem. Povzel je, da na to vplivajo atmosfera, temperatura, količina inokulum, pH, vir energije oziroma vir ogljika in dušika ter ostale sestavine gojišča (Bemann, 1981).

2.1.3 Fiziologija

Glivo *A. pullulans* so označili za zmerno halotolerantno, saj raste do približno 0,90 a_w , medtem ko pri nižji vodni aktivnosti ne uspeva. Temperaturni minimum za rast je pri +2 °C, maksimum pri 35 °C, najbolje raste pri sobni temperaturi. Poročajo o posameznih izolatih iz psihrofilnih okolij, kjer so rast te glive zasledili pri -5 °C (Pitt in Hocking, 1999).

2.1.3.1 Rast na različnih virih ogljika in dušika

Vrsta *A. pullulans* asimilira številne vire ogljika in dušika (de Hoog in sod., 2000). Nekateri avtorji so med sevi opazili razlike v rasti na galaktitolu, glukono- δ -laktonu, kreatinu in kreatininu, ter razlike v razgradnji želatine (de Hoog in Yurlova, 1994). Več avtorjev je že opazilo, da na različnih virih ogljika *Aureobasidium* razvije drugačno makromorfologijo in pigmentacijo.

Lingappa in sodelavci (1963) so prvi zasledili spremembe barve pri gojenju na definiranih gojiščih, ki so vsebovala po 2 % določenega vira ogljika. Ugotovili so, da so disaharidi boljši vir energije kot monosaharidi. Sprememba barve kolonij glede na vir ogljika je prikazana v preglednici 1. Spremembe barve so glede na tip gojišča in starost kulture opazili tudi japonski avtorji (Takesako in sod., 1991) in so povzete v preglednici 2.

Preglednica 1: Sprememba barve kolonije *Aureobasidium pullulans* glede na razpoložljiv vir ogljika (Lingappa in sod., 1963)

Vir ogljika	Barva kolonije
glukoza	temno zelena do črna
fruktoza	temno zelena do črna
galaktoza	zelenkasto črna
saharoza	temno zelena do črna
laktoza	brezbarvna
trehaloza	bledo rijavkasto zelena
maltoza	temno zelena do črna
dekstrin	temno zelena do črna
škrob	temno zelena do črna
inulin	brezbarvna
pektin	temno zelena do črna

Preglednica 2: Sprememba barve kolonij *Aureobasidium pullulans* glede na vrsto gojišča in čas kultivacije (Takesako in sod., 1991)

Gojišče	Barva kolonij po času kultivacije		
	4 dni	7 dni	14 dni
Kvasni ekstrakt-sladni ekstrakt (MEA)	bež	olivno zelena	svetlo rjava
Krompirjev-dekstrozni agar (PDA; angl. Potato Dextrose agar)	bež, svetlo roza	olivno zelena	svetlo rjava
Czapek agar	bež	rjava	črna
Sabouraud (dekstrozni) agar	bež, svetlo roza	olivno zelena	temno zelena
Gojišče OA (trdno gojišče iz ovsenih kosmičev; angl. Oatmeal Agar)	bež siva	temno rjava	temno rjava
YpSs agar (agarno gojišče s kvasnim ekstraktom in topnim škrobom; angl. Yeast powder extract Soluble starch agar)	bež	svetlo olivno zelena	olivno zelena

V skladu s tem so Lotrakul in sodelavci (2009) poročali o spremembah barve ob staranju kulture. Opravili so tudi preizkus rasti v svetlobi in temi. Ugotovili so, da *A. pullulans* za vir energije lahko izkorišča sledeče vire ogljika: D-glukoza, D-galaktoza, D-fruktoza, D-celobioza, D-manoza, D-ksiloza, D-saharoza, D-salicin, manitol, metil- α -D-glukoza, β -laktoza in škrob (Lotrakul in sod., 2009), maltoza, rafinoza, riboza, pektin, natrijev acetat, celobiozo, dekstrin, sorbitol in ksilitol (Singh in Saini, 2008). Ne raste pa na α -celulozi, etanolu in metanolu. Vir asimilativnega dušika za *A. pullulans* so amonijev acetat, amonijev klorid, amonijev nitrat, amonijev sulfat, glicin, asparagin, lizin, natrijev nitrat, ureo (Lotrakul in sod., 2009), natrijev nitrit, tripton, pepton, sojapepton, sojina moka, L-arginin, L-izolevcin in L-serin (Singh in Saini, 2008). Rast so opredelili na podlagi merjenja optične gostote pri 600 nm po sedemdnevni kultivaciji, pri čemer so za rastoče smatrali vzorce, ki so imeli OD > 0,05, za odsotnost rasti pa OD < 0,02 (Lotrakul in sod., 2009). Podobne značilnosti spremenjanja kolonij na različnih gojiščih skozi čas je ugotovil tudi Lončarič s sodelavci (2009). Glede na vir ogljika se spreminja tudi morfologija kolonije; npr. ob prisotnosti galaktitola kot edinega vira ogljika ali nikotinamida kot vira dušika, raste v micelijski obliki (Slepecky in Starmer, 2009).

Povzamemo lahko, da se izgled kolonij *A. pullulans* lahko spreminja glede na:

- vrsto edinega vira ogljika (sladkorja ali alkohola), ki je na voljo v danem gojišču,
- starost kolonije (pri starejših se poveča koncentracija melanina),

- temperaturo inkubacije,
- tip substrata na katerem raste.

Pri razrasti kolonij so pogosti nenavadni prehodi iz homogene rasti v sektorsko, iz kvasne v micelijsko obliko in iz orjaških kolonij v drobne. Za takšne spremembe naj bi bili odgovorni epigenetski mehanizmi, ki posredujejo fenotipski preklop. Širok spekter prehranjevanja in odpornost na stres bi lahko razložila razširjenost *A. pullulans* na tako različnih, tudi ekstremnih področjih (Slepecky in Starmer, 2009).

2.1.3.2 Halotoleranca

Samo mikroorganizmi so sposobni rasti v ekstremnih okoljih, kamor sodijo tudi soline, kjer koncentracija NaCl (in drugih soli) variira med 3 in 35 odstotki, koncentracija kisika je razmeroma nizka, izpostavljenost ultravijoličnemu sevanju pa visoka (Gunde-Cimerman in sod., 2000). Sestava slane vode se skozi čas zaradi izhlapevanja in precipitacije spreminja. Dolgo je veljalo, da v takšnih pogojih uspevajo le alge, praživali, arheje in bakterije, glive pa ne. Leta 1975 so izraz »halofil« prvič pripisali glivam kasneje so glive odkrili v različnih vzorcih iz solin, tudi v izjemno slanih vodah, raznolikost je bila presenetljivo pestra (Gunde-Cimerman in sod., 1997).

Mikroorganizmi, ki živijo v naravnih solinskih ekosistemih z visoko koncentracijo soli, ki poviša osmotski tlak, morajo za preživetje in proliferacijo ohraniti nižji vodni potencial kot njihovo okolje in prilagoditi koncentracijo natrija znotraj celic. Halofilni mikroorganizmi so razvili več mehanizmov za izravnavo osmotskega tlaka. Ekstremno halofilne arheje tako znotraj celice kopičijo do 1 mol/L kalija, medtem ko evkarionti ne morejo prenesti tako visokih koncentracij kalija (Oren, 1999). Glive se zato poslužujejo drugačne strategije: kopičenje kompatibilne topljence: glicerol, trehalozo, eritol, arabitol, manitol in mikosporin-glutaminol-glukozid (Bloomberg, 2000; Ramos, 2005; Kogej in sod., 2007; Plemenitaš in sod., 2008).

A. pullulans je črnim kvasovkam podobna gliva, ki so jo med drugim izolirali tudi iz izjemno slanih voda iz solin, ki predstavljajo njihovo naravno ekološko nišo. Kogej in sodelavci (2005) so pokazali, da se *A. pullulans* obnaša kot halotolerantna gliva. Ob

minimalnem dodatku NaCl se je njegova rast upočasnila, medtem ko je NaCl rast pri vrsti *Hortaea werneckii* pospešil, kar kaže na njen halofilni značaj (Kogej in sod., 2005). *A. pullulans* pogosto izolirajo iz solinskih močvirij in voda z nizko vsebnostjo soli. Najbolje raste brez dodatka NaCl, prenese pa do 17 % koncentracijo soli. Znotrajcelična koncentracija natrijevih ionov pri takih pogojih ostaja nizka (Plemenitaš in sod., 2005; Zalar in sod., 1999; Kogej in sod., 2005). Kompatibilni topljenec, ki preprečuje vdor soli v celico, je glicerol (Hernández-Saavedra in sod., 1995).

2.1.4 Ekologija

A. pullulans je kozmopolitska gliva, ki jo najdemo v vseh klimatskih pasovih in na najrazličnejših površinah: na/v listju rastlin (Andrews in sod., 2002; McGrath in Andrews., 2007; Andrews in Harris, 1997; Woody in sod., 2007), na steklu (Schabereiter in sod., 2001), na barvanih površinah (Shirakawa in sod., 2002), na skalah in marmorju (Urží in sod., 1999, 2001), v tleh, sladki, ledeniški in morski vodi (Zalar in sod., 2008), v zraku (Shelton in sod. 2002; Lugauskas in sod., 2003; Griffin in sod., 2003; Samson in sod., 2004) in celo na mednarodni vesoljski postaji Mir (Alekhova in sod., 2005). Našli so ga tudi na bolj nenavadnih mestih: v vzorcih, ki so vsebovali zelo staro DNA (angl. Deoxyribonucleic Acid) (Hauf in sod., 1995), v gorivu ameriškega vojnega letalstva (Rauch in sod., 2006), na vesoljskih plovilih (La Duc in sod., 2003) ter na poškodovanih jedrskih reaktorjih (Zhdanova in sod., 2000).

Aureobasidium pullulans uvrščamo med primarne kolonizatorje površin, ki pričnejo z biodeterioracijo snovi (Webb in sod., 2003) in so lahko indikatorji onesnaženja (Deshpande in sod., 1992). Njihova prednost je, da lahko preživijo daljša sušna obdobja in dolgotrajnejše ultravijolično sevanje, saj jih pred tem ščiti pigment melanin (Crang in Pechak, 1978; Turkovskii in Yurlova, 2002; Nosanchuk in Casadevall, 2003; Kogej, 2002). Na površine se učinkovito pritrjajo z zunajceličnimi polisaharidi (Andrews in sod., 1994). Ta strategija je učinkovita tudi pri pritrjanju na sicer za rast mikroorganizmov manj primerne materiale, kot je plastificiran polivinilklorid (pPVC). Pri tem naj bi imela glavno vlogo izvencelična esteraza, ki hidrolizira organske estrske plastifikatorje. Ti polivinilklorid naredijo bolj elastičen in vzdržljiv (Berk in sod., 1957; Klausmeier in sod., 1961; Mills in Eggins, 1974).

A. pullulans se pojavlja tudi kot kvarni mikroorganizem tako v krmi kot tudi v hrani. V prehrambenih izdelkih ga pogosto zasledimo predvsem na svežem sadju in zelenjavi, zamrznjenih živilih in siru, vendar redko povzročijo kvarjenje živil (Pitt in Hocking, 1999). Na osnovi nukleotidnih zaporedij 18S rRNA (ribosomska RNA) so ga evidentirali v krmi - ječmenu shranjenem v sodih, kamor najverjetneje zaide že ob pakiranju na polju. Kljub prisotnosti gliv vrste *Aureobasidium* in anaerobnim pogojem, pa se pH v sodih z ječmenom ni bistveno spremenil (Olstorpe in sod., 2010).

Punnayak in sodelavci (2003) so izolirali *A. pullulans* iz zraka tropskega okolja na Tajskem z izpostavitvijo plošč CMA (koruzni agar; angl. Corn Meal Agar) za 5 – 30 minut. *Aureobasidium* so osamili tako v vzorcih z visokih kot tudi z nizkih nadmorskih višin, zasledili so jih v deževnem in sušnem obdobju. Poročajo tudi o težavah pri izolaciji, saj sekundarne saprofitske glive, ki v tropskem okolju mnogokrat prevladujejo, onemogočijo rast ostalim vrstam. Na ploščah, ki so jih zraku izpostavili več kot 15 minut, zaradi preraščenosti plošč *A. pullulans* niso zasledili. Na manj časa izpostavljenih ploščah so glive rodu *Aureobasidium* pogosto opazili.

Rauch in sodelavci so raziskali mikrobe v rezervoarjih za gorivo vojaških letal. Mikroorganizmi v notranjosti dovodnih cevi in filtrov, zaradi katerih je bil zamašen dotok goriva, so namreč bili vzrok nesreče vojaškega letala zaradi odpovedi motorja. Da bi preprečili nadaljnje nesreče zaradi kolonizacije goriva, so vanj začeli dodajati aditive, ki onemogočijo razrast mikroorganizmom, vendar so v zadnji opravljeni študiji klub dodatku dietilen glikol monometil etra v kerozin dokazali prisotnost nekaterih mikroorganizmov, med drugim tudi glive *A. pullulans* (Rauch in sod., 2006).

2.1.5 Patogeneza

A. pullulans lahko povzroči lokalizirane okužbe, redkeje peritonitis pri bolnikih na peritonealni dializi, okužbe kože, pljučnico, meningitis, okužbo roženice in beločnice ter ognojke v vranici in na čeljusti (Caporale in sod., 1996; Chander in Sharma, 1994; Clark in sod., 1995; Fletcher in sod., 2000; Gupta in sod., 2001; Huttova in sod., 1998; Ibañez in sod., 1997; Jones and Christensen, 1974; KaczmarSKI in sod., 1986; Koppang in sod.,

1991; Krcmery in sod., 1994; Nelken in sod., 1987; Pritchard in Muir, 1987; Redondo-Bellon in sod., 1997; Salkin in sod., 1986; Tan in sod., 1997).

2.1.5.1 Mehanizmi virulence

Podlaga za virulenco naj bi bil temperaturni dimorfizem - fazni prehod glive iz micelijske v kvasno obliko zaradi zvišanja temperature v okolju po prihodu v človeški organizem (Nemecek in sod., 2006), deloma pa tudi melanizirana zunanja celična stena, ki ščiti glivo pred fagocitozo (Chabasse, 2002). Mikotoksinov ne izloča (Pitt in Hocking, 1999).

A. pullulans se lahko pritrja na sintetične materiale in kirurško vstavljenе proteze, saj so ga pogosto osamili iz peritonealnih dializnih katetrov in centralnih venskih katetrov, ki so včasih celo vidno kolonizirani s črnimi kolonijami, ki se pritrjajo na notranje stene katetra (Caporale in sod., 1996; Ibañez in sod., 1997). Odstranjevanje s standardnimi dezinfekcijskimi postopki je zapleteno, mnogokrat neuspešno (Wilson in sod., 2000). *Aureobasidium* spp. ni del običajne naravne flore pri človeku, zato razrast ni povezana s prekomerno uporabo antibiotikov. V katetre največkrat zaide zaradi njihove nepravilne uporabe ali nenatančne menjave (Caporale in sod., 1996).

Povečano število kroničnih bolnikov in pogosta uporaba kirurško vstavljenih protez iz materiala »Silastic« napovedujejo, da se bo število oportunističnih okužb povečalo, s tem pa tudi obseg okužb z *A. pullulans*, ki je, kot kaže obdukcija, ki so jo v okviru študije primera opravili Hawkes in sodelavci (2005), lahko tudi angioinvaziven. K povečanju števila okužb pripomore tudi večkratna uporaba medicinskih pripomočkov ali orodja namenjenega sicer za enkratno uporabo.

2.1.5.2 Klinični primeri

V literaturi zasledimo kar nekaj poročil ali študij primerov oportunističnih sistemskih okužb z glivo *A. pullulans* (Fletcher in sod., 2000; Girardi in sod., 1993; Kaczmarski in sod., 1986). Hawkes in sodelavci (2005) so naleteli na prvi primer fungemije in invazivne okužbe pljuč ob sistemski okužbi z *A. pullulans* pri 4 mesecu starem dojenčku po nujni srčni operaciji. Glice so identificirali na podlagi morfologije kolonij, mikroskopskih značilnosti brezbarvnih blastokonidijev, ki so se razvili v debelostenske temno

pigmentirane artrokonidije (Hawkes in sod., 2005; Caporale in sod., 1996). Odstranitev katetra in zdravljenje z amfotericinom B je bilo sicer učinkovito, vendar je bolnik zaradi ostalih zapletov umrl, star 145 dni. Hawkes in sodelavci na podlagi britanske literature poročajo še o okužbah peritonealnega dializnega katetra, vraničnega ognojka, razjede na roženici, rane na koži ter ognojka na spodnji čeljusti. Glive rodu *Aureobasidium* so izolirali iz cerebrospinalne tekočine in bronhoalveolarnega izpirka bolnika po presaditvi jeter (Hawkes in sod., 2005). Nekateri avtorji poročajo o odpravi okužbe že po odstranitvi katetra (Abraham in sod., 1990; Nagappan in sod., 1992). Kot zdravilo prve izbire namesto amfotericina B navajajo fluorocitozin s flukonazolom (Ibañez in sod., 1997).

Wilson in sodelavci (2000) poročajo o psevdoizbruhu okužbe z *A. pullulans*, o katerem so sklepali na podlagi povečanega števila izolatov iz bronhoalveolarnih izpirkov bolnikov po presaditvi pljuč. Izkazalo se je, da so bili rezultati lažno pozitivni, saj je tehnično osebje večkrat uporabilo zamašek siringe s sterilno fiziološko raztopino, ki je sicer namenjen enkratni uporabi. Kljub predhodni sterilizaciji zamaška, je le-ta ostal kontaminiran z *A. pullulans* in bi lahko njegova uporaba privedla ne le v lažni izbruh zaradi lažno pozitivnih rezultatov, ampak bi lahko imunsko oslabljeni bolniki razvili hudo obolenje spodnjih dihal zaradi vnosa gliv med bronhoskopijo (Wilson in sod., 2000).

Aureobasidium se v literaturi pojavlja tudi kot potencialni alergen pri ljudeh; raziskave o konidijih, ki se sproščajo v zrak kažejo, da naj bi bili za alergije odgovorni alergeni z visoko molekulsko maso (Taylor in sod., 2005). Sodi med človeku nenevarne glive, v prvo rizično skupino (BSL 1) (de Hoog in sod., 2000).

2.1.6 Taksonomija

Hermanidez-Njihofov je s sodelavci (1977) pripravil revizijo neotipizirane vrste *Dematioides pullulans* De Bary (1884) (CBS 584.75) in tako uveljavil vrsto *A. pullulans* kot tipsko vrsto rodu *Aureobasidium*. Rod so opisali na podlagi konidiogeneze: sinhronega holoblastičnega izločanja konidijev. Teleomorf rodu *Aureobasidium* so opisali v rodu *Discosphaerina*, vendar več kot opisa posameznih vrst oz. neposredne povezave med spolno in nespolno obliko niso dokazali. Po nekaterih podatkih je teleomorf glive *Aureobasidium pullulans*

Discosphaerina fulvida (F. R. Sanderson) Sivanesan (de Hoog in sod., 2000), po drugih *Discosphaerina fagi* (H.J. Huds.) M.E. Barr (Zalar in sod., 2008).

Multilokusna analiza kaže, da je vrsta *A. pullulans* sestavljena iz treh večjih skupin, od katerih imata dve močno statistično podporo pri analizi LSU (velika ribosomska podenota; angl. Large Subunit) rDNA. Pri tem so varieteto *aubasidani* (Yurlova in sod., 1997), pri kateri so sicer dokazali zunajcelični polisaharid aubazidan, sinonimizirali z varieteto *pullulans* (Zalar in sod., 2008). To nakazuje, da je tvorba določenega zunajceličnega polisaharida variabilna znotraj varietete.

Aureobasidium pullulans razvrstimo:

Kraljestvo Glive (Fungi)

deblo Ascomycota

poddeblo Pezizomycotina

razred Dothideomycetes

podrazred Dothideomycetidae,

red Dothideales

družino Dothioraceae

rod *Aureobasidium*

(Schoch in sod., 2006).

2.1.6.1 Metode za identifikacijo

Za razlikovanje vrste *A. pullulans* od drugih vrst znotraj rodu *Aureobasidium* se je uveljavila metoda RFLP (polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov angl. Restriction Fragment Length Polymorphism) v kombinaciji z nukleotidnimi zaporedji ITS rDNA regij (de Hoog in sod., 2000; Lončarič in sod., 2009). S pomočjo RFLP-PCR lahko učinkovito ločujemo rod *Aureobasidium* od ostalih, vendar pa metoda ni primerna za ločevanje znotraj vrste. Za znotrajvrstno določanje predlagajo tudi profiliranje proteinskega prstnega odtisa z elektroforezo SDS-PAGE (poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata; angl. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (Lončarič

in sod., 2009). Pri identifikaciji varietet znotraj vrste pa analizo nukleotidnih zaporedij SSU (angl. Small Subunit) rDNA (de Hoog in sod., 2000).

Za taksonomske študije rodu *Aureobasidium* so različni avtorji uporabili primerjave zaporedij ITS rDNA regije (Yurlova in sod., 1999; de Hoog in sod., 1999). Za proučevanje raznolikosti znotraj vrste *A. pullulans* so se predhodno že posluževali UP-PCR (angl. Universally Primed Polymerase Chain Reaction) s hibridizacijo (Yurlova in sod., 1995) in fingerprinting-a (Bulat in Mironenko, 1992), PCR (angl. Polymerase Chain Reaction) ribotipizacije (Yurlova in sod., 1995), ap-PCR (angl. arbitrary primed Polymerase Chain Reaction) (Schena in sod., 1999), RAPD-PCR (polimorfizem dolžine pomnoženih fluorescenčno označenih restriktivskih fragmentov; angl. random amplification of polymorphic DNA) (Schena in sod., 1999; Urzí in sod., 1999) in fAFLP (naključno pomnožena fluorescenčno označena polimorfna DNA; angl. fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism) (de Curtis in sod., 2004).

Poleg molekularnih analiz so raziskovalci skušali ločevati taksone znotraj vrste tudi na podlagi drugih fenotipskih znakov, npr. na podlagi strukture izločanega zunajceličnega polisaharida aubazidana, glukana, sestavljenega iz α -1,4-D, β -1,6-D in β -1,3-D glikozidnih vezi. Tako so znotraj *A. pullulans* na podlagi izolatov iz jezerske vode in listja breze v Rusiji opisali novo varieteto *aubasidani* (Yurlova in sod., 1997). Raznolikost med zunajceličnimi polisaharidi so povezali z genetsko raznolikostjo, svojo odločitev pa podkrepili še z asimilacijskimi testi, kjer se varieteta *aubasidani* od varietete *pullulans* razlikuje na primeru asimilacije metil- α -D-glikozida in lakteze ter različnih virov dušika. Različni avtorji se sklicujejo tudi na splošno uporabnost izločanih zunajceličnih polisaharidov kot taksonomskih markerjev (Yurlova in sod., 1997), vendar so takšen način klasifikacije kasneje ovrgli (Zalar in sod., 2008).

Pri rutinski identifikaciji te vrste je v rabi morfologija, podkrepljena z analizo zaporedja ITS rDNA kot splošnega genetskega označevalca za identifikacijo gliv (de Hoog in sod., 2000; Punnapayak in sod., 2003).

Zadnja delitev znotraj vrste *A. pullulans* je bila opravljena glede na molekularno analizo regij ITS in LSU rDNA ter določenih predelov gospodinjskih genov, ki kodirajo β-tubulin (BTUB), elongacijski faktor 1-α (EF) in elongazo (ELO), upoštevali pa so tudi makromorfološke in mikromorfološke značilnosti, pri čemer so analizirali tudi pigmentacijo (Zalar in sod., 2008).

2.1.6.2 Trenutno veljavna delitev na varietete znotraj vrste *A. pullulans*

Trenutno je veljavna delitev znotraj vrste *Aureobasidium pullulans* na 4 varietete:

- *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud var. *pullulans*-Annales École Nat. Agric. Montpellier 16: 39, 1918. MycoBank MB101771.

Sinonimi:

Dematium pullulans de Bary 1884 (MB 219317; NT = CBS 584.75); *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arn. var. *aubasidani* Yurlova in Yurlova & de Hoog 1997 (MB 442903; T = CBS 100524); *Candida malicola* D.S. Clark & R.H. Wallace 1955 (MB 294033; T = CBS 701.76); *Dematoidium nigrescens* Stautz 1931 (MB 272259; T = CBS 146.30)

- *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud var. *melanogenum* Hermanides-Nijhof-Stud. Mycol. 15: 161, 1977. MycoBank MB352628.

Sinonimi:

Torula schoenii Roukhelman 1937 (MB 445735; AUT = CBS 123.37) (Invalid; Art. 37 ICBN); *Pullularia fermentans* Wynne & Gott var. *Schoenii* (Roukhelman) Wynne & Gott 1956 (MB 352450); *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud var. *melanogenum* Hermanides-Nijhof 1977 (MB 352628; T = CBS 105.22)

- *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud var. *subglaciale* Zalar, de Hoog & Gunde-Cimerman, var. nov. MycoBank MB51238

- *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud var. *namibiae* Zalar, de Hoog & Gunde-Cimerman, var. nov. MycoBank MB512381
(Zalar in sod., 2008)

Osnovne makromorfološke, mikromorfološke in fiziološke značilnosti do sedaj opisanih varietet vrste *A. pullulans* so prikazane v preglednici 3.

Preglednica 3: Povzetek glavnih značilnosti štirih do sedaj opisanih varietet vrste *Aureobasidium pullulans* (Zalar in sod., 2008)

	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>subglaciale</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>namibiae</i>
Makromorfološka	Sluzaste, rožnate do rumene kolonije. Reverz rumen do svetlo rumen, temni sektorji (pigmentirane hife in konidiji). Zračnega micelija ni, razen nekaj izjem, močna sporulacija.	Sluzaste, olivno zelene do črne kolonije, včasih sektorji, izloča veliko EPS, zračni micelij pri nekaterih na robu kolonij, sporulacija je prisotna.	Gladke, mat rožnato bele do rožnate kolonije z oranžnim reverzom. Rob kasneje potemni, zračnega micelija ni. Sporulira.	Gladke, svetleče, sluzaste kolonije, rožnato do rjava-sive barve, rjava sredina z rumenim do rumenosivim reverzom, zračni micelij včasih na robu kolonije.
Mikromorfološka	Neobarvane, prečno septirane hife, lokalno pigmentirane. Konidiogene celice, konidiji brezbarvni do temnorjavi, endokonidiji občasno prisotni.	Rjave do temnorjave hife, nagubane, debelostenske, prečno septirane, ovite v EPS, lahko razpadajo v hlamidospore. Na robu kolonije neobarvane hife. Iz zobcev na konidiogenih celicah izraščajo brezbarvni ali temnorjavi konidiji. Endokonidijev ni.	Gladke, brezbarvne, prečno septirane hife, lokalno debelostenske temnorjave. Konidiogene celice nediferencirane, tvorijo skupke. Konidiji temnorjavi, brstijo.	Vegetativne, neobarvane, gladke, prečno septirane hife, Mestoma debelostenske temnorjave hife. Konidiogene celice nediferencirane, konidiji izraščajo simultano v skupkih, obdani z EPS, brezbarvni ali temno rjavi, brstijo. Endokonidijev ni.
Halo-toleranca (NaCl)	do 15 %	do 10 %	do 10 %	do 10 %
Temperaturni razpon	4 - 30 °C, optimum 25 °C	10 - 35 °C, optimum 30 °C	4 - 25 °C, optimum 25 °C	10 - 30 °C, optimum 25 °C
Posebnosti	Hitra rast, sektorji.	Kolonije črne, stalna konidiogeneza.	Najden le v ledeniškem globokem ledu in morski vodi na Svalbardu. Psihrotoleranten.	varietetata le z enim predstavnikom (EXF-3398).

Nedavni opisi novih vrst v rodu *Aureobasidium* nakazujejo, da so morda razlike med že opisanimi varietetami tako obsežne, da bi bilo smiselno razmišljati o dvigu varietet na nivo novih vrst (Crous in sod., 2011; Peterson in sod., 2013).

2.1.7 Biotehnološki potencial

Gliva *A. pullulans* je biotehnološko zanimiva zaradi zunajceličnih encimov (Buzzini in Martini, 2002), polisaharidov, predvsem pululana (Singh in Saini, 2007; Yurlova in de Hoog, 1997; Ueda in Haruyoshi, 1965; Punnapayak in sod., 2003; Singh in sod., 2008; Rekha in Sharma, 2007; Kachhawa in sod., 2003; Pouliot in sod., 2005; Goksungur in sod., 2003; Lee in sod., 1999;) in aureobasidina A, proteina z antibiotičnim učinkom, ki obeta na področju zdravljenja okužb s kvasovkami rodu *Candida* (Endo in sod., 1997; Lotrakul in sod., 2009; Ikai in sod., 1991; Takesako in sod., 1991; Takesako in sod., 1991).

2.1.7.1 Encimi

Buzzini in Martini (2002) sta v brazilskem deževnem gozdu zbrala okrog 400 sevov gliv in testirala njihove zunajcelične encime. Encimski profil je variabilen znotraj vrste. Med ostalimi kvasovkam podobnimi glivami sta izolirala tudi *A. pullulans* (46 sevov); od tega sta pri 26 % sevov *A. pullulans* odkrila amilazno, pri 34 % esterazno, pri 43 % lipazno, pri 15 % proteazno in pri 2 % hitinazno aktivnost. 21 % sevov *A. pullulans* je bilo zmožnih razgrajevati pektin. To kaže na encimsko pestrost teh gliv in potencial za industrijsko proizvodnjo zunajceličnih encimov s pomočjo teh organizmov. Lipaze, ki jih izločajo mikroorganizmi so zanimive za kemično (pralni praški, detergenti in kozmetika), prehransko industrijo, v farmaciji, usnjarski, papirni in tekstilni industriji (Houde in sod., 2004), proteaz pa se poslužuje vinska industrija (Buzzini in Martini, 2002), prehrambena, še posebej za mlečne izdelke, usnjarska industrija ter farmacija (Rao in sod., 1998; Gaur in sod., 2010). Amilaze so zanimive za pekarsko, tekstilno, farmacevtsko industrijo, pri proizvodnji detergentov in v klinični kemiji (Gaur in sod., 2010).

