

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Alen PROLE

**ZDRUŽBA GLIV V ZDRAVILNEM BLATU
SEČOVELJSKIH SOLIN**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Alen PROLE

ZDRUŽBA GLIV V ZDRAVILNEM BLATU SEČOVELJSKIH SOLIN

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**FUNGAL COMMUNITY IN SALT PAN MUD OF SEČOVLJE
SALTURNS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2013

POPRAVKI:

Prole A. Združba gliv v zdravilnem blatu sečoveljskih solin.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2013

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Nina Gunde-Cimerman in za recenzenta prof. dr. Peter Raspor.

Mentorica: prof. dr. Nina Gunde-Cimerman

Recenzent: prof. dr. Peter Raspor

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:	prof. dr. Ines Mandić Mulec Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
Članica:	prof. dr. Nina Gunde-Cimerman Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član:	prof. dr. Peter Raspor Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Alen Prole

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

SD	Dn
DK	UDK 579.26:582.28:551.35(043)=163.6
KG	mikrobne združbe/glive/soline/solinsko blato/bolneologija/gojitvene metode/TTGE/ <i>Aspergillus fumigatus</i> / <i>Eurotium repens</i> / <i>Fusarium oxysporum</i>
AV	PROLE, Alen
SA	GUNDE-CIMERMAN, Nina (mentorica)/RASPOR, Peter (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2013
IN	ZDRUŽBA GLIV V ZDRAVILNEM BLATU SEČOVELJSKIH SOLIN
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	X, 71 str., 21 sl., 12 pregl., 82 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	Solinsko blato ali fango se že dolgo uporablja v terapevtske namene. Njegove fizikalno-kemijske značilnosti so dobro poznane. V diplomski nalogi smo se osredotočili na določitev glivne združe blata s pomočjo gojitvenih metod in z molekularno metodo TTGE (temperaturna gradientna gelska elektroforeza). Sledili smo spreminjanju sestave združbe glede na slanost in temperaturo ter prisotnost potencialno patogenih vrst gliv. Vzorčili smo trikrat: med junijem 2008 in januarjem 2009. Izolirali smo celokupno DNK za analiziranje s TTGE ter iz petih vzorčnih mest izolirali glive do čistih kultur na gojišču s sladnim ekstraktom (MEA) in z dodano soljo. Le-te smo razvrstili v različne morfološke skupine in določili predstavnike, iz katerih smo nato izolirali DNK za določanje do nivoja vrst. Makromorfološko in mikromorfološko smo opisali 22 morfotipov, molekularno pa identificirali 33 sevov, ki pripadajo 9 rodovom in 17 vrstam. Analiza vrst ni pokazala tipičnega vzorca ponavljanja, niti tipične mikrobiote za to okolje, vendar smo s TTGE potrdili, da na pojavljanje glivnih vrst najbolj vpliva slanost. Najštevilčnejši so bili izolati vrste <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Eurotium repens</i> in <i>Fusarium oxysporum</i> . »Črnih kvasovk«, ki so najbolj razširjene v slanici, nismo izolirali. Postavili smo smernice za obdelavo blata v kozmetične in balneološke namene. Poleg pasterizacije blata bi bilo priporočljivo opravljati še monitoring na poznane glivne mikotoksine, kot so trihoteceni in gliotoksini.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 579.26:582.28:551.35(043)=163.6
 CX microbial communities/fungi/saltpan/saltpan mud/balneology/growing fungi on mud/TTGE/*Aspergillus fumigatus*/*Eurotium repens*/*Fusarium oxysporum*
 AU PROLE, Alen
 AA GUNDE-CIMERMAN, Nina (supervisor)/RASPOR, Peter (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljani, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
 PY 2013
 TI FUNGAL COMMUNITY IN SALT PAN MUD OF SEČOVLJE SALTURNS
 DT Graduation Thesis (University studies)
 NO X, 71 p., 21 fig., 12 tab., 82 ref.
 LA SI
 AL sl/en
 AV Salt pan mud or fango is used in therapeutic purpose for a long time. Its physico-chemical characteristics are well known. In graduation thesis we focused on determining the presence of fungi in the mud and the profile of fungal communities with the TTGE (temporal temperature gel electrophoresis) method. We have tried to identify the changing composition of fungal community in relation to salinity and temperature and also the presence of potentially pathogenic species. Samples were taken 3 times in the period between June 2008 and January 2009. We isolated total DNA for TTGE analysis and grew fungi on MEA with added salt plates to isolate pure cultures. Pure cultures were divided in various morphological groups. From representative species we isolated DNA to determine species for DNA sequencing. 22 morphological groups were described and 33 strains were identified belonging to 9 genera and 17 species. We didn't get a typical structure of fungal community, but with the help of TTGE method we confirmed that the presence of fungal species is most affected by high salinity. The most abundant species were *Aspergillus fumigatus*, *Eurotium repens* and *Fusarium oxysporum*. The "black yeasts" which were dominant group in the salt pan brine, were not isolated. With this work the guideline for the preparation of mud for cosmetic and balneologic use was set. In addition to current pasteurization of mud it would be advisable to continue monitoring for known fungal toxins.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	2
1.2 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MORJE IN SOLINE.....	3
2.2 DEFINICIJA SOLIN	3
2.3 PETOLA.....	4
2.4 SOLINSKO BLATO	5
2.5 SESTAVA BLATA.....	6
2.6 MEHANIZMI DELOVANJA IN ZDRAVILNI UČINKI FANGA	8
2.7 UPORABA FANGA V ZDRAVILNE IN KOZMETIČNE NAMENE	9
2.8 MIKROBIOLOGIJA SEČOVELJSKIH SOLIN	9
2.8.1 Definicija halofilov.....	9
2.8.2 Prilagoditve mikroorganizmov na slanost.....	10
2.8.3 Arheje	10
2.8.4 Bakterije	11
2.8.5 Glive in njihova prilagoditev na slanost	12
2.8.5.1 Črne kvasovke	14
2.8.5.2. Kvasovke	16
2.8.5.3 Rod <i>Eurotim</i>	16
2.8.5.4 Rod <i>Wallemia</i>	17
2.8.5.5 Nitaste glive	17
2.9 METODE ZA IDENTIFIKACIJO GLIV	18
2.9.1 Morfologija gliv	18
2.9.2 Kemotaksonomija	18
2.9.3 Fiziologija	19
2.9.4 Molekularno-genetske metode.....	19
2.9.4.1 Analiza celotnega genoma	19
2.9.4.2 Analiza specifičnih genov	20
3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 MATERIALI	22