Pululanaze (EC 3.2.1.41) so encimi, ki se vežejo na razvejišča amilopektina, hidrolizirajo α-1, 6 vezi znotraj polisaharida pululana in ga tako razgradijo na posamezne maltotrioze (Bender in Wallenfels, 1961). Uporabljam jih v prehrambeni industriji pri pripravi alkoholnih pijač in sladil. Delimo jih na 5 skupin: pululanaze tipa I, amilopululanaze, neopolulananaze, izopolulananaze in pululan hidrolaze tipa III (Hii in sod., 2012).

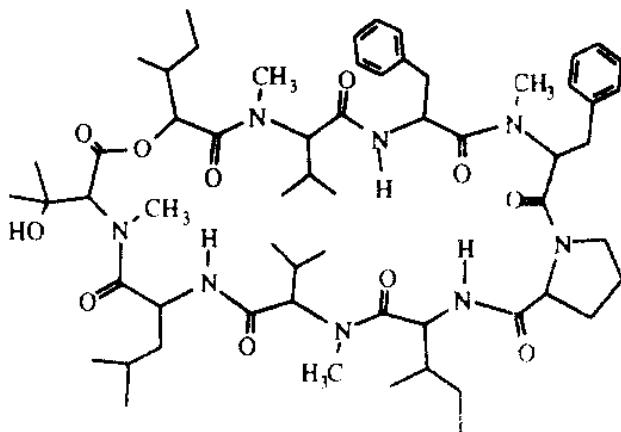
A. pullulans izloča tudi večje količine celulaz, proteinaz, fospataz in invertaz, ki bi lahko bile pomembne pri razgradnji plastičnih polimerov v naravi (Winters in Guidetti, 1976),

poleg tega pa v zadnjem času opažajo tudi sintezo sideroforjev, ki bi lahko bili pomembni pri čiščenju s kovinami onesnaženih območij (Gaur in sod., 2010).

2.1.7.2 Aureobazidin

Pojavnost sistemskih mikoz se iz leta v leto povečuje. Za zdravljenje sistemskih okužb z glivami se v glavnem uporablajo amfotericin B, flucitozin in imidazoli (Saag in Dismukes, 1988). Zaradi povečane uporabe zdravil to področje zahteva nove učinkovine. Aureobazidini na kliničnem področju veliko obetajo, saj so bili v *in vitro* in *in vivo* raziskavah uspešni proti glavnim človeškim patogenom, manj toksični za bolnika in primerljivi z obstoječimi terapijami (Takesako in sod., 1993).

V letih 1991 in 1993 so poročali o cikličnem depsipeptidnem antibiotiku (Takesako in sod., 1991; Takesako in sod., 1993), kjer je ena ali več amidnih vezi zamenjanih z estrsko, imenovanim aureobazidin. Izločajo ga nekateri sevi *A. pullulans* (R106 ozioroma BP-1938). Protein je sestavljen iz osmih levosučnih aminokislin, ki so v obroč povezane preko ene hidroksikisline (slika 1).

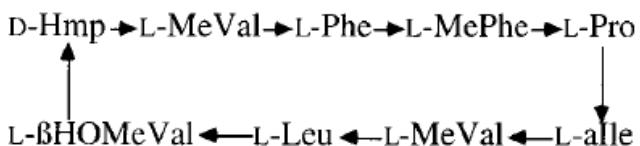


Slika 1: Struktura aureobazidina A (Inami in sod., 1996)

Aureobazidin zavira rasti nekaterih človeških patogenov *in vitro*: *Candida albicans*, *Aspergillus* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* in *Blastomyces dermatitidis* (Takesako in sod., 1993; Endo in sod., 1997; Kurome in sod., 1996; Zhong in sod., 2000). Na aureobazidin so občutljivi tudi dermatofiti, medtem ko so bakterije (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) nanj neobčutljive. Prav tako so opravili biološki poskus na miših z invazivno kandidozo in

dosegli z uveljavljenimi antimikotiki primerljiv uspeh. Zapis za ta proteinski kompleks nosi gen *aba1* (Takesako in sod., 1993).

Med najuspešnejšimi pri zaviranju rasti največih vrst je aureobazidin, ki ga izloča sev *A. pullulans* BM1 (Lotrakul in sod., 2009). Onemogočal naj bi tako razrast hif drugih gliv, kot tudi kalitev spor. Mehanizem delovanja vključuje inhibicijo inozitol-fosfoceramid sintaze, ki je ključna za biosintezo sfingolipidov pri glivah (Takesako in sod., 1993; Zhong in sod., 2000).



Slika 2: Aminokislinsko zaporedje aureobazidina A (Endo in sod., 1997)

Legenda:

D-Hmp = 2(R)-hidroksi-3(R)-metilpentanojska kislina;

L-MeVal = N-metil-L-valin;

L-MePhe = N-metill-L-fenilalanin;

L-alle = L-allo-izolevcin;

L-βHOMeVal = β-hidroksi-N-metil-L-valin (Endo in sod., 1997).

2.1.7.3 Pululan

2.1.7.3.1 Značilnosti

Pululan (slika 3) je v vodi topen nevtralen zunajcelični polisaharid, ki ga izločajo glive *A. pullulans* tekom fermentacije. Njegov osnovni gradnik je glukoza (po tri glukoze so preko α-1, 4 glikozidne vezi povezane v maltotrioze) (Leathers, 2005), te pa se povežejo v nerazvezano poli-α-1,6-maltotriozo (Yurlova in de Hoog, 1997). Izmenjava α-1, 4 in α-1, 6 glikozidnih vezi mu daje prožnost in boljšo topnosti (Leathers, 1993). Na α konfiguracijo kažejo rezultati infrardeče spektroskopije, kjer je pululan dosegel vrednost $\lambda = 850 \text{ cm}^{-1}$ (Yurlova in de Hoog, 1997; Madi in sod., 1997). Osnovne lastnosti pululana so opisane v preglednici 4.

Prvič so tvorbo zunajceličnih polisaharidov opazili leta 1938 (Bauer in sod.), kasneje pa leta 1958 Bernier, ki je polimer izoliral in pričel s karakterizacijo. Ime pululan je polisaharid dobil leta 1959 (Bender in sod., 1959; Leathers, 2005). V šestedestih letih so

opisali osnovno strukturo (Bender in Wallenfels, 1961; Wallenfels in sod., 1961, 1965; Bouveng in sod., 1962, 1963; Sowa in sod., 1963; Ueda in sod., 1963). Odkrili so encim pululanaza, ki specifično hidrolizira α -1, 6 vezi in tako pululan razpade na monomere maltotrioze. Po kisli hidrolizi le-te razpadejo na glukozne enote.

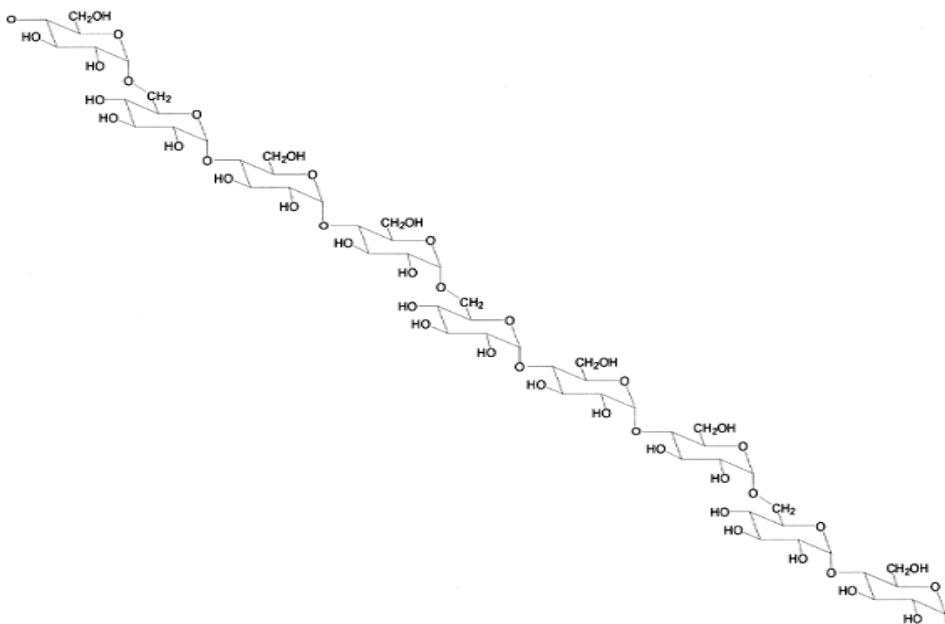
Fiziološka vloga pululana ni povsem znana. Količina tega polisaharida, ki jo celice uporabijo za pridobivanje enostavnih sladkorjev, je zanemarljiva, zato sklepajo, da ne služi kot rezerva energije. Predvidevajo da pululan in podobni polisaharidi celice ščitijo pred izsušitvijo in služijo za lažje pritrjanje na podlago (Andrews in sod., 2004; Leathers, 2005), saj je *Aureobasidium* primarni kolonizator površin (Webb in sod., 2003), vezava pa je odvisna od faze rasti (Pouliot in sod., 2005).

Catley in Whelan (1971) domnevata, da naj bi bila struktura pululana različna pri vsakem sevu. Več avtorjev poroča o tem, v katerih celicah pululan nastaja: Simon in sodelavci (1995) trdijo, da so v sintezi vpletene predvsem hlamidospore, Catley (1973) in Finkelman s sodelavci (1982), da pri tem sodelujejo kvasne celice. Yurlova s sodelavci (1993) trdi, da lahko to počnejo tudi hifne celice, medtem ko Sevier in sodelavci (1984) poročajo, da celična oblika pri tem ne igra nobene vloge. Veliko raziskav podpira tezo, da naj bi sinteza tega sekundarnega metabolita potekala pretežno v stacionarni fazi rasti (Ueda in sod., 1963). Sintetizira se znotraj celice, nato pa se izloči v njeno neposredno okolico (Leathers, 2005).

Izven skupine črnih kvasovk, se lahko tip izločanega zunajceličnega polisaharida uporabi celo kot taksonomski označevalec (Yurlova in de Hoog, 1997).

Preglednica 4: Povzetek kvalitativnih lastnosti pululana (Singh in sod., 2008)

Izgled	bel ali rumenkasto bel prašek
Topnost v vodi pri 25 °C	lahko topen
Specifična optična aktivnost $[\alpha]$ D2O (1 % v vodi)	minimalno +160 °C
Polipeptidi (%)	maksimalno 0,5
pH raztopine	5 do 7
Mineralni ostanek - pepel (sulfatirano, %)	maksimalno 3
Vлага (izgube pri sušenju, %)	maksimalno 6
Molekulska masa (kDa)	100-250



Slika 3: Najpogosteje opažena konformacija pululana (Leathers, 2003)

2.1.7.3.2 Pridobivanje

Na količino izločenega zunajceličnega polisaharida naj bi pomembno vplivala sestava gojišča, predvsem vir dušika. Kot najboljša sta se izkazala amonijev sulfat in urea, vendar dušika ne sme biti preveč, ker ima lahko prebitek negativen vpliv na produkcijo, poveča pa tudi akumulacijo biomase. Optimalni pH je potrebno prilagoditi glede na vir dušika, ki ima vpliv tudi na čas fermentacije (Imshenetskii in sod., 1981a; Bulmer in sod., 1987).

Na količino proizvedenega pululana vplivajo temperatura (McNeal in Kristiansen, 1990), začetni pH gojišča (Imshenetskii in sod., 1981b; Lacroix in sod., 1985; Ono in sod., 1977), količina kisika (Rho in sod., 1988; Wecker in Onken, 1991), koncentracija dušika (Auer in Seviour, 1990; Seviour in Kristiansen, 1983), vir ogljika (Badr-Eldin in sod., 1994), dostopnosti Zn²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺ (Reeslev in Jensen, 1995) in konfiguracija fermentorja (Wecker in Onken, 1991). Molekulska masa nastalega pululana je odvisna od pogojev in seva (Pollock in sod., 1992; Slodki in Cadmus, 1978; Wiley in sod., 1993). Najboljši donos so dosegli, kadar je bila vir ogljika glukoza (Lee in sod., 1999) ob koncu ekspotencialne faze (Leathers, 2002). Inhibitor sinteze je cikloheksimid, kar kaže, da so za proizvodnjo potrebnici novi proteini (Leathers, 2005).

Za industrijske potrebe je za substrat možno uporabiti najrazličnejše organske odpadke: odpadni krompirjev škrob, šotni hidrolizat, sirotko, melaso, ostanke varjenja piva in stiskanja oljčnega olja. Uporaba tovrstnih ostankov je ekološko in ekonomsko zelo napredna. Težave bi se lahko pojavile le pri čistosti in sestavi dobljenega pululana. Ugotovili so, da je donos največji, če pululan pridobivajo iz melase z dodatkom žveplove kisline in aktivnega oglja po 72-urni fermentaciji na optimiziranem gojišču (Göksungur in sod., 2003).

Proizvodnja v grobem obsega 3 faze:

- gojenje celic v fermentacijski brozgi,
- odstranjevanje melanina in
- precipitacija z etanolom.

Pululan nato očistijo melanina in drugih nečistoč z aktivnim ogljem, sušijo in uprašijo. Velik problem predstavlja izjemna viskoznost brozge (Göksungur in sod., 2003).

2.1.7.3.3 Uporaba

Pululan je vsespološno uporaben, edinstven polisaharid z velikim biotehnološkim, industrijskim in komercialnim potencialom saj ima vrsto ugodnih lastnosti: je netoksičen, nehigroskopičen, brez vonja in okusa, topen v topli ali hladni vodi (Singh in sod., 2008), elastičen kot najlon, užiten in biorazgradljiv (Israilides in sod., 1994). Vodne raztopine so viskozne, a ne želirajo. Stabilne so kljub spremjanju pH. Ob sežiganju ne nastajajo strupeni plini, mikroorganizmi pa ga spontano razgradijo, če ga nepredelanega odložimo v naravo. Ima odlične sposobnosti pritrjevanja, z vodo tvori obstojno peno in v nizkih koncentracijah doseže visoko viskoznost raztopine ter tvori za kisik neprepustne filme (Singh in sod., 2008; Leathers, 2003). Ne vsebuje dosti kalorij. Ker je odporen na sesalske amilaze, ga v obravnavajo kot dietni vlakninski nizkokalorični dodatek hrani namesto škroba (Leathers, 2003). Deluje kot prebiotik – omogoča razrast bifidobakterij. Podaljša rok trajanja živila, ker ni razpoložljiv vir ogljika za bakterije. Zavira rast gliv in plesni ter veže prosto vodo ter s tem zniža vodno aktivnost. Podoben je arabski gumi, zato ga lahko dodamo omakam in pijačam kot vezavno sredstvo ali stabilizator (Singh in sod., 2008).

Prekrivne filme iz pululana največ uporablja v farmacevtski industriji, lahko pa služijo tudi za obdelavo sušene hrane, oreškov, testenin, slaščic, zelenjave in mesa kot zaščitna glazura. Stabilizira maščobne raztopine, primeren je za diabetike in bolnike z glukozno intoleranco.

V farmacevtski industriji ga uporablja predvsem za oblaganje tablet s filmi, ker preprečuje spremembo barve skozi čas, podaljša rok trajanja, izboljša topnost v vodi, obeta pa tudi kot konjugat za cepiva. Na viruse se veže kovalentno in s tem poveča proizvodnjo imunoglobulinov razredov G in M. Lahko bi ga uporabili celo za pripravo liposomov in ekspanderja za krvno plazmo namesto dekstrana (Singh in sod., 2008). Uporablja ga tudi kot sredstvo za povečevanje prostornine, vezivo in sredstvo za preprečevanje oksidacije v farmacevtski industriji (Shingel, 2004).

Kozmetična industrija ga meša v losjone, kreme, šampone, zobne paste in dekorativno kozmetiko. Uporaben je v papirni in tiskarski industriji ter elektroniki (Singh in sod., 2008), uveljavil se je tudi kot sestavina premazov za laminate (Gaidhani in sod., 2003).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Laboratorijski pribor

Preglednica 5: Laboratorijski pribor, uporabljen pri raziskovalnem delu

Laboratorijski pribor	Proizvajalec in poreklo
Avtomatska pipeta e5000 BIOHIT	Kemomed, Kranj, Slovenija
Avtomatska pipeta Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Cepilne zanke	
Infuzijske steklenice	
Injekcijske brizge	
Laboratorijska steklovina (čaše, merilni valji, palčke, Erlenmeyerjeve steklenice, petrijevke, sistem za filtracijo, epruvete, centrifugirke)	
Laboratorijske rokavice (nepudrane lateks in nitrilne)	
Mikrocentrifugirke (1,5 mL, 2 mL)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Mikrotitrne plošče z 96 luknjicami	Biokit, Finska
Nastavki za Multipette Plus (Combitpis Plus 0,5 mL)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Nastavki za polavtomatske pipete	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Nosilci iz aluminija	Agar Scientific, ZDA
Objektna in krovna stekelca	
Papirnate brisače	
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, ZDA
Pincete	
Plastična petrijevka, premer 70 mm	Golias, Slovenija
Plastične vrečke	
Polavtomatske pipete	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Spatule	
Škarje	
Vata	
Vatenke	
Viale	Microbank, ZDA
Zaščitna maska z elastiko	Bastos Viegas s.a., Penafiel, Portugalska

3.1.2 Laboratorijske naprave

Preglednica 6: Laboratorijske naprave, uporabljene pri raziskovalnem delu

Laboratorijske naprave	Proizvajalec in poreklo
Aparat PCR Mastercycler	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Aparatura za elektroforezo	Natalia, Belgija
Avtoklav A-63C	Kambič, Semič, Slovenija
Centrifuga 5418	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Entrifuga 5810R	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Digestorij Variolab W90	Waldner Laboratory, Wangen, Nemčija
Ekonom lonec	Clatronic, Kempen, Nemčija
Hladilnik Comfort NoFrost	Liebherr, Nemčija
Hladilnik Electrolux	Švedska
Hladilnik Premium NoFrost	Liebherr, Nemčija
Inkubator	Sutjeska, Bosna in Hercegovina
Inkubator I-105 CK	Kambič, Semič, Slovenija
Inkubator Mini Incubator	Labnet International Inc., New York, ZDA
Komora za slikanje gelov G-BOX	Syngene, Cambridge, Velika Britanija
Laminarij IBK 1 V2	Iskra, Slovenija
Laminarij SC8-R	Labcaire, Velika Britanija
Ledomat ATS 40	Angelantoni Scientifica, Italija
Magnetno mešalo Rotamix 550MMH	Tehnica, Železniki, Slovenija
Mikrovalovna pečica	Gorenje, Slovenija
pH meter Metrohm 713	Tehnica, Železniki, Slovenija
Stereomikroskop	Cark Zeiss MicroImaging Göttingen, Nemčija
Tehnica EXACTA 310EB	Tehnica, Železniki, Slovenija
Vibracijski mešalnik IKA MS3 Basic	IKA Works, Wilmington, ZDA
Vibracijski mešalnik Vortex-Genie2	MO BIO Laboratories Inc., ZDA
Vodna kopel WNE 22	Memmert, Velika Britanija
Svetlobni fazno-kontrastni mikroskop BX 51	Olympus, Tokyo, Japonska
Kljunasto merilo	Metoplast, Italija
Stresalnik Innova 44 Incubator Shaker Series	New Brunswick Scientific, Enfield, ZDA
Evaporator miVac Duo Concentrator	GeneVac, Ipswich, Velika Britanija
Liofilizator Christ Alpha 2-4	MARTIN CHRIST Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Nemčija
Inkubator Sanyo (15 °C)	Sanyo Electric Co., Ltd., Moriguchi, Japonska
Fotoaparat Olympus CAMEDIA C-5050	Olympus, Tokyo, Japonska

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 6.

Preglednica 6: Laboratorijske naprave, uporabljene pri raziskovalnem delu

Laboratorijske naprave	Proizvajalec in poreklo
kromatograf Agilent 1260 HPLC (Kemijski inštitut)	Agilent Technologies, Kalifornija, ZDA
300-MHz Agilent Technologies DD2 spektrometer (Kemijski inštitut)	Agilent Technologies, Kalifornija, ZDA
Inkubator Innova 42 Incubator Shaker Series	New Brunswick Scientific, Enfield, ZDA

3.1.3 Kemikalije in reagenti

Preglednica 7: Kemikalije in reagenti, uporabljeni pri raziskovalnem delu

Kemikalija	Proizvajalec in poreklo
Agar Kobe I	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemčija
Agaroza	Sigma Aldrich Co., St. Louis, ZDA
CTAB	Merck, Darmstadt, Nemčija
dNTP Mix (10mM)	Applied Biosystems, ZDA
EDTA	Merck, Darmstadt, Nemčija
Etanol	Riedel - de Haen, Seelze, Nemčija
Gelsko barvilo SYBR Safe	Invitrogen, Karlsbad, ZDA
Glukoza	Kemika, Zagreb, Hrvaška
Kilobazna lestvica (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus)	Fermentas, Kanada
Kloramfenikol (Ch)	Sigma Aldrich Co., St. Louis, ZDA
Kloroform	Kemika, Zagreb, Hrvaška
Klorovodikova kislina (HCl)	Merck, Darmstadt, Nemčija
Kvasni ekstrakt	Biolife, Milano, Italija
Magnezijev sulfat ($MgSO_4 \times 7H_2O$)	Acros Organics, New Jersey, ZDA
Nanašalni pufer Gel Pilot Loading Dye 5 X	QIAGEN, Nizozemska
Nanašalni pufer Orange G	BioLabs Inc., ZDA
Natrijev klorid (NaCl)	Carlo Erba Reactifs, Francija
Polimeraza Dream TaqDNA Polymerase 5 U/ μ L	Fermentas, Kanada
Polimerazni pufer Dream Taq Buffer 10 X	Fermentas, Kanada
PrepMan Ultra	Applied Biosystems, ZDA
Saharoza	Acros Organics, New Jersey, ZDA
Silikagel	Merck, Darmstadt, Nemčija
Sladni ekstrakt (MEA)	Biolife, Milano, Italija
Tris	Sigma Chemical Company, St. Louis, ZDA

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 7.

Preglednica 7: Kemikalije in reagenti, uporabljeni pri raziskovalnem delu.

Kemikalija	Proizvajalec in poreklo
Na-EDTA	Merck, Darmstadt, Nemčija
D - glukoza	Carlo Erba Reactifs, Francija
D - galaktoza	Acros Organics, New Jersey, ZDA
L - sorboza	Sigma Chemical Company, St. Louis, ZDA
D - glukozamin	Sigma Chemical Company, St. Louis, ZDA
D - riboza	Sigma Chemical Company, St. Louis, ZDA
D - ksiloza	Sigma Chemical Company, St. Louis, ZDA
L - arabinosa	Sigma Chemical Company, St. Louis, ZDA
L - ramnoza	Sigma Chemical Company, St. Louis, ZDA
Maltoza	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, ZDA
α,α - trehaloza	Sigma Chemical Company, St. Louis, ZDA
Celobioza	Kemika, Zagreb, Hrvaška
Melibioza	Sigma Chemical Company, St. Louis, ZDA
Lakoza	Merck, Darmstadt, Nemčija
Rafinoza	Sigma Chemical Company, St. Louis, ZDA
Melezitoza	Sigma Chemical Company, St. Louis, ZDA
Topni škrob	Sigma Aldrich Co., St. Louis, ZDA
Glicerol	Polichimica, Italija
Ribitol	Sigma Chemical Company, St. Louis, ZDA
D - manitol	Kemika, Zagreb, Hrvaška
Galaktitol	Sigma Chemical Company, St. Louis, ZDA
Mio - inozitol	Sigma Chemical Company, St. Louis, ZDA
D - glukonat	Sigma Chemical Company, St. Louis, ZDA
Sukcinat	Sigma Chemical Company, St. Louis, ZDA
Citrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemčija
Metanol	Merck, Darmstadt, Nemčija
Etanol	Merck, Darmstadt, Nemčija
Fruktosa	Sigma Chemical Company, St. Louis, ZDA
Sorbitol	Sigma Chemical Company, St. Louis, ZDA
Glukuronat	Sigma Chemical Company, St. Louis, ZDA
YCB (gojišče z univerzalnim virom ogljika brez vira dušika; angl. Yeast Carbon Base)	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, ZDA
Kalijev nitrat (KNO_3)	Merck, Darmstadt, Nemčija

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 7.

Preglednica 7: Kemikalije in reagenti, uporabljeni pri raziskovalnem delu

Kemikalija	Proizvajalec in poreklo
Natrijev nitrit (NaNO_2)	Alkaloid Skopje, Makedonija
L - lizin	Sigma Chemical Company, St. Louis, ZDA
Amonijev sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	Riedel - de Haën, Seelze, Nemčija
dikalijev hidrogenfosfat (K_2HPO_4)	Kemika, Zagreb, Hrvaška
YNB (gojišče z univerzalnim virom dušika in brez vira ogljika; angl. Yeast Nitrogen Base)	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, ZDA
Pepton	Merck, Darmstadt, Nemčija
Pululan	TCI Chemicals, Zwijndrecht, Belgija
60 % mlečna kislina	
0,05 M NaNO_3	Merck, Darmstadt, Nemčija
0,02 % azid	Sigma Aldrich Co., St. Louis, ZDA
PL aquagel - OH MIXED-M 8 μm (območje 100-10 000)	Polymer Laboratories
0,1M $\text{NaNO}_3\text{(aq)}$	
D_2O	
PCR Master Mix	Promega, Madison, ZDA
anilin modro v mlečni kislini	

3.1.4 Raztopine in pufri

Agarozni gel za elektroforezo:

1 % agarozni gel:

Agaroza	25 mg
1X TAE pufer	25 mL

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

50x TAE pufer:

Tris	242,0g
Ocetna kislina	57,1 mL
0,5 M EDTA pH 8	100 mL

Dopolnimo do 1000 mL z dH₂O, avtoklaviramo 15 min pri 121°C.

CTAB pufer:

Tris	2,42 g
------	--------

NaCl	8,2 g
Na-EDTA	0,74 g
CTAB	2g

Bidestilirana voda (MiliQ) do 80 mL

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

Fiziološka raztopina:

NaCl	9 g
destilirana voda do	1000 mL

Kilobazna lestvica:

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

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

Mešanica silikagela/celita:

silikagel	30 g
celit	15 g

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

3.1.5 Gojiča

Osnovno trdno gojišče MEA:

sladni ekstrakt	20 g
pepton	1 g
glukoza	20 g
agar	20 g
destilirana voda do	1000 mL

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

Poševno trdno gojišče MEA:

Sestavine, enake kot za osnovno trdno gojišče MEA, raztopimo v mikrovalovni pečici, razpipetiramo po 7,2 mL v epruvete in zamašimo z zamaški iz vate. Po avtoklaviranju položimo v poševno lego.

Trdno gojišče MEA z natrijevim kloridom (NaCl):

Osnovnemu gojišču MEA dodamo 50 g natrijevega klorida na 1000 mL gojišča (5 % NaCl m/V).

Gojišče za preizkus asimilacije različnih virov ogljika:

YNB	1,34 g
Agar	4,00 g
Destilirana voda	180 mL

Gojišče avtoklaviramo, ohladimo na 50 °C, dodamo filtrirano (preko 0,22 µm filtra) raztopino posameznega sladkorja in sterilno razlijemo na plošče. Raztopino vira ogljika pripravimo tako, da 1 g sladkorja raztopimo v 20 mL destilirane vode do končne koncentracije 0,5 %.

Uporabili smo sledeče vire ogljika:

Monosaharidi: L-arabinoza, fruktoza, D-galaktoza, D-glukoza, D-glukozamin, D-ksiloza, L-ramnoza, L-sorboza, D-riboza.

Disaharidi: celobioza, laktoza, maltoza, melibioza, saharoza, α,α-trehaloza.

Polisaharidi: melezitoza, rafinoza, topni škrob.

Ostalo (derivati alkoholov): citrat, etanol, galaktitol, glicerol, D-glukonat, glukuronat, D-manitol, metanol, mio-inozitol, ribitol, sorbitol, sukcinat.

Gojišče za preizkus asimilacije različnih virov dušika:

YCB	3,4 g
Agar	4,0 g

Destilirana voda 180 mL

Gojišče avtoklaviramo, ohladimo na 50 °C, dodamo filtrirano (0,22 µm filter) raztopino vira dušika in sterilno razlijemo na plošče. Uporabili smo sledeče vire dušika (količine so navedene za 200 mL gojišča):

nitrat (KNO₃): 0,156 g

nitrit (NaNO₂): 0,052 g

L-lizin 0,112 g

Gojišče PPM (angl. Pullulan Production Medium):

Saharoza 50 g

(NH₄)₂SO₄ 0,6 g

K₂HPO₄ 5 g

MgSO₄ x 7 H₂O 0,4 g

NaCl 1 g

kvasni ekstrakt 0,4 g

Dopolnimo do 1000 mL z destilirano vodo. Z 1 M HCl umerimo pH na 6,5. Odlijemo 100 mL v Erlenmeyerjeve steklenice in avtoklaviramo 15 minut pri 121 °C.

Gojišče za preizkus asimilacije pululana:

Pululan 50 g

(NH₄)₂SO₄ 0,6 g

K₂HPO₄ 5 g

MgSO₄ x 7H₂O 0,4 g

NaCl 1 g

kvasni ekstrakt 0,4 g

Dopolnimo do 1000 mL z destilirano vodo. Z 1 M HCl umerimo pH na 6,5. Razlijemo po 100 mL v Erlenmeyerjeve steklenice in avtoklaviramo 15 minut pri 121 °C.

3.1.6 Uporabljeni mikroorganizmi

Preglednica 8: Seznam uporabljenih sevov in izvor vzorca

EXF številka	Habitat	Lokacija
<i>A. pullulans</i> var. <i>pullulans</i>		
EXF-150	Slanica	Sečoveljske soline, Slovenija
EXF-3374 (CBS 584.75) ^{NT}	<i>Vitis vinifera</i> (vinska trta), površina grozdja	Francija, Beaujolais
EXF-3375 (CBS 701.76)	<i>Malus sylvestris</i> (jablana), jabolko	neznana
<i>A. pullulans</i> var. <i>namibiae</i>		
EXF-3398 (CBS 147.97) ^{NT}	Dolomitski marmor	Namibija
<i>A. pullulans</i> var. <i>subglaciale</i>		
EXF-2491	Led izpod ledenika	Svalbard, Norveška
EXF-2479	Morski led	Svalbard, Norveška
EXF-2481 (CBS 123387) ^{NT}	Ledeniški led iz morske vode	Svalbard, Norveška
EXF-2510	Moulin (luknja v ledeniku kamor odteka voda)	Svalbard, Norveška
<i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>		
EXF-924	Luže na morskem ledu	Svalbard, Norveška
EXF-926	Površinski led na ledeniku	Svalbard, Norveška
EXF-3371 (CBS 11037)	Zemlja	Tajska
EXF-3378 (CBS 110374)	Javni vodomet	Tajska
EXF-3382, 3383, 3384, 3385	Morske globine (4500 m globoko)	Japonska
EXF-3397 (CBS 109800)	Endoperitonealna tekočina	Atene, Grčija
EXF-3399 (CBS 621.80)	Razpadajoče vojaške tkanine	Rusija
EXF-3400 (CBS 100225)	Okno v kopalnici	Hilversum, Nizozemska
EXF-3401 (CBS 123.37)	ni podatka	neznana
EXF-3405 (CBS 105.22) ^{NT}	ni podatka	neznana
EXF-2449	Ledeniški led iz morja	Svalbard, Norveška
EXF-2484	ni podatka	Svalbard, Norveška
Sevi, ki še niso bili določeni do nivoja podvrst		
EXF-2617, 2618	Grozdje iz trgovine, november 2011	Slovenija
EXF-3440	Ledeniški led iz morske vode	Svalbard, Norveška
		Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 8.

Preglednica 8: Seznam uporabljenih sevov in izvor vzorca

EXF številka	Habitat	Lokacija
Sevi, ki še niso bili določeni do nivoja podvrst		
EXF-3519	Hrastov list	Ptuj, Slovenija
EXF-3670, EXF-3793, EXF-3817, EXF-3877, EXF-4251, EXF-4255, EXF-4256, EXF-5652	Ledeniško okolje	Svalbard, Norveška
EXF-3780	Mikrobna preprogla	Portoriko
EXF-3863	Slanica iz solin	Sečovlje, Slovenija
EXF-4010	Led z ledenika s sedimentom	Svalbard, Norveška
EXF-4445 (NRRL Y-2311-12)	Ni podatka	neznana
EXF-4450	Podjetje Iskra	Slovenija
EXF-4454 (MZKI B-241)	Barvan les	Kostarika
EXF-4632	Razpadajoči listi šmarnice (<i>Convallaria</i>)	Ljubljana, Slovenija
EXF-4632 (=MZKI B-692)	ni podatka	ni podatka
EXF-5590, EXF-5628, EXF-5629	Tesnilna guma pomivalnega stroja	Slovenija
EXF-6171, EXF-6176	Črni ledenik	Argentina
EXF-6298	Pralni stroj; predal za prašek	Postojna, Slovenija
EXF-6514	Breskvina pečka	Slovenija
EXF-6519, EXF-6524	Klobučevina s pločevinastega strešnika (notranji del)	Ljubljana, Slovenija
EXF-6604	Korenine ločja	Poljska
EXF-7291, EXF-7292, EXF-7293, EXF-7294, EXF-7295, EXF-7296, EXF-7297, EXF-7298, EXF-7299, EXF-7300, EXF-7301, EXF-7302, EXF-7303, EXF-7304, EXF-7305, EXF-7306, EXF-7307, EXF-7308	Eksoskelet mravlje <i>Atta laevigata</i>	Brazilija

Legenda: ^T=tipski sev; ^{NT}=neotipski sev

3.1.7 Programska oprema

Programska oprema, uporabljena v raziskavi:

- algoritem BLAST (angl. Basic Local Alignment Search Tool) na uradni strani NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Altschul in sod., 1990)
- ClustalX 1.81 (Jeannmougin in sod., 1998)
- MEGA5 (angl. Molecular Evolutionary Genetic Analysis) (Tamura in sod., 2011)
- FinchTV (Geospiza, Seattle, ZDA)

3.1.8 Oligonukleotidni začetniki

Preglednica 9: Oligonukleotidni začetniki, nukleotidna zaporedja in uporaba

Gen ali regija v genomu	Začetni oligonukleotid-zaporedje	Povratni oligonukleotid-zaporedje	Referenca
β - tubulin	T1 5'-AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT-3'	T22 5'-TCT GGA TGT TGT TGG GAA TCC-3'	O'Donnell in Cigelnik, 1997
LSU rDNA	NL 1 5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3'	NL 4 5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G- 3'	Boekhout in Kurtzman, 1996
Translacijski elongacijski faktor 1-alfa	EF1-983F 5'-GCY CCY GGH CAY CGT GAY TTY AT-3'	EF1-2218R 5'-ATG ACA CCR ACR GCR ACR GTY TG-3'	Rehner , 2001
RNA polimeraza II, podenota 2	fRPB2-5f 5'-GAY GAY GW GAT CAY TTY GG-3'	fRPB2-7cR 5'-CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT-3'	Liu in sod., 1999

3.2 METODE

3.2.1 Mikroskopija

Preparate za mikroskopiranje smo pripravili z gojišč (MEA) v 60 % mlečni kislini po pregledu rasti za temperaturni in test melanizacije. Kulture so bile stare 21 dni. Preparate smo pregledovali z DIC (diferencialna interferenčna kontrastna mikroskopija; angl. Differential Interference Contrast microscopy) mikroskopom in mikrografije posneli pod različnimi povečavami (100x, 400x, 1000x povečava) z Olympus DP-12 kamero. Pri kontastiranju neobarvanih kultur smo si pomagali z anilinskim modrilom v mlečni kislini.

3.2.2 Fiziologija

Teste za asimilacijo ogljika in dušika smo izvedli kot navedeno spodaj. Oba tipa testov smo inkubirali pri sobni temperaturi 15 dni. Rast smo preverjali na 5., 10. in 15. dan - ocenili smo jo s prostim očesom upoštevajoč negativno kontrolo. Rast smo opredelili s sledečimi simboli: + : rast; - : ni rasti; W: šibka rast.

3.2.2.1 Asimilacijski testi

3.2.2.1.1 Asimilacija ogljika

Da bi ugotovili zmožnost uporabe različnih virov ogljika, smo 12 sevov *A. pullulans* nacepili na plošče z osnovnim gojiščem YNB, vsakemu smo dodali drug vir ogljika. Za negativno kontrolo je služilo gojišče YNB brez vira ogljika. Tako pripravljena gojišča v laminariju smo inokulirali s sevi (100 µL suspenza kulture v fiziološki raztopini), ki so predhodno rastli na poševnih MEA gojiščih. Za rast na različnih gojiščih smo testirali sledeče seve:

A. pullulans var. *melanogenum*: EXF-3405, EXF-3233 = 3382, EXF-3401, EXF-3399,

A. pullulans var. *subglaciale*: EXF-2481, EXF-2451 = 2510, EXF-2479, EXF-2491,

A. pullulans var. *pullulans*: EXF-3374, EXF-150, EXF-2449,

A. pullulans var. *namibiae*: EXF-3398.

3.2.2.1.2 Asimilacija dušika

Asimilacijo različnih virov dušika smo preverili z nacepljanjem istih 12 sevov na osnovno gojišče brez vira ogljika YCB, ki smo mu dodali različne vire dušika. Tako pripravljena gojišča smo v laminariju inokulirali s sevi (100 µL suspenza kulture v fiziološki raztopini), ki so predhodno rastli na poševnih MEA gojiščih.

Za rast na različnih gojiščih smo testirali sledeče seve:

A. pullulans var. *melanogenum*: EXF-3405, EXF-3233 = 3382, EXF-3401, EXF-3399,

A. pullulans var. *subglaciale*: 2481, EXF-2451 = 2510, EXF-2479, EXF-2491,

A. pullulans var. *pullulans*: EXF-3374, EXF-150, EXF-2449,

A. pullulans var. *namibiae*: EXF-3398.

3.2.2.2 Producija pululana

Poskus 1 (Kachkawa in sod., 2003)

V specifičnem gojišču PPM (Pullulan Production Medium) smo gojili naslednje seve:

A. pullulans var. *subglaciale*: EXF-2479, EXF-2481*, EXF-2491

A. pullulans var. *namibiae*: EXF-3398*

A. pullulans var. *melanogenum*: EXF-3401, EXF-3405*, EXF-3382, EXF-3399

A. pullulans var. *pullulans*: EXF-3374, EXF-3375* (tipski sev)

Sveže kulture na poševnih gojiščih smo suspendirali v fiziološki raztopini in v vsako Erlenmeyerjevo steklenico z gojiščem PPM odpipetirali 1 mL suspenza.

Erlenmeyerjeve steklenice s suspenzom smo inkubirali 3 dni pri 28 °C in 150 rpm. Po končani fermentaciji smo v vsako stehtano centrifugirko odlili 40 mL fermentacijske brozge, centrifugirali 10 min pri 10000 g pri sobni temperaturi, nato pa pričeli z ekstrakcijo pululana iz supernatanta. Deaktivacijo pululanaz smo izvedli z enourno kopeljo pri 80 °C. Po 20 mL supernatanta smo prelili v nove centrifugirke, kamor smo pred tem odmerili po 10 mL 96 % etanola in dali precipitirat na 5 °C za 1 uro. Po končani precipitaciji smo centrifugiranje ponovili pri 10000 g in 20 °C 15 minut. Etanol smo odlili, usedljino prenesli v 2 mL mikrocentrifugirke. Preostali etanol smo evaporirali pri 60 °C, 30 minut (MiniVac). Vzorce smo osušili z zamrzovanjem preko noči in jih (raztopljene bodisi v DMSO-*d*₆ (devteriran dimetil sulfoksid) ali v D₂O) poslali na Kemijski inštitut v Ljubljani, na analizo molske mase in kemijske sestave s tehnikama velikostne izključitvene kromatografije v povezavi z detektorjem na sisanje svetlobe (SEC-MALS) in NMR spektroskopije.

Poskus 2 (prirejeno po Prasongsuk in sod., 2005):

V specifičnem gojišču PPM (Pullulan Production Medium) smo gojili naslednje seve:

A. pullulans var. *subglaciale*: EXF-2479

A. pullulans var. *namibiae*: EXF-3398*

A. pullulans var. *melanogenum*: EXF-3399

A. pullulans var. *pullulans*: EXF-3375* (tipski sev)

Še neklasificirani sevi: EXF-5629, EXF-6298

Sveže kulture na poševnih gojiščih smo suspendirali v fiziološki raztopini in v vsako Erlenmeyerjevo steklenico z gojiščem PPM odpipetirali 1 mL suspenza. Erlenmeyerjeve steklenice s suspenzom smo inkubirali 6 dni pri 28 °C in 180 rpm.

Po fermentaciji smo v centrifugirke odlili po 45 mL fermentacijske brozge. Centrifugirali smo pri 14000 g 30 minut. Supernatant smo prelili v svežo centrifugirko in ga filtrirali preko 0,45 µm filtrov (Millex; low protein binding; SLHV033NB):

1 x 10 mL brozge sevov EXF - 3398, EXF - 3399, EXF - 3375

3 x 10 mL brozge sevov EXF - 5629 (zelo gusta!), EXF - 6298

5 x 10 mL brozge seva EXF - 2479

Pululan smo oborili v dvojnem volumnu 96 % etanola (10 mL filtrata in 20 mL etanola) pri -20 °C, 1 uro. Po precipitaciji smo centrifugirali na 14000 g 30 minut, etanol nato odlili, pelet pa prenesli v 2 mL mikrocentrifugirko. Preostali etanol smo odparili pri 60 °C, 30 minut (MiniVac). Vzorce smo osušili z zamrzovanjem preko noči. Vzorce (raztopljeni bodisi v DMSO-*d*₆ bodisi v D₂O) smo poslali na Kemijski inštitut v Ljubljani, na analizo molske mase in kemijske sestave s tehnikama velikostne izključitvene kromatografije v povezavi z detektorjem na sisanje svetlobe (SEC-MALS) in NMR spektroskopije.

Poskus 3

V specifičnem gojišču PPM (Pullulan Production Medium) smo gojili le sev *A. pullulans* var. *namibiae* EXF-3398. Sveže kulture na poševnih gojiščih smo suspendirali v fiziološki raztopini in v vsako Erlenmeyerjevo steklenico z gojiščem PPM odpipetirali 1 mL suspenza. Erlenmeyerjeve steklenice s suspenzom smo inkubirali 3 oziroma 6 dni pri 28 °C in 150 rpm. Po končani fermentaciji smo pričeli z ekstrakcijo pululana po treh postopkih:

Postopek A

- 45 mL brozge smo odlili v centrifugirke in centrifugirali 30 minut pri 14000 g.
- 10 mL supernatanta prelili v svežo centrifugirko in precipitirali v dvojnem volumnu (20 mL) 96 % etanola 1 uro na -20 °C.
- Centrifugirali 30 minut pri 14000 g.
- Odlili supernatant, pelet pa prenesli v stehtano mikrocentrifugirko.

- Preostali etanol smo odparili iz odprtih mikrocentrifugirk 30 minut pri 60 °C (MiniVac).
- Vzorce smo osušili z zamrzovanjem preko noči.

Postopek B

- 45 mL brozge smo odlili v centrifugirke in centrifugirali 30 minut pri 14000 g.
- Po 10 mL supernatanta smo filtrirali skozi 0,45 µm filter (Millex; low protein binding; SLHV033NB).
- Centrifugirali 30 minut pri 14000 g.
- Odlili supernatant, pelet pa prenesli v stehtano mikrocentrifugirko.
- Preostali etanol smo odparili iz odprtih mikrocentrifugirk 30 minut pri 60 °C (MiniVac).
- Vzorce smo osušili z zamrzovanjem preko noči.

Postopek C

- 45 mL brozge smo odlili v centrifugirke in centrifugirali 30 minut pri 14000 g.
- Supernatant smo prelimili v svežo centrifugirko in ga filtrirali preko 0,45 µm filtrov (Millex; low protein binding; SLHV033NB)
- Filtrat smo precipitirali v dvojnem volumnu 96 % etanola (10 mL filtrata in 20 mL etanola) pri –20 °C 1 uro.
- Centrifugirali 30 minut pri 14000 g, odlili supernatant, pelet pa prenesli v stehtano mikrocentrifugirko.
- Preostali etanol smo odparili pri 60 °C, 30 minut (MiniVac).
- Vzorce smo osušili z zamrzovanjem preko noči.

Vzorce, raztopljene bodisi v DMSO, bodisi v D₂O, smo poslali na analizo molske mase na Kemijski inštitut Ljubljana, kjer opravijo SEC-MALS kromatografijo in NMR spektroskopijo.

Kromatografski pogoji SEC-MALS analiz:

Mobilna faza: 0,05 M NaNO₃, 0,02 % Na azid, pretok topila: 0,5 mL/min.

Kolona in predkolona: PL Aquagel-OH Mixed-M (8 µL),

Volumen injiciranega vzorca: 100 µL, razen pri vzorcu 9, 50 µL.

3.2.3 Analiza zaporedij DNA

Postopek izolacije DNA:

1. V 2 mL mikrocentrifugirko s silikagelno mešanico (silikagel in kovinska kroglica; avtoklavirano) smo odpipetirali 300 µl CTAB pufra.
2. S sterilno spatulo smo prenesli v pufer micelij, ki je zrasel na površini tekočega gojišča ali 1 cm² micelija, vzgojenega na agarnem gojišču.
3. Material smo trli z uporabo homogenizatorja (1 minuto) pri 30 obratov/s.
4. Odpipetirali smo dodatnih 200 µl CTAB pufra in premešali na mešalu (Vortex).
5. Inkubirali smo 30 minut (do 2 uri) v vodni kopeli pri temperaturi 65 °C.
6. V mikrocentrifugirko smo v digestoriju dodali 500 µl kloroforma in premešali na mešalu (1-2 sekundi).
7. Mešanico smo centrifugirali 5 minut pri 14000 rpm.
8. Zgornjo fazo smo odpipetirali v sterilno 1,5 mL mikrocentrifugirko. Preostali material in mikrocentrifugirko smo zavrgli.
9. Dodali smo dvojni volumen (640 µl - 800 µl) 96 % etanola v preostali material.
10. Pazljivo smo nato ročno premešali raztopino in inkubirali pri temperaturi –20°C najmanj 30 minut oziroma preko noči, da DNA precipitira.
11. Centrifugirali 5 minut pri 14000 rpm.
12. Pazljivo odpipetirali supernatant, pelet pa sperali s 500 µl 70 % etanola.
13. Centrifugirali 5 minut pri 14000 rpm, nato pazljivo odpipetirali etanol. Pri tem se peleta nismo dotaknili. Pelet smo osušili na zraku do suhega.
14. Pelet smo nato resuspendirali v 49 µl TE pufra in dodali 1 µl RNAaze.
15. Mikrocentrifugirko inkubirali 5-30 minut v vodni kopeli pri 37 °C.

Izolirano DNA smo pomnožili v reakciji s polimerazo:

V 1,5 mL mikrocentrifugirki smo si pripravili 4 različne mešanice reagentov za vzorce in negativno kontrolo. Skupen volumen mešanice pred dodatkom izolata DNA je bil 49 µL,

to je 25 µL Master Mix-a (Promega, ZDA), 20 µL bidestilirane vode in po 2 µL 10 pmol/µL vsakega oligonukleotida začetnika. V 49 µL mešanico smo odpipetirali po 1 µL DNA.

Program pomnoževanja LSU in ITS regij z napravo PCR:

Začetna denaturacija:	2 minuti pri 95 °C
Denaturacija:	45 sekund pri 95 °C (30 ciklov)
Naleganje začetnih oligonukleotidov:	30 sekund pri 54 °C (30 ciklov)
Elongacija:	2 minuti pri 72 °C (30 ciklov)
Končna elongacija:	4 minute pri 95 °C

Na 1 % agaroznem gelu smo z elektroforezo preverili prisotnost in dolžino pomnožkov.

Pomnožke smo poslali v analizo nukleotidnih zaporej v podjetje Macrogen Europe, kjer so izvedli kapilarno elektroforezo. Pridobljene kromatograme smo prevedli v nukleotidna zaporedja s pomočjo programa FinchTV, le-ta v FASTA formatu vnesli v program MEGA5 (angl. Molecular Evolutionary Genetic Analysis) in poravnali. V literaturi smo poiskali podatke o DNA zaporednjih različnih sevov *A. pullulans* in tako pridobili bolj celostno sliko o raznolikosti znotraj te vrste. V programu MEGA5 smo konstruirali fenetsko koreninjeno drevo po metodi najbližjega soseda (angl. neighbour joining) »Jukes-Cantor« z 2 % divergenco nukleotidnega drevesa.

3.2.4 Temperurni testi

Teden dni stare kulture nacepljene na poševnih gojiščih MEA, inkubirane pri sobni temperaturi, smo suspendirali v fiziološki raztopini in jih s cepilno iglo inokulirali v liniji po centru gojišča MEA. S parafilmom zatesnjene petrijeve plošče smo inkubirali pri 4, 15, 25, 30, 35 in 37 °C v inkubatorjih v temi. Rast in melanizacijo smo preverjali po 14 dneh. Melanizacijo smo ocenili z vrednostmi od 0 (popolnoma svetle barve, brez pigmentacije, rožnata do umazano bela) do 5 (popolnoma počrnele kolonije). Kulture smo fotografirali . Premer kolonij smo izmerili s kljunastim merilom.

4 REZULTATI

4.1 FENETSKO DREVO



Slika 4: Fenetsko drevo sevov *A. pullulans* in sorodnih vrst na osnovi ITS rDNA zaporedij izrisano po metodi najbližjega sosedja

4.2 IDENTIFIKACIJA SEVOV RODU *AUREOBASIDIUM* SHRANJENIH V EX ZBIRKI NA OSNOVI ITS rDNA ZAPOREDIJ

Na osnovi ITS rDNA nukleotidnih zaporedij smo večino izolatov uvrstili v vrsto *A. pullulans*, le en izolat z mavelj (Brazilija) je na osnovi zaporedja 100 % identičen vrsti *A. leucospermi*. Razlike med posameznimi varietetami so bile opazne na nivoju ITS zaporedij – med izolati smo identificirali varieteti *pullulans* in *melanogenum* ter varietete, ki so se od omenjenih in od var. *subglaciale* razlikovale. Le-te smo poimenovali varieteta »nova«, »nova 1«, »nova 2«, »nova 3« in »podobna *subglaciale* 1«(slika 4, preglednica 10).

Preglednica 10: Razvrstitev do sedaj še nerazvrščenih sevov v obstoječe in nove, predlagane varietete znotraj vrste *A. pullulans*

EXF številka	Habitat	Lokacija
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>pullulans</i>		
EXF-2449	Ledeniški led iz morja	Svalbard, Norveška
EXF-2617	Grozde iz trgovine, november 2011	Slovenija
EXF-2618	Grozde iz trgovine, november 2011	Slovenija
EXF-3519	Hrastov list	Ptuj, Slovenija
EXF-3670	Ledeniško okolje	Svalbard, Norveška
EXF-3780	Mikrotna preprogna	Portoriko
EXF-3793	Ledeniško okolje	Svalbard, Norveška
EXF-3817	Ledeniško okolje	Svalbard, Norveška
EXF-3863	Slanica iz solin	Sečovlje, Slovenija
EXF-3877	Ledeniško okolje	Svalbard, Norveška
EXF-4010	Led z ledenika s sedimentom	Svalbard, Norveška
EXF-4251	Ledeniško okolje	Svalbard, Norveška
EXF-4255	Ledeniško okolje	Svalbard, Norveška
EXF-4256	Ledeniško okolje	Svalbard, Norveška
EXF-5628	Tesnilna guma pomivalnega stroja	Blejska Dobrava, Slovenija
EXF-5652	Ledeniško okolje	Ledenik Frias, Argentina
EXF-6176	Ledeniško okolje, črni ledenik,	Ledenik Ventisquero Negro, Argentina
EXF-6298	Pralni stroj; predal za prašek	Postojna, Slovenija
EXF-6514	Breskvina pečka	Slovenija
EXF-6519	Klobučevina s pločevinastega strešnika	Ljubljana, Slovenija
EXF-6604	Korenine ločja	Poljska
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>subglaciale</i>		
EXF-2484	ni podatka	Svalbard, Norveška
EXF-2492	ni podatka	Svalbard, Norveška

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 10.

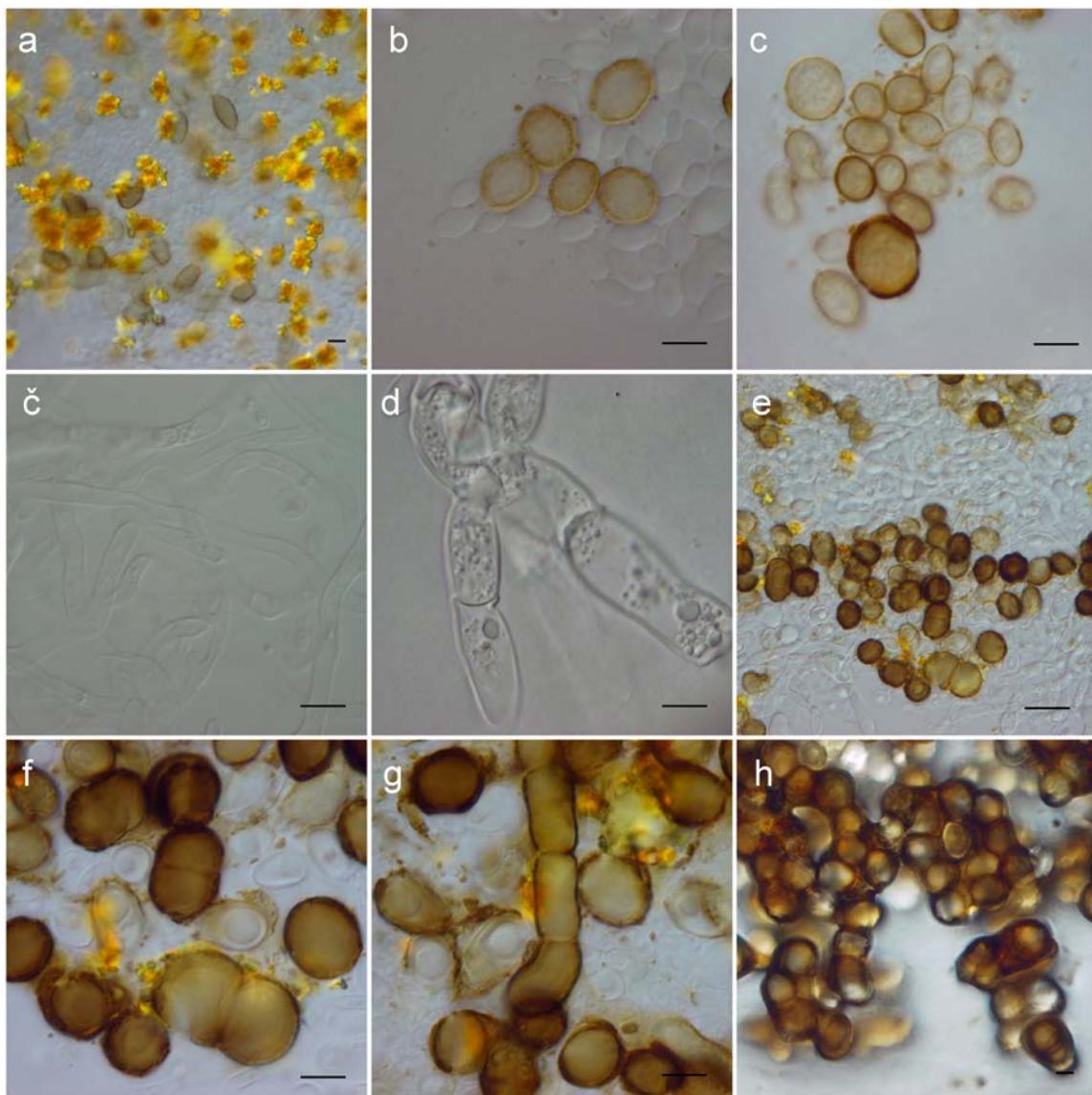
Preglednica 10: Razvrstitev do sedaj še nerazvrščenih sevov v obstoječe in nove, predlagane varietete znotraj vrste *A. pullulans*

EXF številka	Habitat	Lokacija
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>subglaciale</i>		
EXF-3440	Ledeniški led iz morske vode	Svalbard, Norveška
EXF-4632	Razpadajoči listi šmarnice (<i>Convallaria</i>)	Ljubljana, Slovenija
EXF-4632	ni podatka	neznana
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>		
EXF-5590	Tesnilna guma pomivalnega stroja	Slovenija
EXF-6171	Črni ledenik	Argentina
EXF-7291	Eksoskelet mravlje <i>Atta laevigata</i>	Brazilija
EXF-7295	Eksoskelet mravlje <i>Atta laevigata</i>	Brazilija
EXF-7299	Eksoskelet mravlje <i>Atta laevigata</i>	Brazilija
EXF-7300	Eksoskelet mravlje <i>Atta laevigata</i>	Brazilija
EXF-7307	Eksoskelet mravlje <i>Atta laevigata</i>	Brazilija
EXF-7308	Eksoskelet mravlje <i>Atta laevigata</i>	Brazilija
EXF-4450	Podjetje Iskra	Slovenija
EXF-7296	Eksoskelet mravlje <i>Atta laevigata</i>	Brazilija
EXF-7297	Eksoskelet mravlje <i>Atta laevigata</i>	Brazilija
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. "podobna subglaciale 1"		
EXF-4454	Barvan les	Kostarika
EXF-5629	Pomivalni stroj	Slovenija
EXF-6524	Klobučevina s pločevinastega strešnika	Ljubljana, Slovenija
<i>Aureobasidium leucospermi</i>		
EXF-7304	Eksoskelet mravlje <i>Atta laevigata</i>	Brazilija
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. "nova"		
EXF-7292	Eksoskelet mravlje <i>Atta laevigata</i>	Brazilija
EXF-7301	Eksoskelet mravlje <i>Atta laevigata</i>	Brazilija
EXF-7303	Eksoskelet mravlje <i>Atta laevigata</i>	Brazilija
EXF-7305	Eksoskelet mravlje <i>Atta laevigata</i>	Brazilija
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. "nova 1"		
EXF-7293	Eksoskelet mravlje <i>Atta laevigata</i>	Brazilija
EXF-7294	Eksoskelet mravlje <i>Atta laevigata</i>	Brazilija
EXF-7298	Eksoskelet mravlje <i>Atta laevigata</i>	Brazilija
EXF-7306	Eksoskelet mravlje <i>Atta laevigata</i>	Brazilija
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. "nova 2"		
EXF-4445	ni podatka	neznana
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. "nova 3"		
EXF-7302	Eksoskelet mravlje <i>Atta laevigata</i>	Brazilija

4.3 MIKROMORFOLOGIJA PREUČEVANIH SEVOV

Na slikah od 5 do 9 so predstavljene fotografije različnih morfoloških struktur po 21-dnevnom gojenju kultur na trdnih gojiščih MEA pri različnih temperaturah.

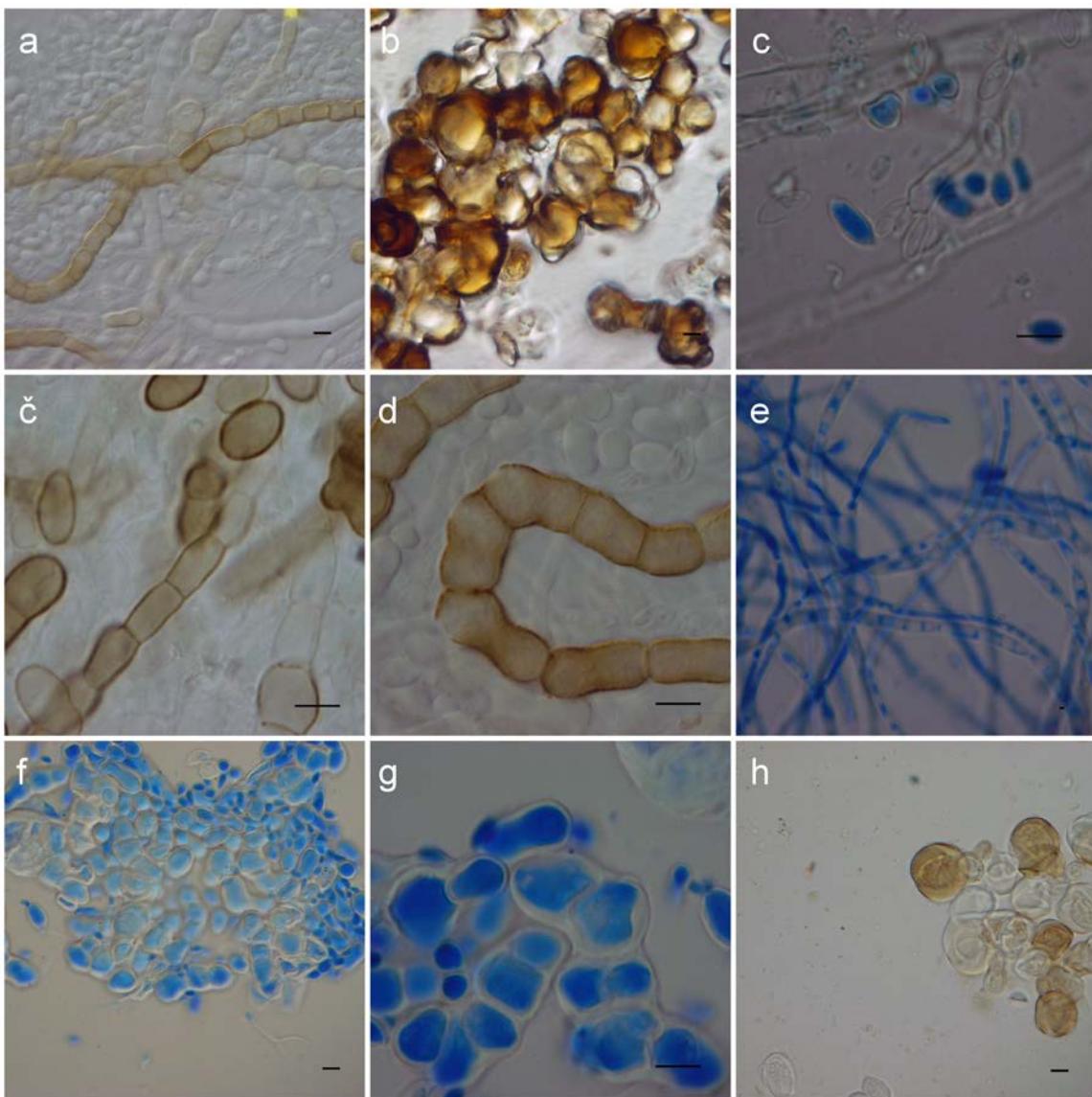
Slika 5 predstavlja kolaž mikrografij *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*. Opazili smo povečevanje melanizacije pri višjih temperaturah inkubacije. Nemelanizirane so bile hife in kvasne celice, melanizirane pa večinoma hlamidospore, ki se pogosteje pojavljajo pri višjih temperaturah. Na sliki 5a so vidne rumene lise, izvencelični melanin.



Slika 5: Kolaž mikrografij *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* (merilo = 100 µm)

Legenda *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* (starost kolonij 21 dni, trdno gojišče MEA):
 a) izvencelični melanin, sev EXF-924 pri 25 °C, povečava: 400x b) temne hlamidospore in prozorne kvasne celice, sev EXF-5590 pri 25 °C, povečava: 1000x c) hlamidospore, sev EXF-5590 pri 25 °C, povečava: 1000x č) micelij, preparat pripravljen iz svetlega sektorja kolonije EXF-924 pri 30 °C, povečava: 1000x d) hife, sev EXF-3401 pri 30 °C, povečava: 1000x e) hlamidospore, preparat pripravljen iz temnega sektorja kolonije EXF-924 pri 30 °C, povečava: 400x f) eno- in dvocelične hlamidospore, preparat pripravljen iz temnega sektorja kolonije EXF-924, povečava: 1000x g) melanizirana hifa in hlamidospore, preparat pripravljen iz temnega sektorja kolonije EXF-924 pri 30 °C, povečava: 1000x h) meristematski skupki, sev EXF-5590 pri 37 °C, povečava 400x

Na sliki 6 je kolaž mikrografij *A. pullulans* var. *pullulans*. Večinoma opazimo hialine hife in kvasne celice, pri višjih temperaturah meristematske skupke, pa tudi temne hlamidospore in melanizirane hife. Temperaturni trend v smislu spremenjanja morfologije je jasan tudi pri tej varieteti.

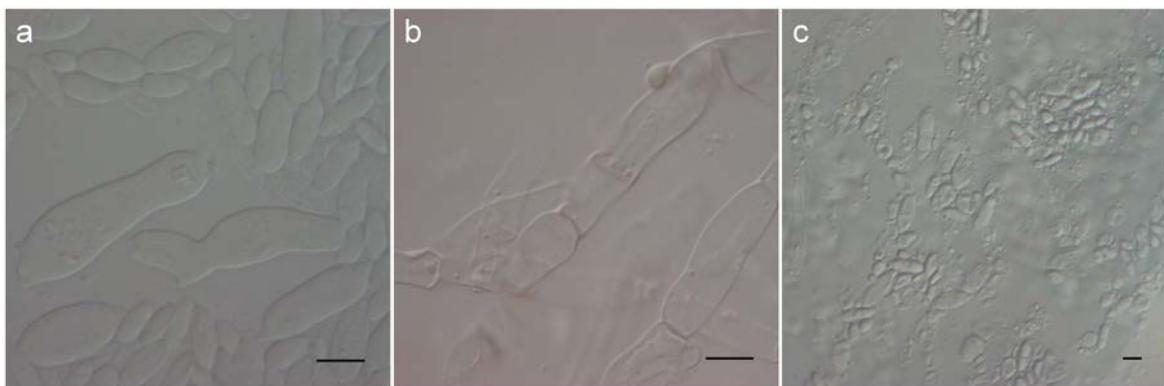


Slika 6: Kolaž mikrografij *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans* (merilo = 100 µm)

Legenda *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans* (starost kolonij 21 dni, trdno gojišče MEA):

a) melanizirane hife in neobarvane kvasne celice, sev EXF-6176 pri 25 °C, povečava 400x b) meristematski skupki, sev EXF-6176 pri 25 °C, povečava: 400x c) kvasne celice, sev EXF-5628 pri 25 °C, povečava: 1000x č) melanizirane hife in hlamidospore, sev EXF-6514 pri 25 °C, povečava: 400x d) melanizirane hife z interkalarnimi hlamidosporami, sev EXF-6176 pri 25 °C, povečava: 1000x e) micelij, sev EXF-3519 pri 30 °C, povečava: 100x f) kvasne celice, sev EXF-5629 pri 30 °C, povečava: 400x g) meristematski skupki, sev EXF-5629 pri 30 °C, povečava: 1000x h) meristematski skupki, sev EXF-6176 pri 37 °C, povečava: 400x

Na sliki 7 je kolaž mikrografij *A. pullulans* var. *subglaciale*. Temperatura gojenja narašča od slike a (4 °C) do slike c (25 °C). Melanizacije in z njo povezanih struktur ne opazimo. Večinoma ta varieteta raste v kvasni obliki, videti je hife in konidiogene celice. Spreminjanja morfologije in pigmentacije z naraščanjem temperature nismo opazili.

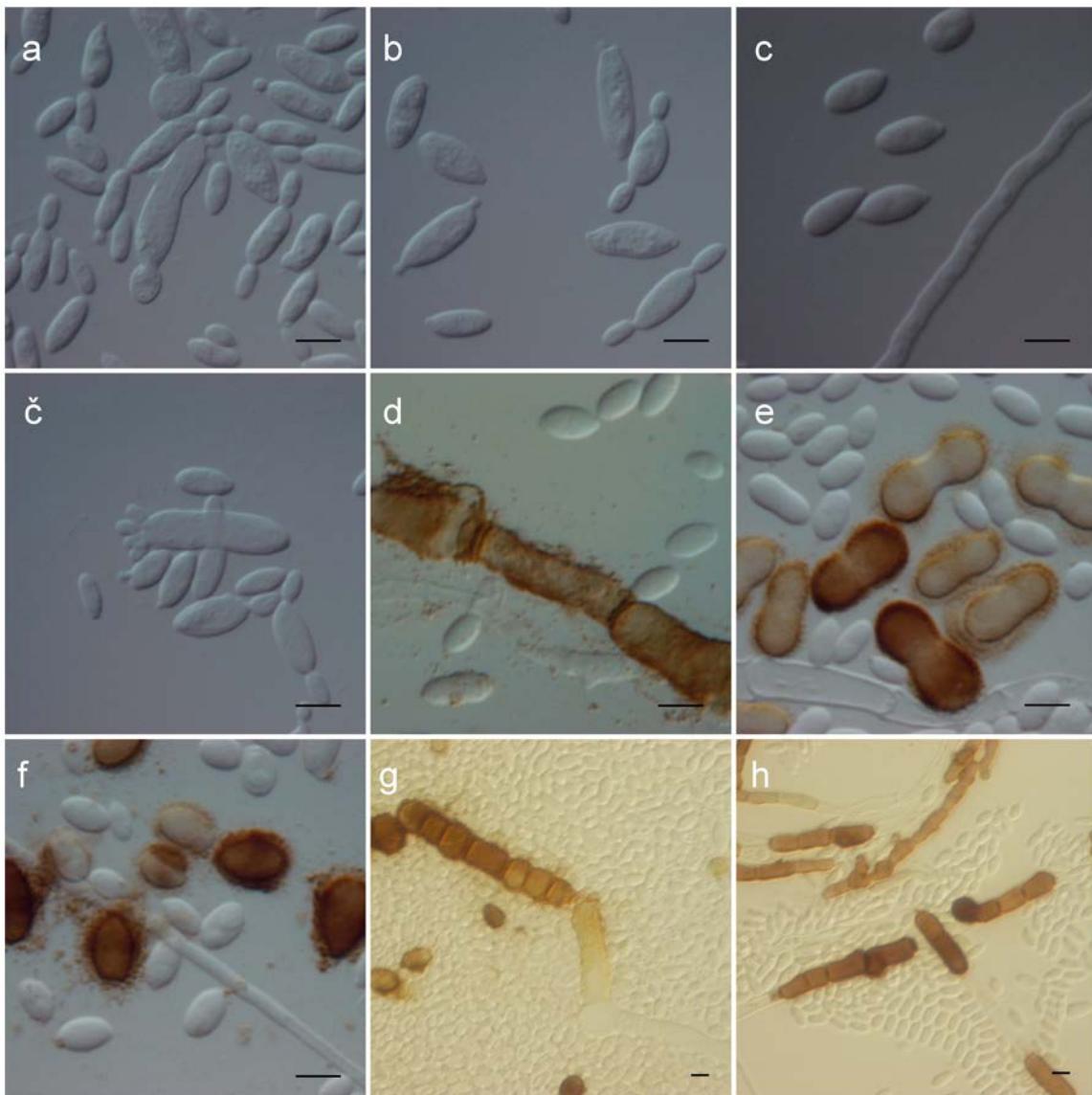


Slika 7: Kolaž mikrografij *Aureobasidium pullulans* var. *subglaciale* (merilo = 100µm)

Legenda *Aureobasidium pullulans* var. *subglaciale* (starost kolonij 21 dni, trdno gojišče MEA):

a) konidiogene celice, sev EXF-2479 pri 4 °C, povečava: 1000x b) hife, sev EXF-2479 pri 15 °C, povečava: 1000x c) kvasne celice, sev EXF-2479 pri 25 °C, povečava: 400x

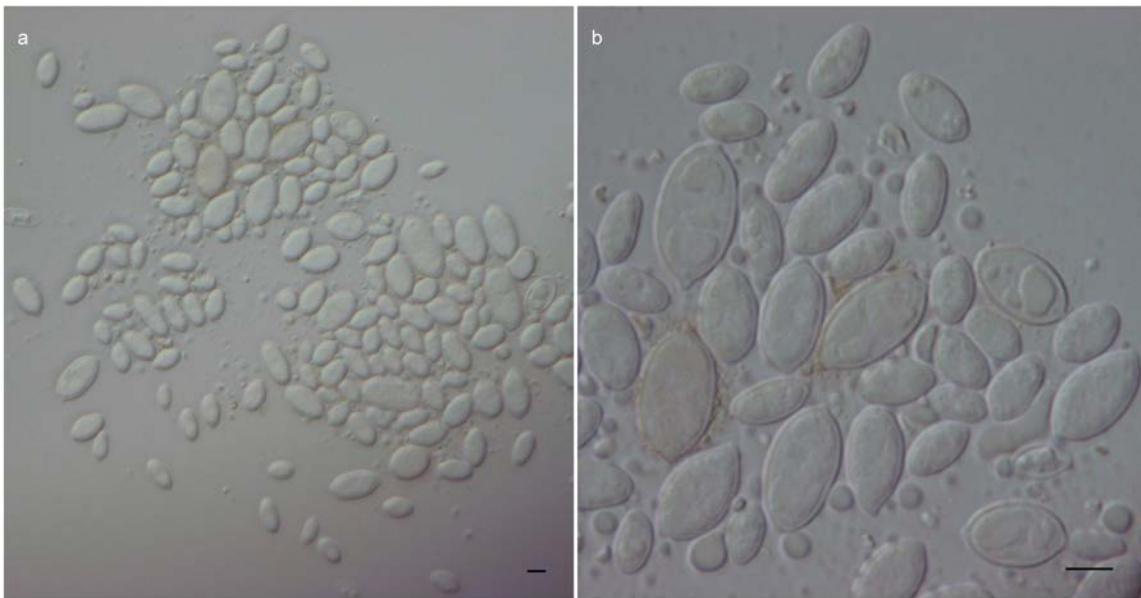
Na sliki 8 je kolaž mikrografij varietete *A. pullulans* var. *namibiae*. Na slikah od a do č opazimo konidije, ki izraščajo simultano v skupkih (č). Za varieteto so značilne hife, ki se lokalno lahko pretvorijo v debelostenske temnorjave, ki so prikazane na sliki d. Na slikah e, f in h so debelostenske pigmentirane hlamidospore, ki so najverjetneje vpletene v sintezo melanina.



Slika 8: Kolaž mikrografij *Aureobasidium pullulans* var. *namibiae* (merilo = 100 µm)

Legenda *Aureobasidium pullulans* var. *namibiae* (sev EXF-3398, starost kolonij 21 dni, trdno gojišče MEA na 25 °C): a) konidiji, povečava: 1000x b) konidiji, povečava: 1000x c) hife, povečava: 1000x č) konidiji, povečava: 1000x d) hife, povečava: 1000x e) hlamidospore, povečava: 1000x f) hlamidospore, povečava: 400x g) hife, povečava: 400x h) hlamidospore, povečava: 400x

Na sliki 9 je kolaž mikrografij *A. pullulans*, ki smo jo na podlagi nukleotidnih zaporedij (glej poglavje 4.1) uvrstili v še neopisano, novo varieteto. Temperatura gojenja je bila 15 °C. Večinoma opazimo le kvasne celice, zasledimo nastavke tvorbe blastokonidijev. Pri tej skupini prav tako ne opazimo temperaturnega trenda melanizacije in morfološke transformacije.



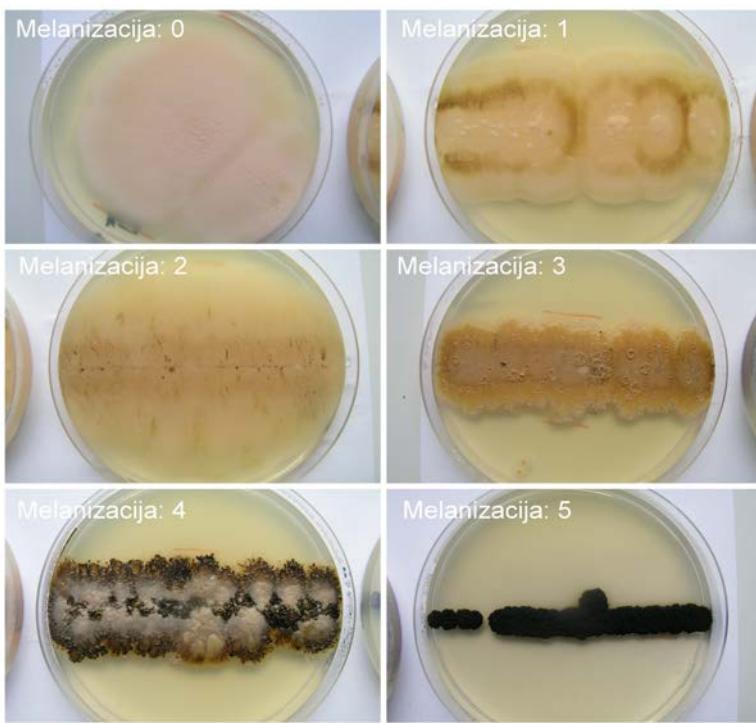
Slika 9: Kolaž mikrografij še nerazvrščenih sevov *A. pullulans* (merilo = 100 µm)

Legenda *Aureobasidium pullulans* var. »nova« (starost kolonij 21 dni, trdno gojišče MEA):

- a) kvasne celice, sev EXF-4454 pri 15 °C, povečava: 400x
- b) kvasne celice, sev EXF-4454 pri 15 °C, povečava: 1000x

4.4 TEMPERATURNI TESTI IN MELANIZACIJA

Rast pri šestih različnih temperaturah smo preverili pri 62 sevih vrste *Aureobasidium pullulans* (naštetih v preglednici 8). Pri tem smo spremljali tudi obarvanost kolonij ko, in določili stopnjo melanizacije glede na izbrane kriterije. Primeri ocen melanizacije so prikazani na sliki 10.



Slika 10: Standardi za ocenitev melanizacije

Preglednica 11 prikazuje premer rasti in stopnjo melanizacije za preučevane seve pri različnih temperaturah od 5 °C do 37 °C.

Varieteta *melanogenum* slabo raste pri nizkih, dobro pa raste pri višjih temperaturah, ko tudi izloča melanin. Melanizacija je najbolj intenzivna pri večini sevov pri 35 oz. 37 °C.

Varieteta *namibiae*, kamor sodi le en sev raste pri vseh preizkušenih temperaturah, najbolje pri sobni, ko prične tudi melanizacija.

Varieteta *pullulans* raste tudi pri 5 °C, vendar šibko. Najbolje uspeva pri zmernih temperaturah. V območju, ker prejšnji dve varieteti melanizirata, pa večina sevov te varietete ne raste. Tudi melanizacija je redka, opazimo pa izločanje oranžnega pigmenta. Pri vseh sevih smo opazili makromorfološko spreminjanje kolonij skozi čas in pri spremembi gojitvene temperature.

Podatki o premeru rasti v milimetrih in ocena melanizacije so podani v preglednici 11.

Preglednica 11: Premeri kolonij v mm in ocena melanizacije (0-5) pri različnih temperaturah inkubacije sevov vrste *Aureobasidium pullulans*

EXF številka	Temperatura inkubacije (°C)					
	5	15	25	30	35	37
<i>A. pullulans</i> var. <i>pullulans</i>						
EXF-3374	10/M0	34/M0	61/M0	7/M0	/	/
EXF-3375	4/M0	28/M0	55/M0	10/M0	/	/
EXF-6604	3/M0	29/M0	58/M0	7/M1	/	/
EXF-6514	2/M0	13/M0	17/M0	6/M0	/	/
EXF-5628	/	30/M0	43/M0	/	/	/
EXF-2617	6/M0	19/M0	23/M0	16/M0	/	/
EXF-2618	3/M0	14/M1	29/M1	kont.	/	/
EXF-3863	9/M0	32/M0	70/M0	/	/	/
EXF-4010	10/M0	25/M0	43/M0	4/M0	/	/
EXF-4251	12/M0	38/M0	56/M0	11/M0	/	/
EXF-4256	11/M0	30/M0	53/M0	11/M0	/	/
EXF-4255	/	26/M0	40/M0	/	/	/
EXF-3817	10/M0	42/M0	57/M0	/	/	/
EXF-3670	9/M0	24/M0	56/M0	/	/	/

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 11.

Preglednica 11: Premeri kolonij v mm in ocena melanizacije (0-5) pri različnih temperaturah inkubacije sevov vrste *Aureobasidium pullulans*

EXF številka	temperatura inkubacije (°C)					
	5	15	25	30	35	37
<i>A. pullulans</i> var. <i>pullulans</i>						
EXF-5652	/	14/M0	14/M1	18/M2	<i>Exophiala</i> kont.	
EXF-6176	3/M0	29/M3	67/M2	31/M3	8/M4	5/M5
EXF-3793	/	40/M0	/	/	/	/
EXF-3877	6/M0	38/M0	63/M0	15/M0	/	/
EXF-3780	8/M0	32/M0	52/M0	8/M0	/	/
EXF-3519	10/M0	44/M0	54/M0	8/M0	/	/
EXF-6298	5/M0	37/M0	57/M0	14/M0	/	/
EXF-6519	5/M0	28/M0	32/M0	15/M0,5	/	/
<i>A. pullulans</i> var. <i>namibiae</i>						
EXF-3398	2/M0	30/M0	46/M1	35/M4	8/M5	6/M5
<i>A. pullulans</i> var. <i>subglaciale</i>						
EXF-2491	6/M0	31/M0	31/M0	/	/	/
EXF-2479	7/M0	27/M0	36/M2	/	/	/
<i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>						
EXF-3405	/	17/M1	48/M3	49/M3	/	/
EXF-3397	/	15/M1	35/M3	40/M4	20/M5	7/M4
EXF-3371	5	25/M3	50/M4	50/M5	8/M5	7/M5
EXF-3378	/	18/M1	45/M1	44/M1	10/M1	7/M4
EXF-3399	/	46/M0	45/M1	ni plošče	/	/
EXF-3401	/	/	/	37/M2	/	/
EXF-3384	/	32/M0	42/M1	44/M3	9/M5	9/M5
EXF-3385	2/M0	30/M1	45/M2	48/M4	10/M5	7/M5
EXF-6171	3/M0	26/M0	57/M2	30/M3	12/M5	8/M5
EXF-7308	3/M0	12/M1 oranžna	55/M3	35/M5	10/M5	3/M0
EXF-5590	4/M0	14/M1	22/M3	27/M4	9/M4	17/M5
EXF-7295	2/M0	20/M2 oranžna	34/M2 oranžna	39/M3 oranžna	9/M5	7/M5
EXF-7300	3/M0	38/M1 oranžna	56/M2 oranžna	55/M4	9/M4	6/M4
EXF-7307	2/M0	15/M0	35/M0,5	37/M3	7/M5	6/M5
EXF-7291	/	18/M0	39/M0	28/M2	4/M5	3/M5
EXF-7299	3/M0	16/M0	33/M0	42/M1	7/M0	3/M0

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 11.

Preglednica 11: Premeri kolonij v mm in ocena melanizacije (0-5) pri različnih temperaturah inkubacije sevov vrste *Aureobasidium pullulans*

EXF številka	Temperatura inkubacije (°C)					
	5	15	25	30	35	37
EXF-7296	1/M0	16/M0	50/M1	25/M2	5/M4	4/M1
EXF-7297	2/M0	12/M0	24/M0	23/M4	7/M3	7/M3
EXF-924	3/M1	37/M1	45/M3	18/M3	5/M5	3/M5
EXF-926	5/M0	19/M1	36/M3	9/M4	3/M5	/
EXF-3382	/	10/M3	36/M4	13/M1	7/M0	5/M0
EXF-3383	2/M0	25/M4	45/M4	32/M4	4/M5	4/M4
<i>A. pullulans</i> var. "podobna subglaciale 1"						
EXF-6524	7/M0	30/M0	25/M0	/	/	/
EXF-4454 (MZKI B- 241)	/	12/M0	65/M1	25/M1	/	/
EXF-5629	4/M0	14/M0	36/M1	8/M0	/	/
<i>A. leucospermi</i> sp. nov.						
EXF-7304	2/M0	19/M0,5	50/M3	12/M2	2/M0	1/M0
EXF-3400	3/M0	27/M0	41/M1	11/M0	/	/
<i>A. pullulans</i> var. "nova"						
EXF-7292*	/	11/M0	18/M0	36/M0	35/M0	36/M0
EXF-7301*	/	/	7/M1	19/M0	14/M0	4/M0
EXF-7303*	4/M0	15/M0	20/M1	7/M1	/	/
EXF-7305*	/	10/M0	20/M1	20/M1	12/M1	8/M1
<i>A. pullulans</i> var. "nova"						
EXF-7293	2/M0	13/M0	24/M0	5/M1	/	/
EXF-7306	4/M0	16/M0	50/M1 oranžna	22//M1	3/M0	/
EXF-7298	4/M0	15/M0	28/M0	15/M0	/	/
<i>A. pullulans</i> var. "nova 2"						
EXF-4445	/	34/M0 oranžna	44/M0 oranžna	44/M0	4/M0	/
<i>A. pullulans</i> var. "nova 3"						
EXF-7302	0	14/M3	37/M4	8/M3	4/M0	/

Fotografije plošč po 3 tednih pri različnih temperaturah (5 °C, 15 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 37 °C) smo posneli z digitalnim fotoaparatom ob pregledu rasti in melanizacije.

4.4.1 Fotografije plošč *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum*



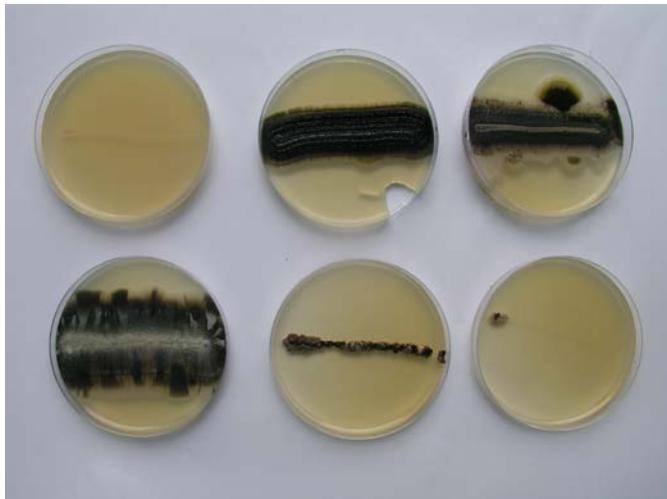
Slika 11: Rast in melanizacija seva EXF-924 pri različnih temperaturah po 21 dneh



Slika 12: Rast in melanizacija seva EXF-926 pri različnih temperaturah po 21 dneh



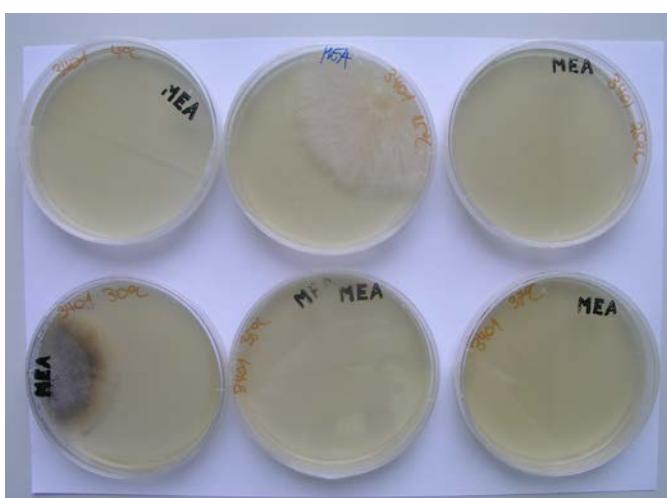
Slika 13: Rast in melanizacija seva EXF-3382 pri različnih temperaturah po 21 dneh



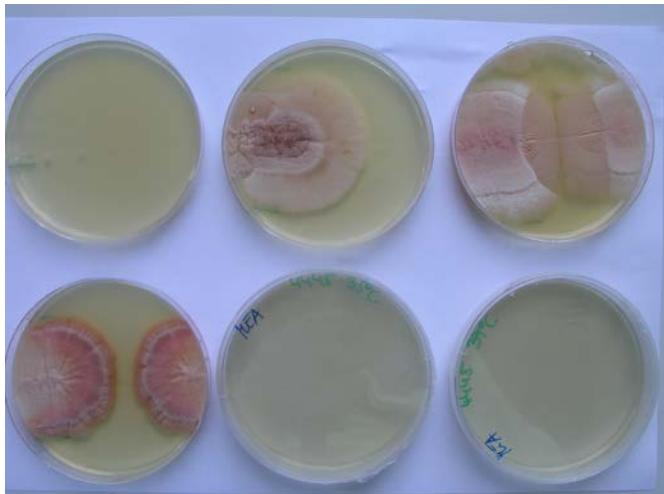
Slika 14: Rast in melanizacija seva EXF-3383 pri različnih temperaturah po 21 dneh



Slika 15: Rast in melanizacija seva EXF-3399 pri različnih temperaturah po 21 dneh



Slika 16: Rast in melanizacija seva EXF-3401 pri različnih temperaturah po 21 dneh



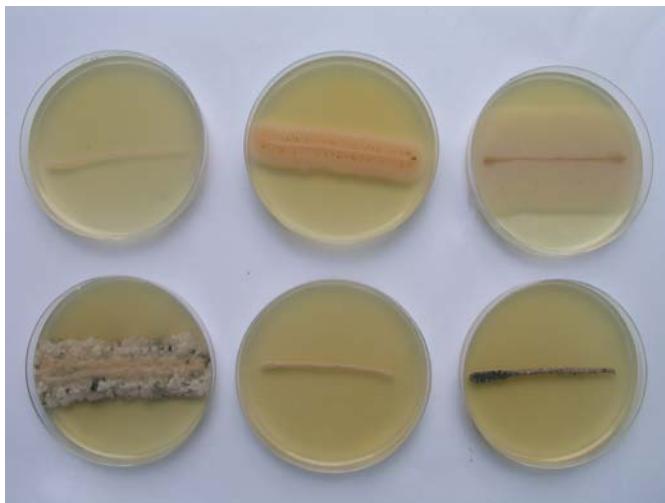
Slika 17: Rast in melanizacija seva EXF-4445 pri različnih temperaturah po 21 dneh



Slika 18: Rast in melanizacija seva EXF-5590 pri različnih temperaturah po 21 dneh



Slika 19: Rast in melanizacija seva EXF-7295 pri različnih temperaturah po 21 dneh



Slika 20: Rast in melanizacija seva EXF-7296 pri različnih temperaturah po 21 dneh

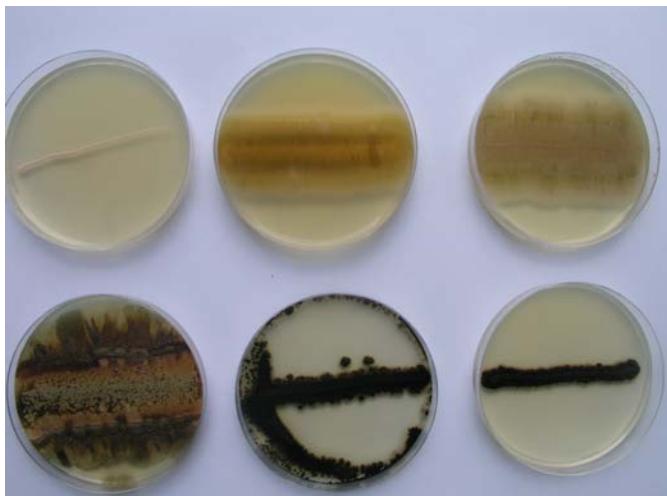


Slika 21: Rast in melanizacija seva EXF-7300 pri različnih temperaturah po 21 dneh



Slika 22: Rast in melanizacija seva EXF-7308 pri različnih temperaturah po 21 dneh

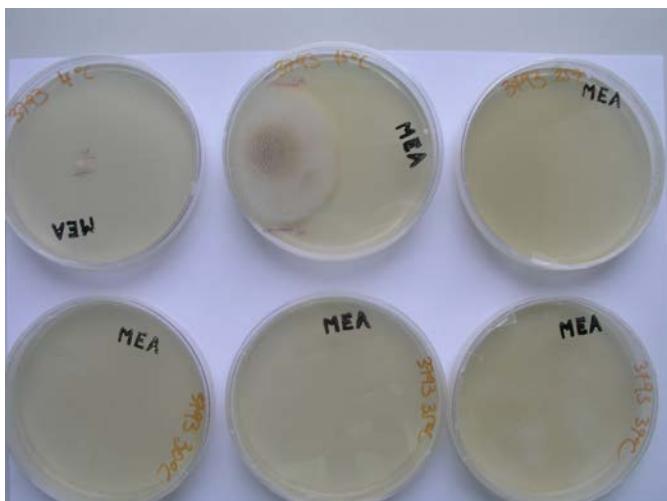
4.4.2 Fotografije plošč *Aureobasidium pullulans* var. *namibiae*



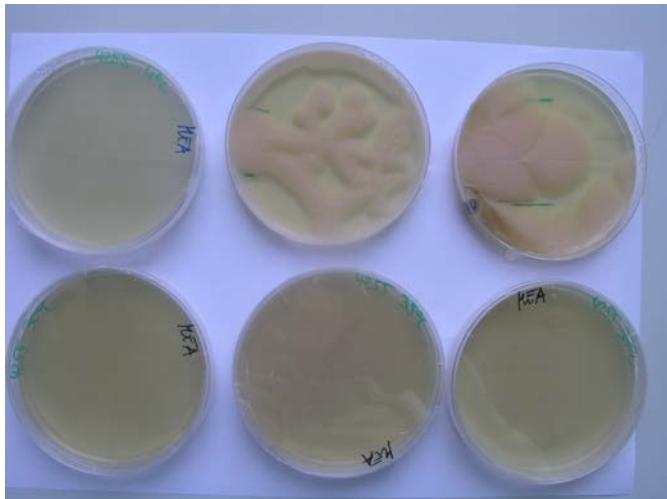
Slika 23: Rast in melanizacija seva EXF-3398 pri različnih temperaturah po 21 dneh



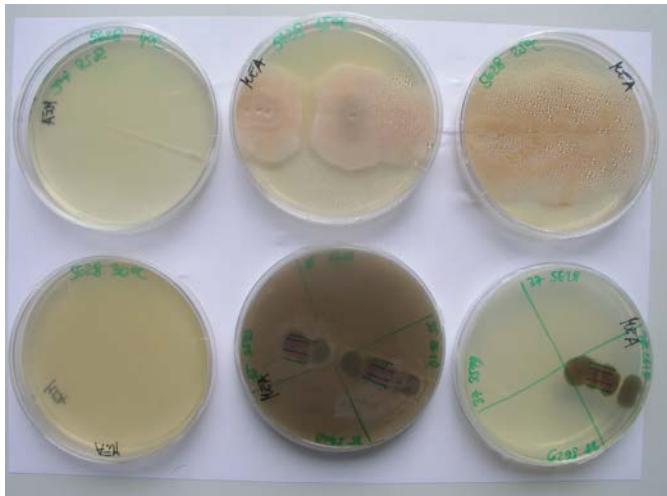
Slika 24: Rast in melanizacija seva EXF-3375 pri različnih temperaturah po 21 dneh



Slika 25: Rast in melanizacija seva EXF-3793 pri različnih temperaturah po 21 dneh



Slika 26: Rast in melanizacija seva EXF-4255 pri različnih temperaturah po 21 dneh

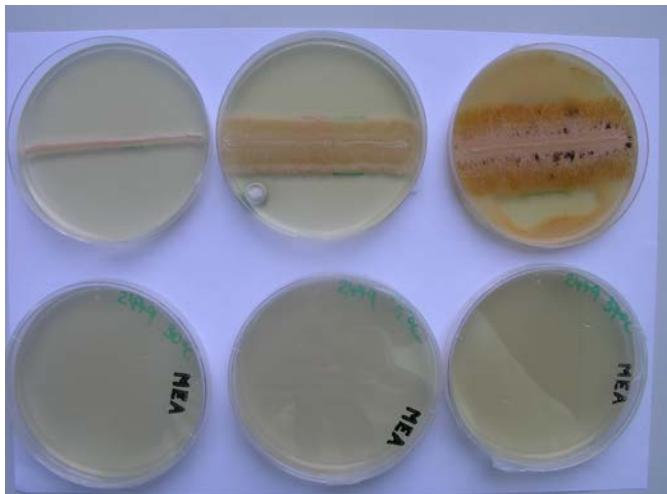


Slika 27: Rast in melanizacija seva EXF-5628 pri različnih temperaturah po 21 dneh

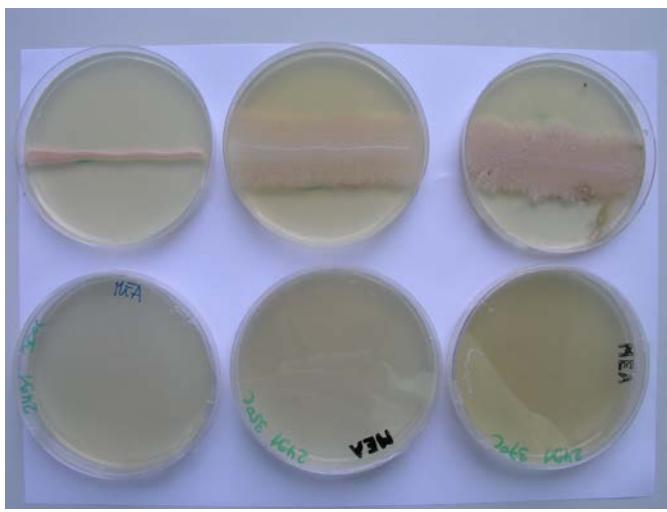


Slika 28: Rast in melanizacija seva EXF-6176 pri različnih temperaturah po 21 dneh

4.4.3 Fotografije plošč *Aureobasidium pullulans* var. *subglaciale*

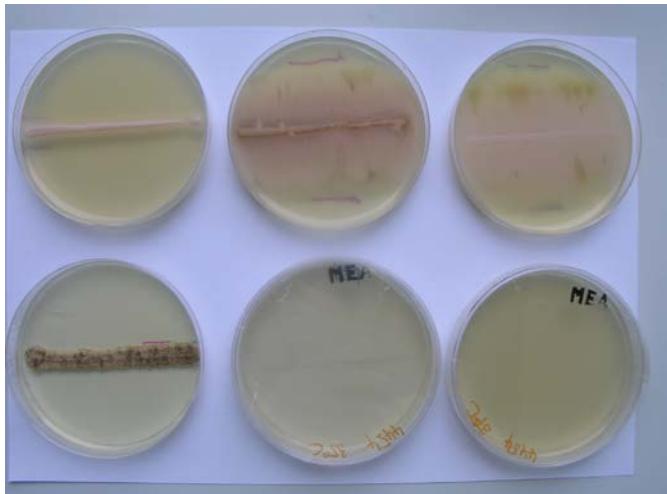


Slika 29: Rast in melanizacija seva EXF-2479 pri različnih temperaturah po 21 dneh

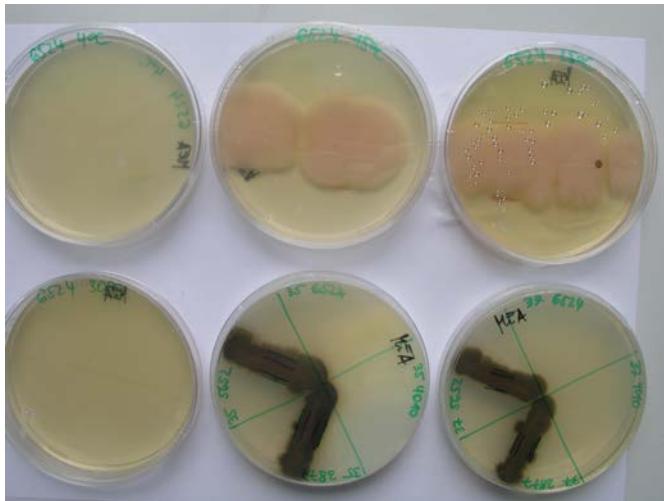


Slika 30: Rast in melanizacija seva EXF-2491 pri različnih temperaturah po 21 dneh

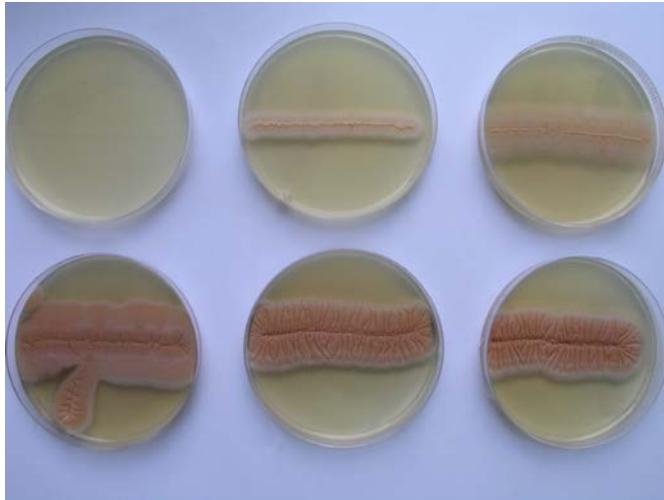
4.4.4 Fotografije plošč *Aureobasidium pullulans* var. »nova«



Slika 31: Rast in melanizacija seva EXF-4454 pri različnih temperaturah po 21 dneh



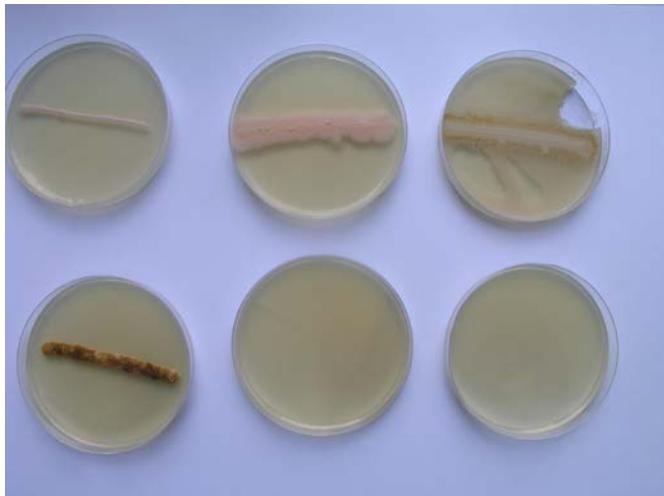
Slika 32: Rast in melanizacija seva EXF-6524 pri različnih temperaturah po 21 dneh



Slika 33: Rast in melanizacija seva EXF-7292 pri različnih temperaturah po 21 dneh



Slika 34: Rast in melanizacija seva EXF-7301 pri različnih temperaturah po 21 dneh



Slika 35: Rast in melanizacija seva EXF-7303 pri različnih temperaturah po 21 dneh

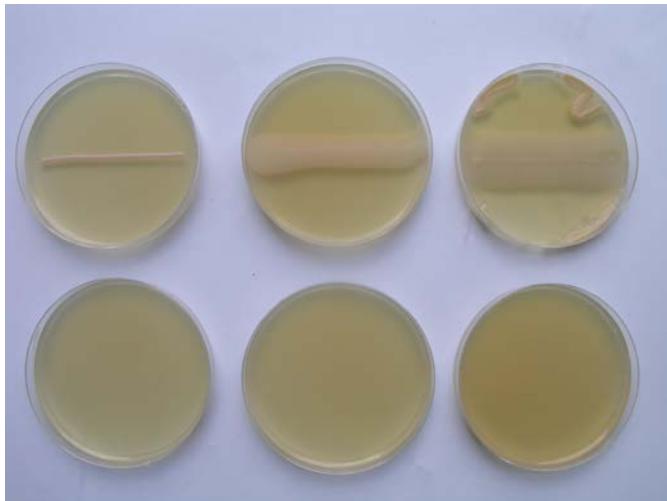


Slika 36: Rast in melanizacija seva EXF-7305 pri različnih temperaturah po 21 dneh

4.4.5 Fotografije plošč *Aureobasidium pullulans* var. »nova 1«



Slika 37: Rast in melanizacija seva EXF-7293 pri različnih temperaturah po 21 dneh



Slika 38: Rast in melanizacija seva EXF-7294 pri različnih temperaturah po 21 dneh



Slika 39: Rast in melanizacija seva EXF-7298 pri različnih temperaturah po 21 dneh



Slika 40: Rast in melanizacija seva EXF-7306 pri različnih temperaturah po 21 dneh

4.4.6 Fotografije plošč *Aureobasidium leucospermi* sp. nov.



Slika 41: Rast in melanizacija seva EXF-3400 pri različnih temperaturah po 21 dneh



Slika 42: Rast in melanizacija seva EXF-7304 pri različnih temperaturah po 21 dneh

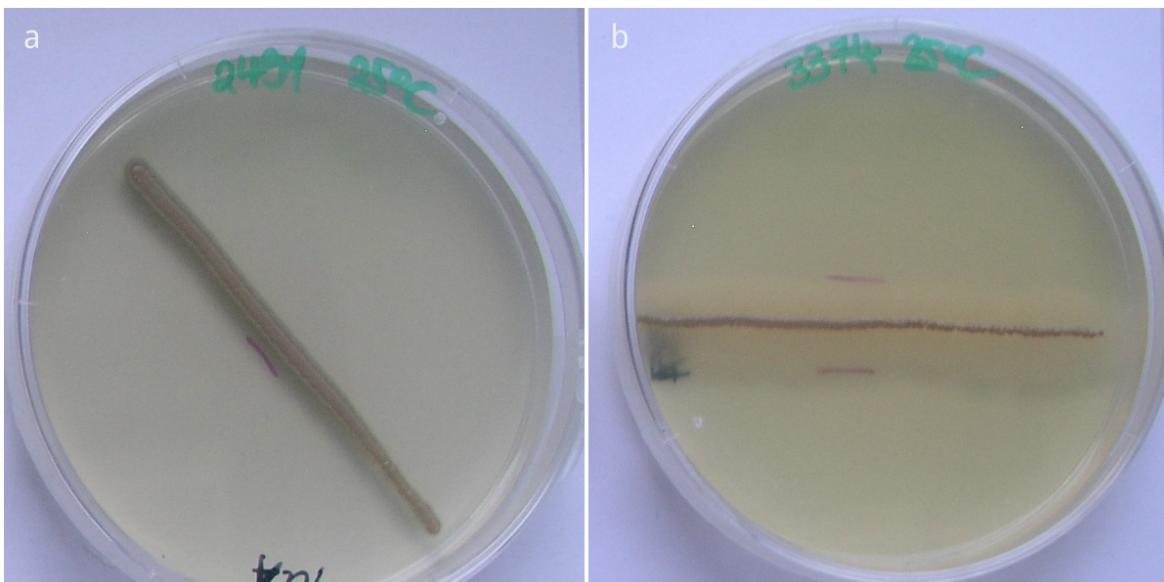
4.4.7 Fotografije plošč *Aureobasidium pullulans* var. »nova 3«



Slika 43: Rast in melanizacija seva EXF-7302 pri različnih temperaturah po 21 dneh

4.5 KOEKSISTENCA AUREOBASIDIUM PULLULANS IN EXOPHIALA DERMATITIDIS

Slika 44a prikazuje kontaminacijo, ki jo je povzročila *Exophiala dermetitidis*, slika 44b pa primer koeksistence *Aureobasidium pullulans* in *Exophiala dermetitidis*, ki nam je v prvem poskusu temperaturnega testiranja povzročila nekaj težav.



Slika 44: Koeksistencija *Exophiala* spp. in *Aureobasidium pullulans*

a) Na plošči nacepljeni iz domnevno čiste kulture *Aureobasidium pullulans* var. *subglaciale*, EXF-2491, inkubirane pri 25 °C, raste *Exophiala* spp. b) Na plošči domnevno čiste kulture EXF-2491 pri 25 °C skupaj rasteta *Exophiala* spp. (temna lisa na sredini) in *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans*

4.6 ASIMILACIJSKI TESTI

Asimilacijo posameznih virov ogljika in dušika smo preverili pri 12 sevih *A. pullulans* različnih varietet. Da bi ugotovili zmožnost uporabe različnih virov ogljika, smo 12 sevov *A. pullulans* nacepili na plošče z osnovnim gojiščem YNB, vsakemu smo dodali drug vir ogljika. Za negativno kontrolo je služilo gojišče YNB brez vira ogljika.

Opazili smo, da imajo preizkušeni sevi širok spekter asimilacije virov ogljika. Na njih dobro rastejo, vidna je preferenca za disaharide. Na dušikovih spojinah hitro in bujno rastejo. Izrazito pa je spremnjanje makromorfologije kolonij in njihove pigmentiranosti glede na podlago na kateri rastejo. Rast in s tem asimilacija različnih virov ogljika in dušika, ki smo jih preverjali po različnih časih inkubacije kultur je prikazana v preglednicah 12 do 14.

Preglednica 12: Rast sevov *Aureobasidium pullulans* na različnih virih ogljika in dušika na 5. dan

Preglednica 13: Rast sevov *Aureobasidium pullulans* na različnih virih ogljika in dušika na 10. dan

Varieteta	<i>melanogenum</i>				<i>subglaciale</i>				<i>pullulans</i>			nam.
Sev EXF	3405	3382	3401	3399	2481	2510	2479	2491	3374	150	2449	3398
Viri ogljika												
YNB (neg. kontrola)	W	W	-	-	-	W	-	-	W	W	-	-
D-glukoza	+	+	+	W	W	+	W	W	+	W	-	W
D-galaktoza	+	+	+	W	W	+	+	W	+	+	+	+
L-sorboza	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glukozamin	+	+	+	+	+	+	+	+				
D-riboza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ksiloza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
saharoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
maltoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α, α trehaloza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
celobioza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
melibioza	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+
laktoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
rafinoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
melezitoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
topni škrob	+	+	+	+	W	+	+	+	W	+	+	+
glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
galaktitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mioinozitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glukonat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+
sukcinat	+	+	+	+	-	-	-	-	W	W	+	+
citat	+	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
metanol	+	+	+	+	W	+	+	+	+	W	+	+
etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
fruktoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
glukuronat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	+
Viri dušika												
YCB (neg. kontrola)	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
nitrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
nitrit	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-lizin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glukozamin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5 % NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	W	W	W	+

Preglednica 14: Rast sevov *Aureobasidium pullulans* na različnih virih ogljika in dušika na 15. dan

4.7 ANALIZA SINTEZE PULULANA

4.7.1 Analiza donosa pululana

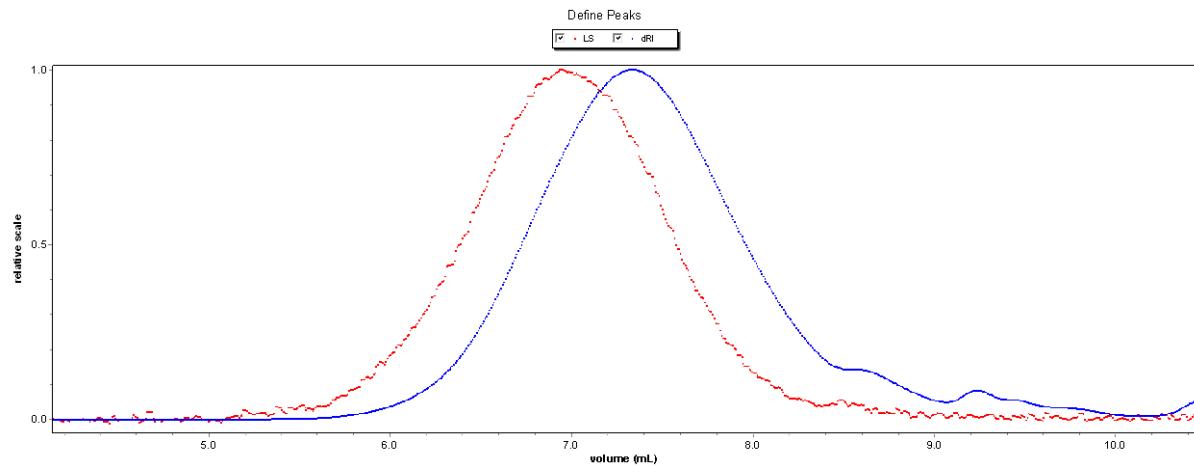
Preglednica 15: Donos pululana glede na čas fermentacije in postopek ekstrakcije

Zap. št.	Gojišče in čas inkubacije	Paralelka	Postopek ekstrakcije	Donos (g) pululana na 1 L ferment. brozge
1	PPM-3 dni	1	B	2,0
2	PPM-3 dni	1	B	2,2
3	PPM-3 dni	1	B	2,2
4	PPM-3 dni	2	B	2,0
5	PPM-3 dni	2	B	2,2
6	PPM-3 dni	2	B	2,2
10	PPM-3 dni	1	A	4,0
11	PPM-3 dni	2	A	4,7
13	PPM-3 dni	1	C	3,8
14	PPM-3 dni	2	C	4,4
16	PPM-6 dni	1	B	0,7
17	PPM-6 dni	1	B	1,6
18	PPM-6 dni	1	B	1,6
19	PPM-6 dni	2	B	1,3
20	PPM-6 dni	2	B	1,6
21	PPM-6 dni	2	B	1,6
25	PPM-6 dni	1	A	5,3
26	PPM-6 dni	2	A	6,0
28	PPM-6 dni	1	C	4,7
29	PPM-6 dni	2	C	4,9

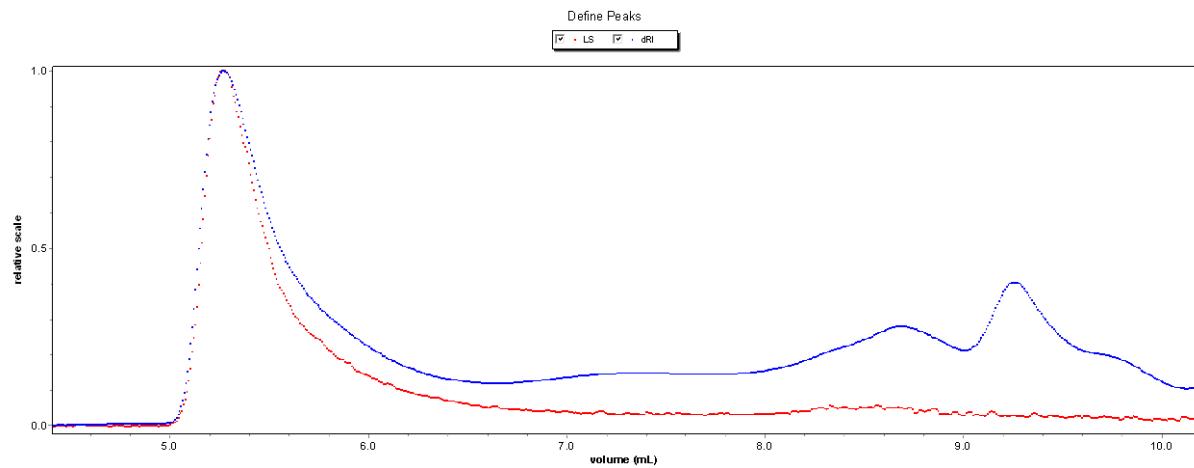
4.7.2 Povprečja in porazdelitev molskih mas, določene s SEC-MALS

kromatografijo

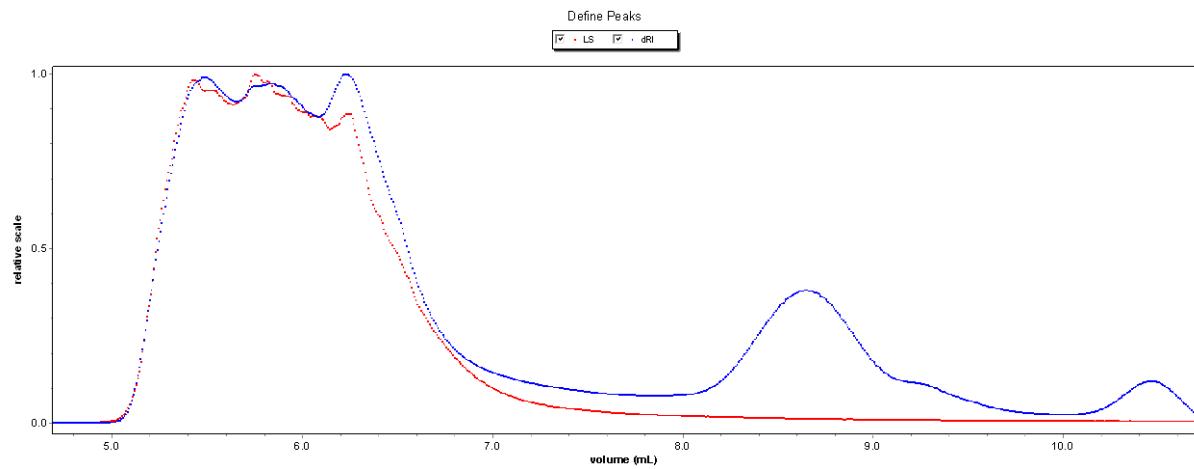
Producijo pululana smo testirali na sledečih sevih: EXF-2479, EXF-2481, EXF-2491, EXF-3398, EXF-3401, EXF-3405, EXF-3382, EXF-3399, EXF-3374, EXF-3375. Pululan smo izolirali po dveh različnih postopkih, opisanih v poglavju 3.2.2.2). Osušene vzorce zunajceličnih polisaharidov smo dostavili na Kemijski inštitut v Ljubljani, kjer so opravili SEC-MALS analize prejetih polisaharidov. Pridobili smo sledeče SEC-MALS kromatograme (slika 45 do 49) pululana, ki ga izločajo različne varietete *A. pullulans*. Posamično so prikazani le kromatogrami vzorcev, ki so bili dobro topni.



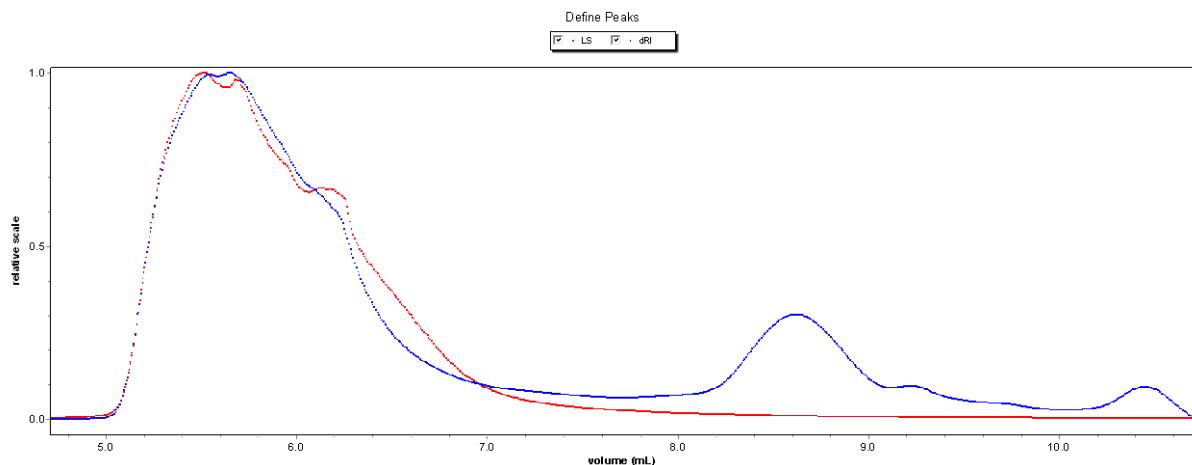
Slika 45: SEC-MALS kromatogram vzorca polisaharida, ki ga izloča sev EXF-3398



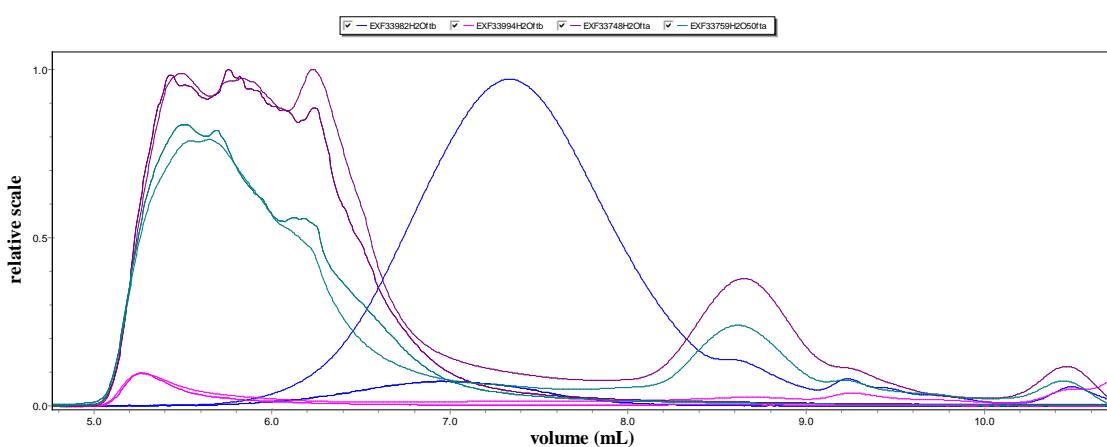
Slika 46: SEC-MALS kromatogram vzorca polisaharida, ki ga izloča sev EXF-3399



Slika 47: SEC-MALS kromatogram vzorca polisaharida, ki ga izloča sev EXF-3374



Slika 48: SEC-MALS kromatogram vzorca polisaharida, ki ga izloča sev EXF-3375



Slika 49: Primerjava SEC-MALS kromatogramov vzorcev: *A. pullulans* var. *namibiae* (EXF-3398) - modri krivulji; *A. pullulans* var. *melanogenum* (EXF-3399) - rožnati krivulji; *A. pullulans* var. *pullulans* (EXF-3374) - vijolični krivulji in EXF-3375 - zeleni krivulji

Legenda: neprekinjena črta = RI odziv
prekinjena črta = LS odziv

Povprečja in porazdelitve molskih mas, določene z velikostno izključitveno kromatografijo, sklopljeno z detektorjem na sisanje svetlobe pri več kotih (SEC-MALS), so absolutne vrednosti.

Preglednica 16: Številčna in utežna povprečja molskih mas (M_n in M_w) in disperznost ($D_M = M_w/M_n$) analiziranih polisaharidov, določena s SEC-MALS kromatografsko tehniko

Zap. št.	Sev	$M_w \times 10^6$	$M_n \times 10^6$	$D_M = M_w/M_n$
<i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>				
1	EXF-3401	1,11	0,27	4,1
5	EXF-3405	0,99	0,37	2,7
4	EXF-3399	2,81	1,91	1,5
<i>A. pullulans</i> var. <i>subglaciale</i>				
3	EXF-2491	1,13	0,23	4,8
6	EXF-2481	0,58	0,20	2,9
7	EXF-2479	0,29	0,054	5,4
<i>A. pullulans</i> var. <i>namibiae</i>				
2	EXF-3398	0,15	0,093	1,6
<i>A. pullulans</i> var. <i>pullulans</i>				
8	EXF-3374	3,08	0,64	4,8
9	EXF-3375	3,24	0,74	4,4

Legenda: M_w = utežno povprečje molskih mas

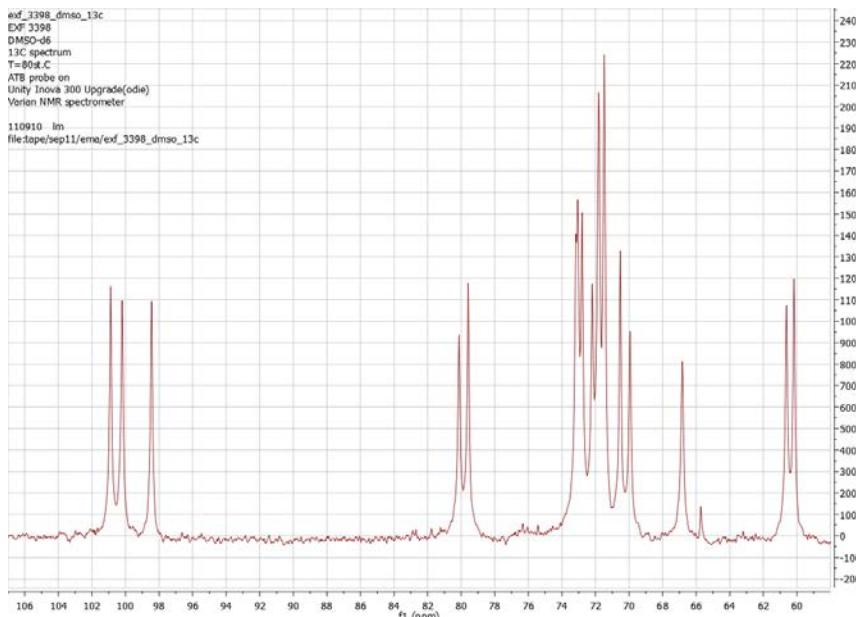
M_n = številčno povprečje molskih mas

$D_M = M_w/M_n$ = disperznost

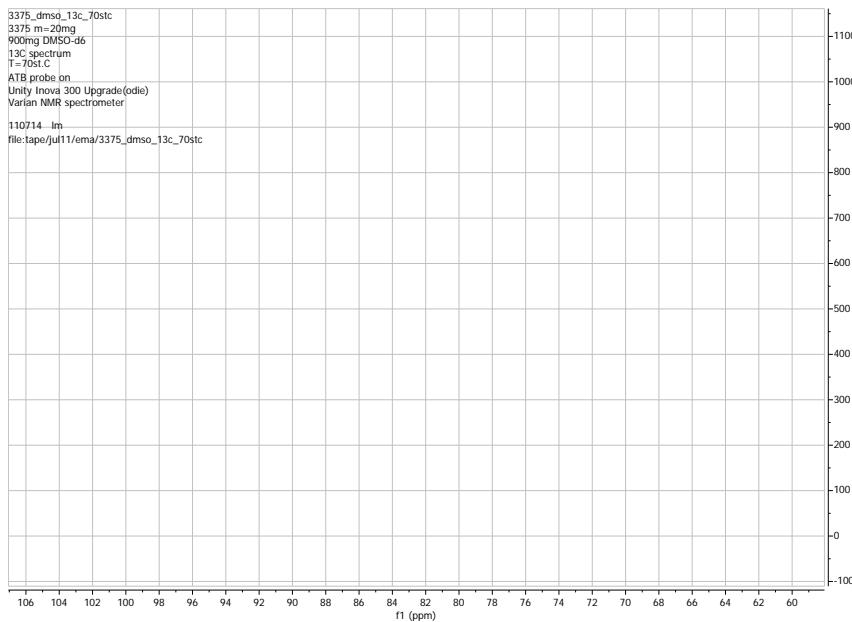
Opombe: vzorci 2, 8, 9 (4) so dobro topni; vzorci 1, 3, 5-7 so le delno topni.

4.7.3 Rezultati ^{13}C NMR spektroskopije

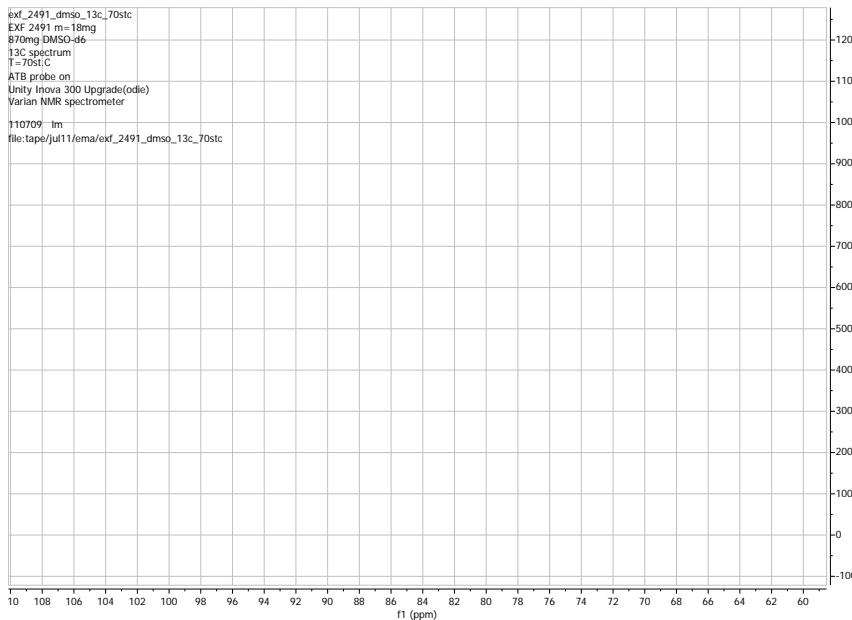
Poleg SEC-MALS kromatografije so na Kemijskem inštitutu Ljubljana opravili še ^{13}C NMR spektroskopijo, s katero sklepamo na kemijsko sestavo proučevanega polimera. Nekatere vzorce smo analizirali dvakrat, saj so bili ekstrahirani po dveh različnih postopkih (glej poglavje 3.2.2.2). Na abscisni osi je kemijski premik (ppm), na ordinatni pa intenziteta signala (brez enot).



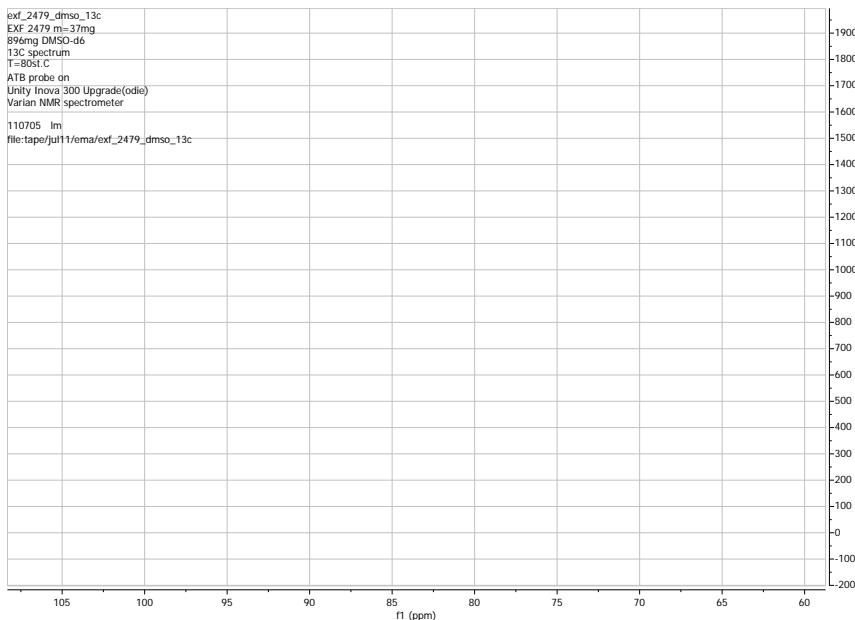
Slika 50: ^{13}C NMR spekter vzorca polisaharida, ki ga izloča sev *A. pullulans* var. *namibiae* EXF-3398 (pullulan), ekstrahiran po postopku poskusa 2, po 6 dneh fermentacije



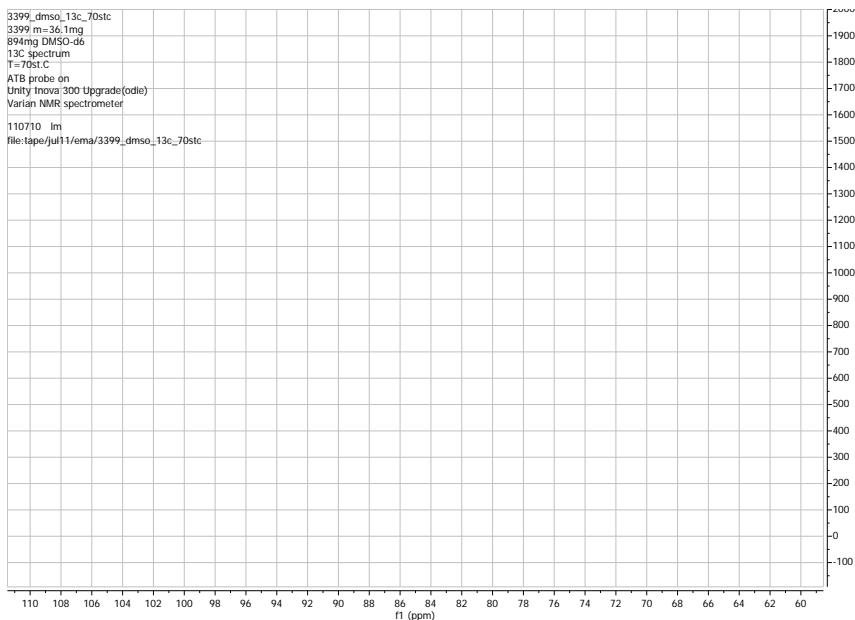
Slika 51: ^{13}C NMR spekter vzorca polisaharida, ki ga izloča sev *A. pullulans* var. *pullulans* EXF-3375 (pululan), ekstrahiran po postopku poskusa 1, po 3 dneh fermentacije



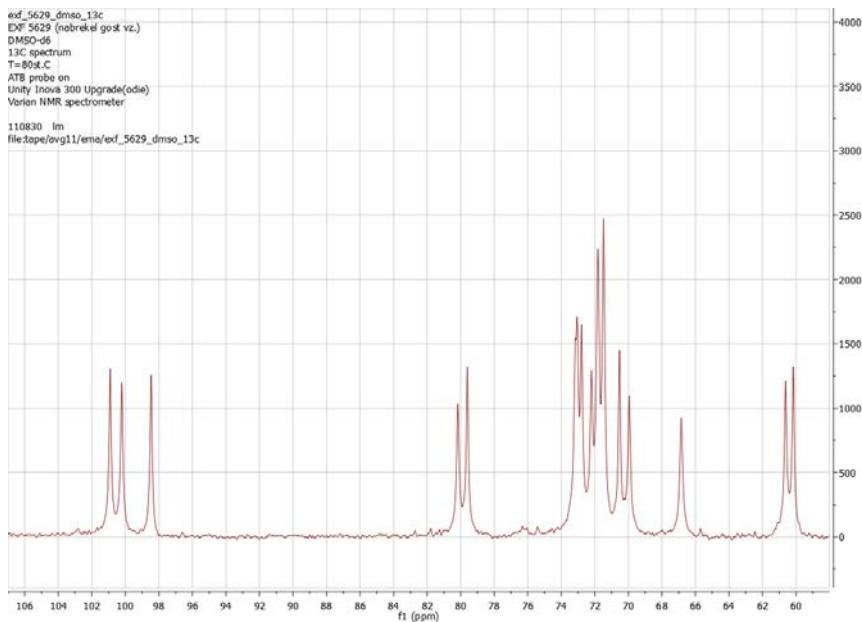
Slika 52: ^{13}C NMR spekter vzorca polisaharida seva *A. pullulans* var. *subglaciale* EXF-2491 (pululan s primesmi), ekstrahiran po postopku poskusa 1, po 3 dneh fermentacije



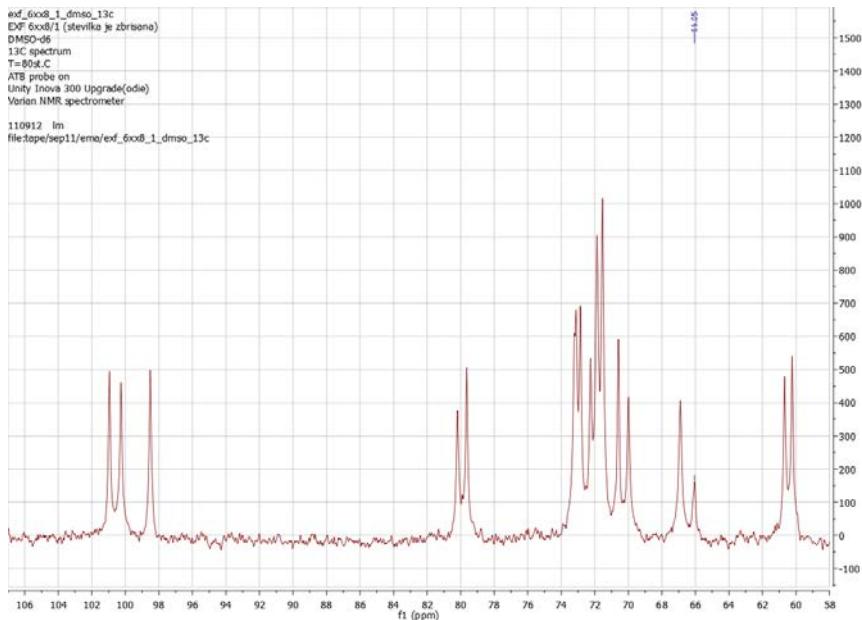
Slika 53: ^{13}C NMR spekter vzorca polisaharida seva *A. pullulans* var. *subglaciale* EXF-2479 (pululan s primesmi), ekstrahiran po postopku poskusa 1, po 3 dneh fermentacije



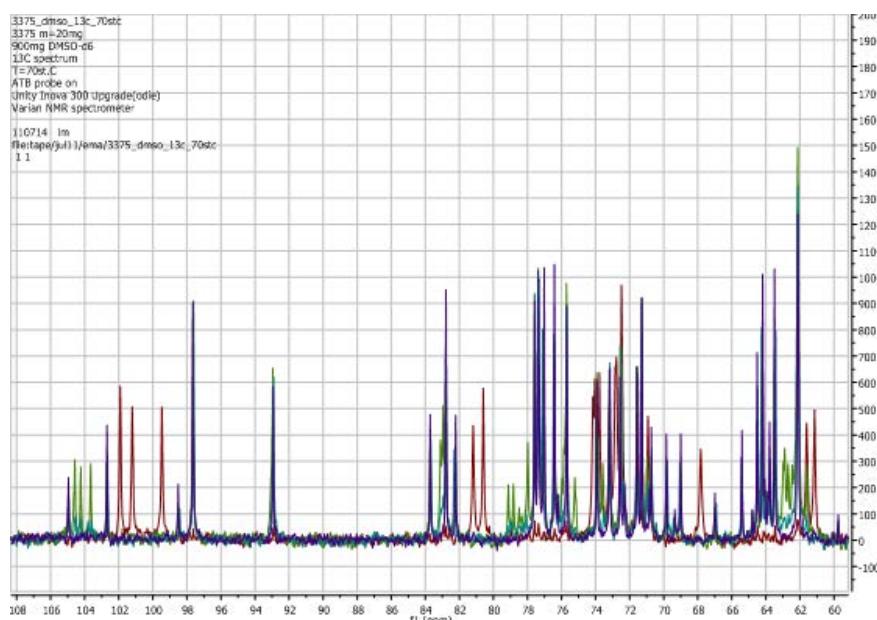
Slika 54: ^{13}C NMR spekter vzorca polisaharida seva *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* EXF-3399 (pululan s primesmi), ekstrahiran po postopku poskusa 1, po 3 dneh fermentacije



Slika 55: ^{13}C NMR spekter vzorca polisaharida seva *Aureobasidium pullulans*, nova varieteta (podobna var. *subglaciale*) EXF-5629 (pululan), ekstrahiran po postopku poskusa 2, po 6 dneh fermentacije



Slika 56: ^{13}C NMR spekter vzorca polisaharida seva *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans* EXF-6298 (pululan), ekstrahiran po postopku poskusa 2, po 6 dneh fermentacije



Slika 57: Primerjava ^{13}C NMR spektrov analiziranih različic zunajceličnega polisaharida iz 3 različnih varietet *Aureobasidium pullulans*

Legenda: rdeča krivulja: *A. pullulans* var. *pullulans*
 modra krivulja: *A. pullulans* var. *melanogenum*
 zelena krivulja: *A. pullulans* var. *subglaciale*

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Gliva *Aureobasidium pullulans* je kozmopolit, ki biva v zelo raznolikih habitatih. Najpogosteje je opisana kot epifit na površinah listov rastlin v zmernem klimatskem pasu, najdemo pa jo tudi v ekstremno hladnih okoljih in v tropih. Njena zmožnost prilagajanja na zelo spremenljive razmere v okolini kaže na fenotipsko in genotipsko raznolikost znotraj vrste. Ta vrsta je pomembna v biotehnološkem smislu, saj izloča številne encime in zunajcelične polisaharide, predvsem pululan, ki ima veliko možnosti uporabe v prehrambeni, kozmetični in farmacevtski industriji. Na njegovo vsesplošno uporabnost kaže dejstvo, da so do sedaj le v zvezi s pululanom registrirali več kot 300 patentov (Gaur in sod., 2010).

Po letih zmede v poimenovanju in razvrščanju je bila vrsta taksonomsko ponovno definirana v letu 2008 (Zalar in sod., 2008). Pri klasifikaciji so uporabili tako fenotipske, kot tudi genotipske metode; mikromorfološki pregled in analizo nukleotidnih zaporedij predelov ribosomskih genov ITS in LSU ter nukleotidnih zaporedij določenih regij gospodinjskih genov, ki kodirajo beta tubulin, elongacijski faktor 1-alfa ter elongazo. Znotraj vrste *A. pullulans* so ločili med štirimi varietetami: var. *melanogenum*, var. *namibiae*, var. *pullulans*, var. *subglaciale*, ter napovedali morebiten obstoj dodatnih varietet in vrst. Nedavno so znotraj rodu *Aureobasidium* na novo opisali tri dodatne vrste: *A. proteae*, *A. leucospermi* (Crous in sod., 2011), ki ju omenjajo kot potencialna rastlinska patogena, in *A. thailandense* (Peterson in sod., 2013).

Skupino sevov, izoliranih iz zelo različnih okolij in geografskih lokacij, hranjeno v zbirki mikrobnih kultur EX, smo želeli genotipsko in fenotipsko okarakterizirati ter pri tem tudi ovrednotiti ustreznost uporabljenih metod za klasifikacijo sevov v vrsti *A. pullulans*, ki glede na naše analize tvorijo eno, verjetno še neopisano skupino.

ITS rDNA regija je priznana kot DNA črtna koda za identifikacijo gliv (Schoch in sod., 2012). Več raziskovalcev jo je v primeru rodu *Aureobasidium* uporabilo za ločevanje na nivoju vrste (de Hoog in sod., 1999; Prasongsuk in sod., 2005; Manitchotpisit in sod., 2009; Crous in sod., 2011), za razlikovanje na nižjem nivoju od vrste pa je boljša analiza

bolj variabilnega lokusa DNA. Analiza ITS rDNA iz geografsko in substratno raznolikih, na novo izoliranih sevov ter zaporedij povzetih iz splošno dostopnih baz podatkov in literature (NCBI) kaže, da poleg do sedaj opisanih (Zalar in sod., 2008) obstajata še vsaj dve novi varieteti in dve vrsti znotraj rodu *Aureobasidium*, v katere smo razvrstili testirane seve. Preizkusiti smo želeli tudi druge lokuse DNA, kot to predлага literatura (Manitchotpisit in sod., 2009), vendar pomnoževanje z reakcijo PCR reakcijo v primeru uporabljenih začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje regij, ki kodirajo β -tubulin, translacijski elongacijski faktor 1- α in podenoto 2 RNA polimeraze II ni uspelo, domnevno zaradi polisaharidov, ki se v postopku izolacije DNA ne odstranijo in motijo reakcijo PCR (Koonjul in sod., 1999). Uspešnost pomnoževanja je bila v našem primeru nizka (4 pomnožki od 32). Najuspešnejše smo pomnožili predele ribosomske DNA.

Na osnovi ITS zaporedja smo pripravili fenetsko drevo in to klasifikacijo primerjali z določenimi fenotipskimi lastnostmi, kot so asimilacija različnih virov ogljika in dušika, temperaturna toleranca in melanizacija. S temperaturnimi in melanizacijskimi testi smo želeli preizkusiti že opisane seve in dognanja iz literature potrditi ter ugotoviti, ali sta lahko ti dve fiziološki značilnosti znak za ločevanje med varietetami. Želeli smo tudi fiziološko potrditi skupine, nakazane v fenetskem drevesu. Rezultati slednjih testov se povečini skladajo s klasifikacijo, ki je razvidna iz fenetskega drevesa.

Sevi varietete *pullulans* so izkazali največjo homogenost glede testiranih podatkov. Večina sevov raste šibko tudi pri 5 °C, temperaturni optimum je 25 °C, maksimum pa 30 °C, kar se sklada z dosedanjimi objavami (Zalar in sod., 2008). Posebna sta seva EXF-5628, izoliran s tesnilne gume pomivalnega stroja, in EXF-4255, izoliran iz ledeniškega okolja, ki rasteta le med 15 in 25 °C. Za ledeniški izolat bi pričakovali, da raste tudi pri nižjih temperaturah. Sev EXF-3793 je zrasel le pri 15 °C. Varieteta *pullulans* načeloma ne melanizira, ali pa melanizacijo opazimo le pri najvišjih temperaturah. Pri sevu EXF-6176 pa je pigmentacija vidna že pri 15 °C, kar sicer pogosteje opazimo pri varieteti *melanogenum*. Sev je bil izoliran iz ledeniškega okolja, kar bi lahko razložilo sintezo melanina pri nižji temperaturi, a hkrati ta sev doseže tudi temperaturni rekord varietete *pullulans*. Varieteto *pullulans* najdemo tako v polarinem kot v zmernem pasu, medtem ko je v tropskem in subtropskem ni zaslediti.

Varieteta *subglaciale* dobro uspeva pri nižjih temperaturah, kolonije so rožnate, nepigmentirane, do sedaj so predstavnike izolirali iz hladnih ali polarnih okolij (Zalar in sod., 2008; Kachalkin, 2010). V tej varieteti najdemo seva, ki ne izločata melanina in imata zelo skladen temperaturni profil. Rasteta namreč od 5 do 25 °C, ko dosežeta optimalno rast, hkrati pa je to najvišja temperatura pri kateri še uspevata. V to skupino smo, poleg nekaj sevov iz ledenika, razvrstili tudi sev, izoliran z lista šmarnice v zmernem pasu. Predstavnike varietete *subglaciale* so do sedaj zasledili le v hladnejših (Kachalkin, 2010) in polarnih območjih.

Varieteta *melanogenum* slabo raste pri nižjih temperaturah. Razen nekaj izjem, so vsi obravnavani izolati nabrani v zmernih ali toplih okoljih. V literaturi zasledimo, da je minimalna temperatura za rast predstavnikov varietete *melanogenum* 10 °C, v našem primeru pri določenih sevih tudi 5 °C, vendar je rast izjemno šibka. Pri večini sevov smo za temperaturni minimum določili 15 °C. Večina jih raste na najvišje testirani temperaturi, 37 °C. Pri temperaturah nad 35 °C smo opazili močno melanizacijo, ki ne nastopi zvezno z višanjem temperature, pač pa hipno pri povišanju temperature na kritično vrednost, večinoma 25 °C. Da bi to potrdili, bi morali testirati še melanizacijo na vmesnih temperaturah (od 15 °C do 25 °C). Da na melanizacijo in obliko kolonij vpliva temperatura, potrjuje tudi literatura (Slepecky in Starmer, 2009). Pri nekaterih sevih opazimo upad premera rasti ob pojavu intenzivne melanizacije (EXF-924, EXF-926 in drugi). EXF-7296 dobro melanizira le pri 35 °C, sicer pa je svetle barve. Nasprotno pa EXF-5590 melanizira najbolj sorazmerno z naraščanjem temperature. *A. pullulans* var. *melanogenum* (EXF-3378). Seva EXF-3399 in EXF-3401 sta po temperaturnem profilu podobna varieteti *pullulans*, saj bolje rasteta pri najvišjih temperaturah. Edinstven je tudi oranžni pigment, ki ga izločajo EXF-7308, EXF-7295 in EXF-7300. Zanimiva sta še seva EXF-3382 in EXF-3383, saj je pri njima melanizacijski trend obraten. Večinoma opažamo, da se melanizacija jača z naraščanjem temperature, slednja pa melanizirata pri nižji temperaturi, pri 30 do 37 °C pa količina izločenega pigmenta upade. Iz literature razberemo, da se akumulacija pigmenta najpogosteje pojavlja v stacionarni fazni rasti in je v primeru rodu *Aureobasidium* verjetno povezana s sintezo hlamidospor (Leathers in sod., 1988; Silman in sod., 1990). To smo opazili tudi pri naših poskusih. Rezultati rasti in melanizacije so v prilogi (glej prilogi A in B). Varieteta *melanogenum* je precej heterogena

v smislu rasti pri različnih temperaturah in melanizacije. Na osnovi naših rezultatov lahko trdimo, da *A. pullulans* var. *melanogenum* uspeva predvsem v tropskem in subtropskem pasu. Le sevi te varietete so bili kot patogeni človeka. Okužbo mu omogoča dejstvo, da raste pri 37 °C in je melaniziran. Obe lastnosti sta znana virulenčna faktorja (de Hoog, 2000).

V varieteto *namibiae* sodi le en sev, EXF-3398. Z našimi poskusi določen temperaturni optimum rasti se sklada z literaturo (Zalar in sod., 2008). Očiten je preskok melanizacije nad 25 °C. Melanin pomaga pri zaščiti pred UV sevanjem in izsuštvijo (Gunde-Cimerman in sod., 1997). Takšna strategija je smiselna, saj je bil omenjeni sev izoliran iz puščave, torej sušnega, vročega okolja z veliko sončnimi urami. Z naraščanjem sevanja žarkov UV spektra se viša tudi temperatura. Da bi nedvomno dokazali povezavo med količino izločenega pigmenta melanina in UV sevanjem, bi morali pripraviti preizkus stopnje melanizacije pri različni jakosti in spektrih UV sevanja.

Dve varieteti, ki smo jih kot še neopisani opredelili na osnovi ITS zaporedja, sta sorodstveno blizu že opisani varieteti *subglaciale*, melanina večinoma ne izločata, imata pa tudi podoben temperaturni profil rasti. Od varietete *subglaciale* se fenotipsko razlikujeta po izločanju pululana, ki ga že opisana varieteta ne izloča, v podobni varieteti razvrščeni sevi pa. Dve novi varieteti smo zaenkrat opredelili le genotipsko, treba bi bilo izvesti še poglobljeno fiziološko, mikromorfološko in makromorfološko testiranje, preučiti izločane polisaharide, pigmente in rast pri različnih temperaturah.

Pri varieteti, ki smo jo za lažje sporazumevanje poimenovali »podobna *subglaciale* 1« opazimo enak temperaturni razpon in nepigmentiranost kot pri varieteti *subglaciale*. Podobne lastnosti najdemo pri novo opisani vrsti *A. leucospermi* sp. nov. (Peterson in sod., 2013), kamor sodi sev EXF-7304, izoliran iz mravljišča, ki pri 25 °C izloča melanin.

Sevi, ki jih uvrščamo v t. i. »nove varietete« in niso v skupinah »podobna *subglaciale* 1« ali v vrsti *A. leucospermi* večinoma le rahlo ali pa sploh ne melanizirajo. Optimalna temperatura za rast je 25 ali 30 °C. Varieteta »nova« raste tudi pri 35 in 37 °C, medtem ko varieteti »nova 1« in »nova 2« ne. Pri slednji, tako kot pri uveljavljeni varieteti

melanogenum in vrsti *A. thailandense*, zasledimo oranžni pigment – ta je bil v primeru slednje tudi znak za ločevanje. V te varietete glede na filogenetsko analizo sodijo sevi, izolirani iz mravljišč mravelj *Atta laevigata* v Braziliji (Pagnocca in sod., 2009). Zdi se, da lahko delno tudi na podlagi lokacije izolacije oz. tamkajšnjih okoljskih razmer sklepamo za katero varieteto gre. Tako lahko v hladnih in ekstremno hladnih ledeniških okoljih pričakujemo izolacijo *A. pullulans* var. *subglaciale*, v zmernem pasu, pralnih strojih (Novak, 2011) pa *A. pullulans* var. *pullulans*. Slednja varieteta je najbolj pestra, kar se tiče pojavnosti, saj smo v našem poskusu testirali tako izolate iz polarnih okolij, kot tudi z rastlin in sadja iz zmernega pasu. Tudi varieteto *melanogenum* smemo pričakovati pri vzorčenju mravljišč (Pagnocca in sod., 2008) in pomivalnih ter pralnih strojev (Novak, 2011), predvsem pa je pogosta v tropskem pasu (Punnapayak in sod., 2003).

Pri nekaterih sevih, ki melanina sicer ne izločajo, opazimo pigmentacijo le v sektorjih. V literaturi zasledimo nasprotujoče si ugotovitve, kakšne oblike naj bi se nahajale v teh sektorjih: bodisi pigmentirane hlamidospore ali pa debelostenske hife (Slepecky in Starmer, 2009; Catley, 1973). Mikroskopski pregled temnih delov kolonij kaže, da gre za debelostenske temnopigmentirane hife, kar v opisu varietet tudi zasledimo (Zalar in sod., 2008). Tako literatura (Lotrakul in sod., 2009; Lončarič in sod., 2009) kot naše opažanje potrjujejo, da se barva kolonij skozi čas spreminja. Predvsem melanizacija pri sevih, ki niso temne barve od samega začetka, nastopi po 7 ali 14 dneh rasti. Da lahko spreminjanje videza kolonij pripisemo melanizaciji so sicer ugotovili že v devetdesetih letih prejšnjega stoletja (Leathers in sod., 1988; Silman in sod., 1990).

Nedavno so opisali novo vrsto *A. thailandense* na podlagi analize zaporedij ITS regije rDNA in opredelili tudi temperaturni in melanizacijski profil te vrste, ki so ga prav tako uporabili kot kriterij za razlikovanje in opis nove vrste. Tudi mi opažamo, da je analiza temperature rasti in pigmentacije dobra potrditev filogenetske analize.

Filogenetska analiza ITS regije rDNA v povezavi z morfološkim in fiziološkim testiranjem je že bila uporabljeni kot identifikacijski postopek za seve znotraj *A. pullulans* in je za to primerna (Pagnocca in sod., 2008). Od 475 pozicij ITS rDNA regije je variabilnih 62 oz. 13,05 % (neprikazani podatki). Zaključimo lahko, da na podlagi temperature rasti,

spreminjanja morfologije in pigmentacije pri različnih temperaturah lahko strnimo preizkušane seve v zaključene skupine, ki smo jih opredelili s fenetskim testiranjem. Poleg tega lahko delno na varieteto sklepamo tudi glede na geografski oziroma okoljski izvor seva.

Poleg temperaturnega in melanizacijskega profila smo v okviru fizioloških značilnosti varietet *A. pullulans* preizkušali tudi rast že opisanih in na novo izoliranih sevov na minimalnih gojiščih z različnimi viri ogljika oz. dušika, kar je sicer klasična metoda za razlikovanje kvasovk (Boekhout in sod., 2011). Pri preizkusu asimilacije različnih virov ogljika in dušika smo večinoma prišli do rezultatov, ki smo jih na podlagi preučene literature (Lotrakul in sod., 2009; Singh in Saini, 2008) pričakovali. Avtorji o večjih posebnostih ne poročajo. Vsi preizkušeni sevi asimilirajo naslednje vire ogljika: D-glikozamin, D-riboza, D-ksiloza, L-arabinoza, ramnoza, rafinoza, celobioza, maltoza, manitol, galaktitol, mioinozitol, fruktoza, laktoza. Asimilacija slednje je bil eden izmed kriterijev za opredelitev varietete *aubasidani* (Yurlova in sod., 1997), ki pa je bila kasneje sinonimizirana z varieteto *pullulans* na osnovi molekularno genetskih podatkov (Zalar in sod., 2008). Laktozo po 5 dneh dobro asimilirajo vsi sevi, razen EXF-2481 in EXF-2491, ki pripadata varieteti *subglaciale* in rasteta šibko. Kasneje, po 10 oz. 15 dneh, razlik ni več opaziti. *Aureobasidium pullulans* kot vir ogljika ni zmožen uporabiti etanola in metanola (Lotrakul in sod., 2009). V nasprotju s to trditvijo pa smo opazili precejšnjo rast na ploščah, kjer je bil edini vir ogljika etanol. Na osnovi rezultatov, odčitanih po petih dneh, smo zasledili, da sevi slabše rastejo na glukozi kot na drugih virih ogljika. To lahko povežemo z dejstvom, da naj bi bili monosaharidi slabši vir energije kot disaharidi (Lingappa in sod., 1963). Kot že nekaj avtorjev (Bemann, 1981), smo tudi mi opazili spremenjanje makromorfologije in pigmentacije kolonij v odvisnosti od dodanega vira ogljika (Leathers in sod., 1988; Silman in sod., 1990)

Pri analizi asimilacije različnih virov dušika posebnosti nismo opazili – vsi testirani sevi so kot vir dušika uporabili testirane snovi. Rast na takšnih gojiščih je bila običajno hitra in bujna. V literaturi zasledimo, da se le-te spremenjajo glede na gojišče, na katerem rastejo. Ker gre v člankih za variacijo vira hraničnih snovi, lahko trdimo, da so naše ugotovitve v

skladu z literaturo (Slepecky in Starmer, 2009; Takesako in sod., 1991; Lingappa in sod., 1963).

Tezo, da so organizmi vrste *Aureobasidium pullulans* halotolerantni (Kogej in sod., 2005) smo potrdili. Večina sevov je rasla na gojiščih s 5 % NaCl, vendar se je rast upočasnila.

Pri prvem preizkusu rasti pri različnih temperaturah in melanizacije smo naleteli na težavo. »Melanizacijo« smo opazili pri sevih, ki glede na literaturo pod nobenim pogojem melanina ne izločajo. Ob podrobнем pregledu smo ugotovili, da pravzaprav na plošči ne raste melanizirana varietetata *Aureobasidium pullulans* ampak *Exophiala dermatitidis*. Kasneje se je to potrdilo še z analizo DNA zaporedij. Zasledili smo nekaj plošč, kjer je bil rob kolonije rožnat, center pa temnorjav. Pregled z lupo kaže, da gre v tem primeru za koeksistenco omenjenih dveh vrst. Ker so bili sevi nacepljeni neposredno iz zbirke, smo ugotovili, da je do kontaminacije prišlo že ob izolaciji iz primarnega materiala. Ker sedaj bolje poznamo temperaturni spekter obeh gliv in se zavedamo njunega sobivanja v okolju, lahko predlagamo, da se primarna izolacija do čiste kulture za *A. pullulans* izvede pri 15 °C in ne pri sobni temperaturi, kasneje pa se čistost preveri tudi z inkubacijo pri 37 °C. Pri 15 °C namreč *Aureobasidium* uspeva bolje od sevov *Exophiala*. Za rod *Exophiala* je značilno, da raste tudi pri temperaturah nad 40 °C (Novak, 2011), kjer *Aureobasidium pullulans* ne raste. Sami smo glivo očistili in teste ponovili. Po tem smo prišli do pričakovanih in smiselnih rezultatov.

Taksonomski marker naj bi bilo tudi izločanje in struktura zunajceličnih polisaharidov (Yurlova in sod., 1997; Peterson in sod., 2013). Nedavno so opisali novo vrsto *Aureobasidium thailandense* sp. nov, na podlagi neznanega izločanega polisaharida, ki ni pululan. Različnost sevov, izoliranih z listov rastlin in lesenih površin na Tajske, so potrdili tudi z analizo ITS regij rDNA. Od vrste *A. pullulans* se razlikuje tudi glede na temperaturni in melanizacijski profil. Z gojenjem na PPM gojišču smo po 3 ali 6 dneh izvedli ekstrakcijo po različnih postopkih in kasneje analizirali pridobljene zunajcelične polisaharide, s čimer smo hoteli preveriti, ali se le-ti lahko uporabljajo kot taksonomski marker.

Pri proizvodnji pululana smo vedno uporabili enako gojišče (PPM), spremnjali pa smo čas inkubacije (3 ali 6 dni), frekvenco stresanja (150 oz. 180 rpm) in temperaturo (25 °C oz. 28 °C). Zato bi pri analizi polisaharidov morali upoštevati tudi primernost temperature inkubacije za posamezno varieteto (npr. *subglaciale* bolje uspeva pri nižjih temperaturah in bi lahko pridobili več zunajceličnega polisaharida) in čas inkubacije; v katerem delu rastne krivulje smo fermentacijo prekinili in, ali je do tega trenutka gliva že pričela z izločanjem pululana. Polisaharide v fermentacijski brozgi smo ekstrahirali po dveh postopkih. Opažamo, da v primeru, ko smo pred obarjanjem z etanolom in sušenjem, deaktivirali pululanaze, NMR spektri poleg pululana kažejo še prisotnost nekaterih drugih polimerov. V drugem primeru smo pred obarjanjem z etanolom supernatant filtrirali preko 0,45 µm membranskih filtrov in na ta način pridobili čistejši pululan, vendar se je pri dveh sevih (EXF-2479 in EXF-3399), katerih polisaharide smo testirali po obeh metodah ekstrakcije izkazalo, da v primeru, ko pululanaz nismo deaktivirali, pululana z NMR spektroskopijo nismo dokazali. Možno, da je prišlo do encimske razgradnje. Menimo, da bi bil postopek, kjer bi izvedli tako filtracijo skozi 0,45 µm filtre, kot tudi deaktivacijo pululanaz ter etanolno precipitacijo najučinkovitejši – s tem bi se izognili neželeni razgradnji pululana in ostankom primesi, bodisi iz gojišča ali ostalih polimerov, ki jih gliva izloča.

Z metodama NMR spektroskopija in SEC-MALS smo izločane snovi poskušali opredeliti glede na kemijsko sestavo (ali je izločena snov polisaharid) in molsko maso ter na ta način v nadaljnjo analizo vključili le visokomolekularne polisaharide. Z določitvijo povprečij molskih mas in disperznosti molske mase (D_M) smo potrdili prisotnost makromolekul in določili, kateri vzorci so slabše topni oziroma netopni v topilih ($DMSO-d_6$ ali D_2O). Ker smo kot detektor pri velikostni izključitveni kromatografiji uporabili detektor na sipanje svetlobe, standardov za umerjanje SEC kolone nismo potrebovali, dobljene vrednosti molskih mas pa so absolutne.

Dobro topne vzorce polisaharida smo analizirali še z ^{13}C NMR spektroskopijo. S pridobljenimi spektrogrami smo sklepali na kemijsko sestavo polimerov. Opažali smo, da sta si polisaharida, ki ju izločata varieteti *melanogenum* in *pullulans* podobna, pri čemer ima slednji nekaj primesi. Pri varieteti *subglaciale* smo pululan določili pri obeh testiranih sevih (EXF-2479 in EXF-2491), bil pa je določen kemijsko drugačen, pululanu podoben

polisaharid. Analizirana polisaharida sta kljub temu podobna in ju lahko ločimo tudi od polisaharidov podobnih, novih varietet za katere sklepamo, da tvorijo pululan. Pululan zasledimo še pri sevih EXF-3398 (var. *namibiae*), EXF-3375 (var. *pullulans*), EXF-5629 (nova varieteta, podobna var. *subglaciale*) in EXF-6298 (var. *pullulans*). Glede na to, da pri vseh varietetah zasledimo vsaj nekaj sevov, ki proizvajajo pululan, determinacija polisaharidov ni ustrezен taksonomski marker. Prav tako med izločenimi polisaharidi nismo opazili posebnih strukturnih razlik. Signale, ki so na spektrih prisotni poleg signalov pululana, lahko pripisemo bodisi primesem, ki so del gojišča, izomerizaciji preučevanih saharidov, ali pa nedefiniranim sladkorjem, ki so lahko vezani na pululan ali samostojni. Da bi se tem motečim signalom izognili in dobili še zanesljivejše rezultate, bi morali v NMR spektroskopijo vključiti še negativno kontrolo, to je osušeno gojišče. Spektre bi morali primerjati tudi s spektrom aubasidana, ki je bil pred reklassifikacijo vrste v letu 2008 (Zalar in sod., 2008), uporabljen kot taksonomski marker in s tem osnova za opis nove varietete (Yurlova in de Hoog, 1997). Kljub temu lahko rečemo, da je pululan značilen znak za rod *Aureobasidium*.

Nedavni opisi novih vrst *A. leucospermi* sp. nov. in *A. thailandense* sp. nov. kažejo, da bi morali pri opisu varietet verjetno razmišljati tudi v smeri novih vrst. Vrsta *A. proteae* je bila opisana znotraj varietete *A. pullulans* var. *pullulans*, zaporedja njenih ITS in LSU regij se 100 % skladajo z regijami te varietete, zato je sinonimizacija upravičena. Opažamo, da je bila nova vrsta *A. thailandense* opisana (Peterson in sod., 2013) na podlagi podobnih kriterijev, kot smo jih uporabili mi in naši predhodniki (Zalar in sod., 2008) za opredelitev novih varietet. Glede na opis novih vrst znotraj varietet in kriterijev za nedavne opise novih vrst v rodu *Aureobasidium* lahko v prihodnosti pričakujemo dvig obstoječih varietet na nivo vrste.

5.2 SKLEPI

- Identifikacija in karakterizacija sevov na osnovi zaporedij ITS rDNA je ustrezena, saj omogoča ločevanje med varietetami in vrstami znotraj rodu *Aureobasidium*.
- Asimilacijski profil dušika in ogljika preizkušenih sevov ne kaže posebnih razlik med varietetami, rezultati so variabilni tudi znotraj varietet. Na osnovi tovrstnih podatkov zato ni mogoče ločiti varietet vrste *A. pullulans* med seboj.
- Do sedaj opisane in še neopisane varietete *A. pullulans* se med seboj razlikujejo po temperaturnem profilu in melanizaciji; le-ta sta torej lahko znak za ločevanje.
- Na podlagi analize polisaharidov med varietetami ne moremo zagotovo razlikovati. Vendar pa so kljub temu vidne razlike med polisaharidom varietete *A. pullulans* var. *subglaciale* in ostalimi tremi že opisanimi varietetami, saj omenjena varieteta izloča drug polisaharid. Sevi, ki pripadajo še neopisanim varietetam, izločajo pululan.
- Zaradi večkrat opaženega sopojava *A. pullulans* in *Exophiala dermatitidis* na določenih substratih za ciljano izolacijo *Aureobasidium* predlagamo temperaturo izolacije 15 °C, naknadno pa je potrebno preveriti čistost kulture pri 37 °C, kjer eventualno lahko zraste gliva *Exophiala dermatitidis*.
- Na podlagi proučevanih genotipskih (ITS rDNA) in fenotipskih (temperaturni profil, melanizacija) predvidevamo, da med našimi novo izoliranimi sevi znotraj vrste *A. pullulans* obstajajo še pet neopisanih varietet, v rodu *Aureobasidium* pa vsaj dve novi vrsti, ki vsebujejo predvsem seve, izolirane iz mravljišč.
- V primeru vrste *A. pullulans* je potrebno podrobno proučiti obstoj vrst namesto varietet.

6 POVZETEK

6.1 POVZETEK

Gliva *A. pullulans* je kozmopolit, ki naseljuje najrazličnejše in številne habitate v vseh podnebnih pasovih. Našli so jo tako v skrajno hladnih polarnih območjih kot tudi v tropih. Zmožnost prilagajanja tako različnim habitatom lahko nakazuje na pestro fenotipsko in genotipsko raznolikost. Njen širok spekter prehranjevanja in mehanizmi odpore na stres ji omogočajo primarno kolonizacijo najrazličnejših površin. Gliva je tudi biotehnološko pomembna zaradi encimov in zunajceličnih polisaharidov.

Zmeda v poimenovanju se pojavlja že vse od odkritja te glive leta 1866. Mikromorfologija in makromorfologija sta zelo pestri, prav tako se organizem prilagaja različnim razmeram v okolini.

Da bi potrdili dosedanjo klasifikacijo in odkrili morebitne nove varietete, ki jih napoveduje literatura, smo skupino sevov, izoliranih iz najrazličnejših habitatov genotipsko, makro- in mikromorfološko ter fiziološko karakterizirali ter preučili strukturo izločanih zunajceličnih polisaharidov.

Pri tem smo preizkusili tudi ustreznost posamezne metode za klasifikacijo in ugotovili, da sta za ločevanje varietet primerni primerjava ITS zaporedij rDNA in analiza temperturnega ter melanizacijskega profila sevov. Asimilacija različnih virov ogljika in dušika ter strukutra izločanega pululana nista ustrezna znaka za ločevanje med varietetami znotraj vrste *A. pullulans*.

Na podlagi opravljenih poskusov sklepamo, da znotraj vrste *A. pullulans* obstaja še pet novih varietet, v rodu *Aureobasidium* pa dve še neopisani vrsti. Možno, da bodo varietete dvignili na nivo vrst.

Pri delu smo se srečali tudi s težavo pri preverjanju čistosti kultur *Aureobasidium*, zato predlagamo nov način izolacije *Aureobasidium* iz primarnih materialov ter preizkušanje čistosti kultur pri več temperaturah, saj se na ta način lahko izognemo koeksistenci vrst rodov *Aureobasidium* in *Exophiala*, ki očitno sobivata v določenih habitatih.

6.2 SUMMARY

The fungus *A. pullulans* is a cosmopolitan that colonizes numerous different habitats of all climatic zones. It has been discovered in extremely cold polar and warm tropical areas. Its ability to adjust to climatic conditions that differ so much can indicate a varied phenotypic and genotypic diversity. Its wide assimilation spectrum and stress resistance mechanisms support its primary colonization of different surfaces. This fungus is also biotechnologically important because of its enzymes and extracellular polysaccharides.

There has been a confusion in the nomenclature since the fungus was discovered in 1866. Micromorphology and macromorphology of this fungus are variable, and the organism is able to adjust to many different conditions.

To confirm the current classification and possibly discover new varieties that are predicted by different literary sources, we studied a group of strains, isolated from various habitats, characterized them genotypically, physiologically micro and macromorphologically, and studied the structure of secreted extracellular polysaccharides.

By doing so we tested the adequacy of various classification methods and discovered that the comparison of ITS sequence of rDNA and the analyses of temperature and melanization profile of the strains are appropriate for separating varieties. The assimilation of different carbon and nitrogen sources and the structure of the secreted pullulan are not adequate taxonomic markers to distinguish between the varieties of *A. pullulans* species.

After the testing we can assume that there are at least five more varieties in the *A. pullulans* species, and two so far undescribed species in the *Aureobasidium* genus. Probably the varieties shall be described as new species in the future.

Analyzing this fungus we also encountered a problem with purity examination of *Aureobasidium* cultures, and would like to suggest a new isolation technique for *Aureobasidium* from primary materials and testing for cultural purity at different temperatures, as this would help avoid the coexistence of *Aureobasidium* and *Exophiala* genera that obviously cohabit in certain conditions.

7 VIRI

- Abraham G., Vas S. I., Oreopoulos D. G. 1990. Treatment of fungal peritonitis in patients undergoing CAPD. American Journal of Medicine, 88: 699-700
- Alekhova T. A., Aleksandrova A. A., Novozhilova T. Y., Lysak L. V., Zagustina N. A., Bezborodov A. M. 2005. Monitoring of microbial degraders in manned space stations. Applied Biochemistry and Microbiology, 41: 382-389
- Altschul F. S., Gish W., Miller W., Myers W. E., Lipman J. D. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. Journal of Molecular Biology, 215: 403-410
- Andrews J. H., Harris R. F., Spear R. N., Gee W. L., Nordheim E. V. 1994. Morphogenesis and adhesion of *Aureobasidium pullulans*. Canadian Journal of Microbiology, 40: 6-17
- Andrews J. H., Harris R. F. 1997. Dormancy, germination, growth, sporulation and dispersal. V: The Mycota IV: environmental and microbial relationships. Wicklow D. T., Söderström B. E. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 3-13
- Andrews J. H., Spear R. N., Nordheim E. V. 2002. Population biology of *Aureobasidium pullulans* on apple leaf surfaces. Canadian Journal of Microbiology, 48: 500-513
- Auer D. P. F., Seviour R. J. 1990. Influence of varying nitrogen sources on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. Applied Microbiology and Biotechnology, 32: 637–644
- Badr-Eldin S. M., El-Tayeb O. M., El-Masry E. G., Mohamad O. A., El-Rahman O. A. A. 1994. Polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans*: factors affecting polysaccharide formation. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 10: 423–426
- Beal J. D., Niven S. J., Brooks P. H., Gill B. P. 2005. Variation in short chain fatty acids and ethanol concentration resulting from the natural fermentation of wheat and barley for inclusion in liquid diets for pigs. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85: 433-440
- Bemmernann W. 1981. Dimorphism of fungi-review of the literature. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektions Krankheiten und Hygiene, 136: 369-416
- Bender H., Lehmann J., Wallenfels K. 1959. Pullulan, ein extracelluläres Glucan von *Pullularia pullulans*. Biochimica et Biophysica Acta, 36: 309-316

- Bender H., Wallenfels K. 1961. Investigations on pullulan II. Specific degradation by means of a bacterial enzyme. *Biochemische Zeitschrift*, 334: 79–95
- Berk S., Ebert H., Teitel L. 1957. Utilization of plasticizers and related organic compounds by fungi. *Industrial and Engineering Chemistry*, 49: 1115-1124
- Bloomberg A., Adler L. 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 33: 145-212
- Boekhout T., Kurtzman C. P. 1996. Principles and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera. V: Nonconventional yeasts in biotechnology: A handbook. Wolf K. (ed.). Berlin, Springer-Verlag: 1-99
- Boekhout T., Fonseca A., Sampaio J. P., Bandoni R. J., Fell J. W., Kwon-Chung K. J. 2011. Discussion of teleomorphic and anamorphic basidiomycetous yeasts. V: The yeasts: A taxonomic study. Kurtzman C., Fell J. W., Boekhout T. (eds.). Elsevier science, Oxford: 1339-1372
- Brooks P. H., Beal J. D., Niven S. J. 2001. Liquid feeding on pigs: potential for reducing environmental impact and for improving productivity and food safety. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia*, 13: 49-63
- Bulat S. A., Mironenko N. V. 1992. Polymorphism of the yeast like fungus *Aureobasidium pullulans* (de Bary) detected with universally primed-polymerase reaction: species divergence. *Genetics*, 28: 19–30
- Bulmer M. A., Catley B. J., Kelly P. J. 1987. The effect of ammonium ions and pH on the elaboration of the fungi extracellular polysaccharide pullulan, by *Aureobasidium pullulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 25: 362–365
- Buzzini P., Martini A. 2002. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 1020-2025
- Caporale N. E., Calegari L., Perez D., Gezuele E. 1996. Peritoneal catheter colonization and peritonitis with *Aureobasidium pullulans*. *Peritoneal Dialysis International*, 16: 97-98
- Catley B. J., Whelan W. J. 1971. Observations on the structure of pullulan. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 143: 138–142

- Catley B. J. 1971. Role of pH and nitrogen limitation in the elaboration of the extracellular polysaccharide pullulan by *Pullularia pullulans*. *Applied Microbiology*, 22: 650–654
- Chabasse D. 2002. Les phaeohyphomycetes agents de phaeohyphomycosis: des champignons emergents. *Journal de Mycologie Médicale*, 12: 65-85
- Chander J., Sharma A. 1994. Prevalence of fungal corneal ulcers in northern India. *Infection*, 22: 207-209
- Clark E. C., Silver S. M., Hollick G. E., Rinaldi M. G. 1995. Continuous ambulatory peritoneal dialysis complicated by *Aureobasidium pullulans* peritonitis. *American Journal of Nephrology*, 15: 353-355
- Crang R. E., Pechak D. G. 1978. *Aureobasidium pullulans*: fine structure and development. *Journal of Coatings Technology*, 50: 36-42
- Crous P. W., Gams W., Stalpers J. A., Robert V. and Stegehuis G. 2004. MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. *Studies in Mycology*, 50: 19-22
- Crous P. W., Summerell B. A, Swart L., Denman S., Taylor J. E., Bezuidenhout C. M., Palm M., Marincowitz S., Groenewald J. Z. 2011. Fungal pathogens of Proteaceae. *Persoonia*, 27: 20-45
- de Curtis F., Caputo L., Castoria R., Lima G., Stea G., de Cicco V. 2004. Use of fluorescent amplified fragment length polymorphism (fAFLP) to identify specific molecular markers for the biocontrol agent *Aureobasidium pullulans* strain LS30. *Postharvest Biology and Technology*, 34: 179-186
- de Hoog G. S., Yurlova N. A. 1994. Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium* and *Hormonema*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 65, 1: 41-54
- de Hoog G. S., Zalar P., Urzí C., de Leo F., Yurlova N. A., Sterflinger K. 1999. Relationships of dothideaceous black yeasts and meristematic fungi based on 5.8S and ITS2 rDNA sequence comparison. *Studies in Mycology*, 43: 31-37
- de Hoog G. S., Guarro J., Gené J., Figueras M. J. 2000. Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 520-522
- Deshpande M. S., Rale V. B., Lynch J. M. 1992. *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: a status report. *Enzyme and Microbial Technology*, 14: 514-527

- Endo M., Takesako K., Kato I., Yamaguchi H. 1997. Fungicidal action of aureobasidin A, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic against *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 3: 672-676
- Finkelman M. A. J., Vardanis A. 1982. Simplified microassay for pullulan synthesis. *Applied Environmental Microbiology*, 43: 483-485
- Fletcher H., Williams N. P., Nicholson A., Rainford L., Phillip H., East-Innis A. 2000. Systemic phaeohyphomycosis in pregnancy and the puerperium. *West Indian Medical Journal*, 49: 79– 82
- Gaidhani H. K., McNeil B., Ni X.W. 2003. Production of pullulan using an oscillatory baffled bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78, 2-3: 260-264
- Gaur R., Singh R., Gupta M., Gaur M. K. 2010. *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. *African Journal of Biotechnology*, 9, 47: 7989-7997
- Girardi L. S., Malowitz R., Tortora G. T., Spitzer E. D. 1993. *Aureobasidium pullulans* septicemia. *Clinical Infectious Diseases*, 16: 338-339
- Göksungur Y., Uçan A., Güvenç U. 2003. Production of pullulan from beet molasses and sythetic medium by *Aureobasidium pullulans*. *Turkish Journal of Biology*, 28: 23-30
- Griffin D. W., Kellogg C. A., Garrison V. H., Lisle J. T., Border T. C., Shinn E. A. 2003. African dust in Caribbean atmosphere. *Aerobiologia*, 19: 143-157
- Gunde-Cimerman N., Zalar P., Cimerman A. 1997. Diversity of fungal community in high salt marine environments. V: Proceedings of the International Symposium of Environmental Biotechnology (ISEB) 21. – 23. april, Oostende. Verachtert H., Verstraete W. (eds.). Antwerpen, Technologisch Instituut: 189-191
- Gunde-Cimerman N., Zalar P., de Hoog S., Plemenitaš A. 2000. Hypersaline waters in salterns: natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology*: 32, 3: 235-240
- Gupta V., Chawla R., Sen S. 2001. *Aureobasidium pullulans* scleritis following keratoplasty: a case report. *Ophthalmic Surgery and Lasers*, 32: 481– 482

- Hauf J., Baur A., Chalwatzis N., Zimmermann F. K., Joger U., Lazarev P. A. 1995. Selective amplification of a mammoth mitochondrial cytochrome b fragment using an elephant-specific primer. *Current Genetics*, 27: 486-487
- Hawkes M., Rennie R., Sand C., Vaudry W. 2005. *Aureobasidium pullulans* infection: Fungemia in an infant and a review of human cases. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 51: 209-213
- Hermánidez-Nijhof E. J. 1977 *Aureobasidium* and allied genera. *Studies in Mycology*, 15: 141-177
- Hernández-Saavedra N. Y., Ochoa J. L., Vazquez-Dulhadt R. 1995. Osmotic adjustment in marine yeast. *Journal of Plankton Research*, 17: 59-69
- Hii S. L., Tan J. S., Ling T. C., Ariff A. B. 2012. Pullulanase: role in starch hydrolysis and potential industrial applications. *Enzyme Research*, 2012: ID 1362, doi: 10.1155/2012/921362: 14 str.
- Houde A., Kademi A., Leblanc D. 2004. Lipases and their industrial applications: an overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118: 155-170
- Hutova M., Kralinsky K., Horn J., Marinova I., Iligova K., Fric J., Spanik S., Filka J., Uher J., Kurak J., Krcmery V. Jr. 1998. Prospective study of nosocomial fungal meningitis in children—Report of 10 cases. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 30: 485– 487
- Ibañez P., Chacón J., Fidalgo A., Martin J., Paraiso V., Muñoz-Bellido J. L. 1997. Peritonitis by *Aureobasidium pullulans* in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 12: 1544– 1545
- Ikai K., Shiomi K., Takesako K., Mizutani S., Yamamoto J., Ogawa Y., Ueno M. 1991. Structures of aureobasidins B to R. *Journal of Antibiotics*, 44, 11: 1187-1198
- Imshenetskii A. A., Kondrateva T. F., Smutko A. N. 1981a. Influence of carbon and nitrogen sources on pullulan biosynthesis by polyploid strains of *Pullularia pullulans*. *Microbiology (Engl. Transl. Mikrobiologiya)*, 50: 73–76
- Imshenetskii A. A., Kondrateva T. F., Smutko A. N. 1981b. Influence of the acidity of the medium, conditions of aeration, and temperature on pullulan biosynthesis by polyploid strains of *Pullularia (Aureobasidium) pullulans*. *Microbiology (Engl. Transl. Mikrobiologiya)*, 50: 330–333

- Inami K., Kurome T., Takesako K., Kato I., Shiba T. 1996. Site-specific ring opening of depsipeptide aureobasidin A in hydrogen fluoride. *Tetrahedron Letters*, 37, 12: 2043-2044
- Israilides C., Scanlon B., Smith A., Harding S. E., Jumel K. 1994. Characterization of pullulan produced from agro-industrial wastes. *Carbohydrate Polymers*, 25: 203-209
- Jeannmougin F., Thompson J. D., Gouy M., Higgins D. G., Gibson T. J. 1998. Multiple sequence alignment with ClustalX. *Trends in Biochemical Sciences*, 23: 403-405
- Jones F. R., Christensen G. R. 1974. *Pullularia* corneal ulcer. *Archives of Ophthalmology*, 92: 529– 530
- Kachalkin A. V. 2010. New data on the distribution of certain psychrophilic yeasts in Moscow Oblast. *Microbiology*, 79, 6: 840-844
- Kachhwaha D. K., Bhattacharjee P., Singhal R. S. 2003. Studies on downstream processing of pullulan. *Carbohydrate Polymers*, 52: 25-28
- Kaczmarski E. B., Liu Yin J. A., Tooth J. A., Love E. M., Delamore I. W. 1986. Systemic infection with *Aureobasidium pullulans* in a leukemic patient. *Journal of Infection*, 13: 289– 291
- Klausmeier R., E., Jones W. A. 1961. Microbial degradation of plasticizers. *Development in Industrial Microbiology*, 42: 741-743
- Kocková-Kratochvílová A., Černáková M., Slavíková E. 1980. Morphological changes during the life cycle of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud. *Folia Microbiologica*, 25: 56-67
- Kogej T. 2002. Vpliv slanosti na melanizacijo iz solin izoliranih črnih kvasovk. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 124 str.
- Kogej T., Ramos J., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2005. The halophilic fungus *Hortaea werneckii* and the halotolerant fungus *Aureobasidium pullulans* maintain low intracellular cation concentrations in hypersaline environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 11: 6600-6605
- Koonjul P. K., Brandt W. F., Farrant J. M., Lindsey G. G. 1999. Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. *Nucleic Acid Research*, 27, 3: 95-97

- Koppang H. S., Olsen I., Stuge U., Sandven P. 1991. *Aureobasidium* infection of the jaw. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 20: 191– 195
- Krcmér V. Jr., Spanik S., Danisovicová A., Jesenská Z., Blahová M. 1994. *Aureobasidium mansoni* meningitis in a leukemia patient successfully treated with amphotericin B. *Chemotherapy*, 40:70– 71
- Kurome T., Inami K., Inoue T., Ikai K., Takesako K., Kato I., Shiba T. 1996. Total synthesis of an antifungal cyclic depsipeptide aureobasidin A. *Tetrahedron*, 52: 4327-4346
- Lacroix C., LeDuy A., Noel G., Choplin L. 1985. Effect of pH on the batch fermentation of pullulan from sucrose medium. *Biotechnology and Bioengineering*, 27: 202–207
- La Duc M. T., Nicholoson W., Kern R., Venkateswaran K. 2003. Microbial characterization of the Mars Odyssey spacecraft and its encapsulation facility. *Environmental Microbiology*, 5: 977-985
- Leathers T. D. 1993. Substrate regulation and specificity of amylases from *Aureobasidium* strain NNRL Y-12, 974. *FEMS Microbiology Letters*, 110: 217-221
- Leathers T. D. 2002. Pullulan. V: Biopolymers. Vol 6. Polysaccharides II: Polysaccharides from eukaryotes. Vandamme E. J., De Baets S., Steinblichel A. (eds.). Weinheim, Wiley-VCH: 1-35
- Leathers T. D. 2003. Biotechnological production and applications of pullulan. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62: 468-473
- Leathers T. D. 2005. Pullulan. V: Biopolymers online. Steinblichel A. (ed.). Weinheim, Wiley-VCH: doi: 10.1002/3527600035.bpol6001: 14 str.
- Lee W. J., Yeomans W. G., Allen A. L., Deng F., Gross R. A., Kaplan D. L. 1999. Biosynthesis of novel exopolymers by *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 12: 5265-5271
- Lingappa Y., Sussman A. S., Bernstein I. A. 1963. Effect of light and media upon growth and melanin formation in *Aureobasidium pullulans* (de BY.) ARN. (=*Pullularia pullulans*). *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 20: 109-128
- Liu Y.L., Whelen S., Hall B.D. 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1799-1808

- Lončarič I., Oberlerchner J. T., Heissenberger B., Moosbeckhofer R. 2009. Phenotypic and genotypic diversity among strains of *Aureobasidium pullulans* in comparison with related species. *Antonie van Leeuwenhoek*, 95: 165-178
- Lotrakul P., Deenarn P., Prasongsuk S., Punnapayak H. 2009. Isolation of *Aureobasidium pullulans* from bathroom surfaces and their antifungal activity against some Aspergilli. *African Journal of Microbiology Research*, 3, 5: 253-257
- Lugauskas A., Šveistytė L., Ulevičius V. 2003. Concentration and species diversity of airborne fungi near busy streets in Lithuanian urban areas. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 10: 233-239
- Madi N. S., Harvey L. M., Mehlert A., McNeil B. 1997. Synthesis of two distinct expolysaccharide fractions by cultures of the polymorphic fungus *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate Polymers*, 32: 307-314
- Manitchotpisit P., Leathers T. D., Peterson S. W., Kurtzman C. P., Li X., Eveleigh D. E., Lotrakul P., Prasongsuk S., Dunlap C. A., Vermillion K. E., Punnapayak H. 2009. Multilocus phylogenetic analyses, pullulan production and xylanase activity of tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Mycological Research*, 113: 1107-1120
- McGrath M. J., Andrews J. H. 2007. Role of microbial immigration in the colonization of apple leaves by *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 1277-1286
- McNeil B., Kristiansen B. 1990. Temperature effects on polysaccharide formation by *Aureobasidium pullulans* in stirred tanks. *Enzyme and Microbial Technology*, 12: 521-526
- Mills J., Eggins H. O. 1974. The biodeterioration of certain plasticizers by thermophilic fungi. *International Biodeterioration Bulletin*, 10: 39-44
- Mount D. 2004. Bioinformatics: Sequence and genome analysis 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 692 str.
- Nagappan R., Collins J. F., Lee W. T. 1992. Fungal peritonitis in continuous peritoneal dialysis-the Auckland experience. *American Journal of Kidney Diseases*, 20: 492-496
- Nelken N., Ignatius J., Skinner M., Christensen N. 1987. Changing clinical spectrum of splenic abscess. *American Journal of Surgery*, 154: 27-34

- Nemecek J. C., Wüthrich M., Klein B. S. 2006. Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science*, 312: 583-588
- Nosanchuk J. D., Casadevall A. 2003. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 5 4: 203-223
- Novak M. 2011. Pomivalni in pralni stroji: umetno okolje za bogatitev glivnih oportunističnih patogenov človeka. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 46 str.
- O'Donnell K., Cigelnik E. 1997. Two divergent intra-genomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7: 103-116
- Olstorpe M., Schnürer J., Passoth V. 2010. Microbial changes during storage of moist crimped cereal barley grain under swedish farm conditions. *Animal Feed Science and Technology*, 156: 37-46
- Ono K., Yasuda N., Ueda S. 1977. Effect of pH on pullulan elaboration by *Aureobasidium pullulans* S-1. *Agricultural and Biological Chemistry*, 41: 2113–2118
- Oren A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63: 334-348
- Pagnocca F. C., Rodrigues A., Nagamotor N. S., Bacci M. Jr. 2008. Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94, 4: 517-526
- Pechag D. G., Crang R. E. 1977. An analysis of *Aureobasidium pullulans* developmental stages by means of scanning electron mycroscopy. *Mycologia*, 69: 783-792
- Peterson S. W., Manitchotpisit P., Leathers T. D. 2013. *Aureobasidium thailandense* sp. nov. isolated from leaves and wooden surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 790-795
- Pitt J. I., Hocking A. D. 1999. *Fungi and food spoilage*. 2nd ed. Sydney, Academic Press: 76-77
- Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2005. Cellular responses in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii* to high environmental salinity V: Adaptation to life at high salt concentrations in *Archaea*, *Bacteria*, and *Eukarya*. Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitaš A. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 453-470

- Plemenitaš A., Vaupotič T., Lenassi M., Kogej T., Gunde-Cimerman N. 2008. Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity: a molecular perspective at a glance. *Studies in Mycology*, 61: 67-75
- Pollock T. J., Thorne L., Armentrout R. W. 1992. Isolation of new *Aureobasidium* strains that produce high-molecular-weight pullulan with reduced pigmentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 877-883
- Pouliot J. M., Walton I., Nolen-Parkhouse M., Abu-Lail L. I., Camesano T. 2005. Adhesion of *Aureobasidium pullulans* is controlled by uronic acid based polymers and pullulan. *Biomacromolecules*, 6: 1122-1131
- Prasongsuk S., Berhow M. A., Dunlap C. A., Weisleder D., Leathers T. D., Eveleigh D. E., Punnapayak H. 2007. Pullulan production by tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34, 1: 55-61
- Pritchard R. C., Muir D. B. 1987. Black fungi: a survey of dematiaceous hyphomycetes from clinical specimens identified over a five year period in a reference laboratory. *Pathology*, 19: 281–284
- Punnapayak H., Sudhadham M., Prasongsuk S., Pichayangkura S. 2003. Characterization of *Aureobasidium pullulans* isolated from airborne spores in Thailand. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30: 89-94
- Rauch M. E., Graef H. W., Rozenzhak S. M., Jones S. E., Bleckmann C. A., Kruger R. L., Naik R. R., Stone M. O. 2006. Characterization of microbial contamination in United States Air Force aviation fuel tanks. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, 33: 29-36
- Ramos J. 2005. Introducing *Debaryomyces hansenii*, a salt loving yeast V: Adaptation to life at high salt concentrations in *Archaea*, *Bacteria*, and *Eukarya*. Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitaš A. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 441-452
- Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S., Deshpande V. V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: 62, 3: 597-635
- Ravindra A. P. 2000. Value-added food: single cell protein. *Biotechnology Advances*, 18: 459-479

- Rayner A. D. M., Coates D. 1987. Regulation of mycelial organization and responses V: Evolutionary biology of the Fungi. Rayner A. D. M., Brasier S. M., Moore D. (eds.). Cambridge, University Press: 115-136
- Redondo-Bellón P., Idoate M., Rubio M., Ignacio Herrero J. 1997. Chromoblastomycosis produced by *Aureobasidium pullulans* in an immunosuppressed patient. Archives of Dermatology, 133: 663– 664
- Reeslev M., Jensen B. 1995. Influence of Zn²⁺ and Fe³⁺ on polysaccharide production and mycelium/yeast dimorphism of *Aureobasidium pullulans* in batch cultivations. Applied Microbiology and Biotechnology, 42: 910-915
- Rehner S. 2001. Primers for Elongation Factor 1-α (EF1-α). Arlington, ZDA, AFTOL, National Science Foundation.
<http://www.aftol.org/pdfs/EF1primer.pdf> (junij, 2013)
- Rekha M. R., Sharma C. P. 2007. Pullulan as a promising biomaterial for biomedical applications: A perspective. Trends in Biomaterials and Artificial Organs, 20, 2: 116-121
- Rho D., Mulchandsani A., Luong J. H. T., LeDuy A. 1988. Oxygen requirement in pullulan fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, 28: 361– 366
- Rinaldi M. 1996. Phaeohyphomycosis. Dermatologic Clinics, 14, 1: 147-153
- Salkin I. F., Martinez J. A., Kemna M. E. 1986. Opportunistic infection of the spleen caused by *Aureobasidium pullulans*. Journal of Clinical Microbiology, 23: 828-831
- Saag M. S., Dismukes W. E. 1988. Azole antifungal agents: Emphasis on new triazoles. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 32: 1-8
- Samson R. A., Hoekstra E. S., Frisvad J. C. 2004. Introduction to food- and airborne Fungi. 7th ed. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 56-56, 98-99
- Scheibelreiter-Gurtner C., Piñar G., Lubitz V., Röllleke S. 2001. Analysis of fungal communities on historical church window glass by denaturing gradient gel electrophoresis and phylogenetic 18S rDNA sequence analysis. Journal of Microbiological Methods, 47: 345-354
- Schena L., Ippolito A., Zahavi T., Cohen L., Nigro F., Droby S. 1999. Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. Postharvest Biology and Technology, 17: 189–199

- Schoch C. L., Shoemaker R. A., Seifert K. A., Hambleton S., Spatafora J. W., Crous P. W. 2006. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. *Mycologia*, 98: 1041-1052
- Schoch C. L., Seifert K. A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J. L., Levesque C. A., Chen W., Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 16: 6241-6246
- Seviour R. J., Kristiansen B. 1983. Effect of ammonium ion concentration on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 17: 178–181
- Seviour R. J., Kristiansen B., Harvey L. 1984. Morphology of *Aureobasidium pullulans* during polysaccharide elaboration. *Transactions of the British Mycological Society*, 82: 350–356
- Shelton B. G., Kirkland K. H., Flanders W. D., Morris G. K. 2002. Profiles of airborne fungi in buildings and outdoor environments in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1743-1753
- Shigel K. I. 2004. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. *Carbohydrate Research*, 339: 447–460
- Shirakawa M. A., Gaylarde C. C., Gaylarde P. M., John V., Gambale W. 2002. Fungal colonization and succession on newly painted buildings and the effect of biocide. *FEMS Microbiology Ecology*, 39: 165-173
- Simon L., Bouchet B., Caye-Vaugien C., Gallant D. J. 1995. Pullulan elaboration and differentiation of the resting forms of *Aureobasidium pullulans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 40: 35–45
- Singh R. S., Saini G. K. 2008. Pullulan hyper-producing color variant strain of *Aureobasidium pullulans* FB-1 newly isolated from phylloplane of *Ficus* sp. *Bioresource Technology*, 99: 3896-3899
- Singh R. S., Saini G. K., Kennedy J. F. 2008. Pullulan: microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 73: 515-531

- Slepecky R. A., Starmer W. T. 2009. Phenotypic plasticity in fungi: a review with observations on *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia*, 101, 6: 823-832
- Slodki M. E., Cadmus M. C. 1978. Production of microbial polysaccharides. *Advances in Applied Microbiology*, 23: 19–54
- Takesako K., Ikai K., Haruna F., Endo M., Shimanaka K., Sono E., Nakamura T., Kato I. 1991. Aureobasidins, new antifungal antibiotics taxonomy, fermentation, isolation and properties. *Journal of Antibiotics*, 44, 9: 919-924
- Tamura, K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 10: 2731-2739
- Tan H. P., Wahlstrom H. E., Zamora J. U., Hassanein T. 1997. *Aureobasidium* pneumonia in a post liver transplant recipient: a case report. *Hepatogastroenterology*, 44: 1215–1218
- Taylor P. E., Esch R., Flagan R. C., House J., Tran L., Glovsky M. M. 2005. Identification and possible disease mechanism of an under-recognized fungus *Aureobasidium pullulans*. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 139: 45-52
- Turkovskii I.I., Yurlova N. A., 2002. The photochemical and surface-active properties of melanins isolated from some black fungi. *Microbiology*, 71, 4: 410-416
- Ueda S., Kono H. 1965. Polysaccharide produced by the genus *Pullularia*. *Applied Microbiology*, 13, 6: 882-885
- Urzí C., de Leo F., Lo Passo C., Criseo G. 1999. Intra-specific diversity of *Aureobasidium pullulans* strains isolated from rocks and other habitats assessed by physiological methods and my random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Journal of Microbiological Methods*, 36: 95-105
- Urzí C., de Leo F., Salamone P., Criseo G. 2001. Airborne fungal spores colonising marbles exposed in the terrace of Messina Museum, Sicily. *Aerobiologia*, 17: 11-17
- Webb J. S., Nixon M., Eastwood I. M., Greenhalgh M., Robson G. D., Handley P. S. 2003. Fungal colonization and biodeterioration of plasticized polyvinyl chloride. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3194-3200

- Wecker A., Onken U. 1991. Influence of dissolved oxygen concentration and shear rate on the production of pullulan by *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology Letters*, 13: 155–160
- West-Eberhard M. J. 1989. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 20: 249-278
- Wiley B. J., Ball D. H., Arcidiacono S. M., Mayer J. M., Kaplan D. L. 1993. Control of molecular weight distribution of the biopolymer pullulan produced by *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 1: 3-9
- Wilson S. J., Everts R. J., Kirkland K. B., Sexton D. J. 2000. A pseudo-outbreak of *Aureobasidium* species lower respiratory tract infections caused by reuse of single-use stopcocks during bronchoscopy. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 21: 470-472
- Winters H., Guidetti G. 1976. Extracellular enzymes from fungal isolates involved in the biodeterioration of paint films. *Development in Industrial Microbiology*, 17: 173-176
- Woody S. T., Ives A. R., Nordheim E. V., Andrews J. H. 2007. Dispersal, density dependence and population dynamics of a fungal microbe on leaf surfaces. *Ecology*, 88: 1513-1524
- Yurlova N. A., Gun Z. B., Sinitskaja I. A., Kashkina M. A., Khmara I. F. 1993. Exoglucan formed by *Aureobasidium pullulans* (de By.) Arnaud, 1910, F-371. *Mikologia i Fitopatologija*, 27: 41–47
- Yurlova N. A., Mokrousov I. V., de Hoog G. S. 1995. Intraspecific variability and exopolysaccharide production in *Aureobasidium pullulans*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 68: 57–63
- Yurlova N. A., de Hoog G. S. 1997. A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. *Antonie van Leeuwenhoek*, 72: 141-147
- Yurlova N. A., de Hoog G. S., Gerrits van den Ende A. H. G. 1999. Taxonomy of *Aureobasidium* and allied genera. *Studies in Mycology*, 43: 63–69
- Zalar P., de Hoog G. S., Gunde-Cimerman N. 1999. Ecology of halotolerant dothideaceous black yeasts. *Studies in Mycology*, 43: 38-48

Zalar P., Gostinčar C., de Hoog G. S., Uršič V., Sudhadham M., Gunde-Cimerman N.
2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. Studies in
Mycology, 61: 21-38

Zhdanova N. N., Zakharchenko V. A., Vember V. V., Nakonechnaya L. T. 2000. Fungi
from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of
the damaged nuclear reactor. Mycological Research, 104: 1421-1426

Zhong W., Jeffries M. W., Georgopapadakou N. H. 2000. Inhibition of inositol
phosphorylceramide synthase by aureobasidin A in *Candida* and *Aspergillus* species.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44: 651-653

ZAHVALA

Do tega diplomskega dela je pripeljalo posebno zaporedje dogodkov. Na tem mestu bi se končno rada zahvalila vsem, ki ste na to imeli vpliv.

Za naravoslovje me je v otroštvu navdušil žal že pokojni dedek Janko. V meni je zbudil raziskovalno žilico, ki mi je vsa ta leta dajala zagon za nadaljevanje. V času študija mi je ob vseh padcih ob strani stala babica Marta. Hvala, babi. Finančno sta me potrpežljivo podpirala starša, Nika in Robi. Strokovno pa me je v dvomih podpirala gospa Romana.

Iskrena hvala moji potrpežljivi mentorici asist. dr. Poloni Zalar in somentorici prof. dr. Nini Gunde-Cimerman, ki sta me vodili skozi eksperimentalni del ter mi s svojim obsežnim znanjem pomagali izdelati to diplomsko delo ter recenzentki prof. dr. Ani Plemenitaš za recenzijo diplomskega dela.

Zahvala gre tudi prof. dr. Petru Milliganu z University of Maine Augusta, ki je spremljal začetke nastanka tega diplomskega dela in mi pomagal pri eksperimentalnem delu ter dr. Emi Žagar s Kemijskega inštituta analizo polisaharidov.

Zahvaljujem se osebju na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Biotehniške fakultete v Ljubljani, ki so mi prijazno pomagali pri pripravi reagentov in gojišč ter me usmerjali pri delu v laboratoriju. Mojca, hvala.

Vsem se iz srca zahvaljujem.

PRILOGE

PRILOGA A: Premer rasti in melanizacija pri različnih temperaturah inkubacije sevov *A. pullulans* po 7 dneh

EXF številka	Temperatura inkubacije (°C)					
	5	15	25	30	35	37
<i>A. pullulans</i> var. <i>pullulans</i>						
EXF - 2617	3/M0	10/M0	14/M0	11/M0	/	/
EXF - 2618	2/M0	9/M0	16/M0	8/M0	/	/
EXF - 3374	3/M0	21/M0	33/M0	3/M0	/	/
EXF - 3519	4/M0	25/M0	32/M0	5/M0	/	/
EXF - 3670	2/M0	19/M0	33/M0	8/M0	/	/
EXF - 3780	3/M0	20/M0	25/M0	4/M0	3/M0	/
EXF - 3793	KONT	15/M0	KONT	/	/	/
EXF - 3817	1/M0	19/M0	30/M0	/	/	/
EXF - 3863	3/M0	20/M1	49/?	/	/	/
EXF - 3877	/	22/M0	37/M0	11/M0	/	/
EXF - 4010	4/M0	15/M0	27/M0	3/M0	/	/
EXF - 4251	4/M0	13/M0	35/M0	7/M0	/	/
EXF - 4255	/	14/M0	28/M0	/	/	/
EXF - 4256	3/M0	16/M0	40/M0	6/M0	/	/
EXF - 5628	2/M0	10/M0	17/M0	4/M0	/	/
EXF - 5629	3/M0	9/M0	17/M0	4/M0	/	/
EXF - 5652	/	7/M0	7/M2	7/M2	4/M3	7/M3
EXF - 6176	/	18/M0	14/M0	5/M0	/	/
EXF - 6514	/	21/M0	30/M0	9/M0	/	/
EXF - 6519	/	21/M0	30/M0	9/M0	/	/
<i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenenum</i>						
EXF - 924	/	19/M0	23/M1	12/M3	/	/
EXF - 926	/	3/M0	8/M1	4/M3	4/M2	4/M2
EXF - 3382	/	7/M0	12/M1	6/M0	/	/
EXF - 4445	/	15/M0	29/M0 oranž	29/M0	/	/
EXF - 5590	3/M0	9/M1	24/M3	10/M2	/	/
EXF - 6171	/	12/M0	27/M1	17/M1	4/M1	2/M3
<i>A. pullulans</i> var. <i>subglaciale</i>						
EXF - 2479	3/M0	12/M0	17/M0	/	/	/
EXF - 2491	3/M0	19/M0	16/M0	/	/	/
<i>A. pullulans</i> var. "podobna subglaciale 1"						
EXF - 4454	/	8/M0	28/M0	12/M0	/	/
EXF - 6524	2/M0	23/M0	27/M0	2/M0	/	/

PRILOGA B: Premer rasti in melanizacija pri različnih temperaturah inkubacije sevov *A. pullulans* po 21 dneh

EXF številka	Temperatura inkubacije (°C)					
	5	15	25	30	35	37
<i>A. pullulans</i> var. <i>pullulans</i>						
EXF - 2617	9/M0	31/M0	40/M0	23/M0	/	/
EXF - 2618	7/M0	29/M1	43/M0	17/M0	/	/
EXF - 3374	15/M0	45/M0	72/M0	11/M0	/	/
EXF - 3519	16/M0	57/M0	67/M0	11/M1	/	/
EXF - 3670	/	43/M0	75/M0	/	/	/
EXF - 3780	12/M0	45/M0	69/M0	10/M1	KONT	/
EXF - 3793	KONT	35/M0	KONT	/	/	/
EXF - 3817	4/M0	62/M0	85/M0	/	/	/
EXF - 3863	13/M0	42/M0	80/M0	KONT	/	/
EXF - 3877	19/M0	41/M0	81/M0	11/M0	/	/
EXF - 4010	10/M0	31/M0 oranž	39/M0 oranž	9/M0	/	/
EXF - 4251	17/M0	39/M0	77/M0	15/M0	/	/
EXF - 4255	/	30/M0	49/M0	/	/	/
EXF - 4256	/	46/M0	82/M0	14/M1	/	/
EXF - 5628	9/M0	32/M2	60/M0	11/M1	/	/
EXF - 5629	4/M0	20/M0	56/M1	10/M0	/	/
EXF - 5652	/	23/M1	22/M1	31/M2	KONT	19/M4
EXF - 6176	/	43/M3	73/M2	47/M3	7/M5	4/M5
EXF - 6514	2/M0	15/M0	24/M2 (oliv!)	15/M2	/	/
EXF - 6519	9/M0	28/M0	40/M0	31/M3	/	/
<i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>						
EXF - 924	/	47/M3	63/M2	17/M3	/	/
EXF - 926	6/M1	21/M1	48/M1	12/M2	/	/
EXF - 3382	/	51/M4	81/M4	18/M1	/	/
EXF - 4445	2/M0	60/M0 oranž	64/M2 oranž	53/M2 oranž	/	/
EXF - 5590	/	18/M3	41/M4	32/M4	9/M5	8/M5
EXF - 6171	/	34/M1	73/M2	37/M3	7/M5	5/M5
<i>A. pullulans</i> var. <i>subglaciale</i>						
EXF - 2479	13/M0	40/M1	70/M2	4/M0	/	/
EXF - 2491	12/M0	24/M0	31/M0	/	/	/
<i>A. pullulans</i> var. "podobna suglaciale 1"						
EXF - 4454	/	16/M0	72/M0	42/M0	/	/
EXF - 6524	9/M0	55/M0	69/M0	2/M0	/	/