3.1.2 Začetni oligonukleotidi.....	22
3.1.3 Kemikalije	22
3.1.4 Aparature	23
3.1.5 Gojišča	23
3.1.5.1 Trdno gojišče MEA (agar s sladnim ekstraktom– <i>Malt extract agar</i>)	24
3.1.5.2 Trdno gojišče MEA (agar s sladnim ekstraktom- <i>Malt extract agar</i>) z dodatkom NaCl	24
3.1.5.3 Tekoče gojišče za izolacijo DNK	24
3.1.6 Raztopine.....	25
3.1.6.1 TAE pufer (50×)	25
3.1.6.2 SSS raztopina (Spore Suspension Solution)	25
3.1.6.3 10 % amonijev persulfat	25
3.1.6.4 2× nanašalni pufer	25
3.1.6.5 Zmes silikagela in celita	25
3.1.6.6 Pufer CTAB	26
3.1.6.7 Fiziološka raztopina	26
3.1.7 Geli za analizo DNK	26
3.1.7.1 PAA gel za TTGE	26
3.1.7.2 10 1% agarozni gel	26
3.1.8 Laboratorijski pribor	27
3.2 METODE	27
3.2.1 Vzorčenje.....	28
3.2.2 Prvotna izolacija gliv iz solinskega blata.....	29
3.2.3 Gojenje gliv do čistih kultur na gojiščih MEA.	29
3.2.4 Morfološke analize.....	29
3.2.4.1 Makromorfološki opis	29
3.2.4.2 Mikromorfološki opis	30
3.2.5 Molekularno-genetske taksonomske analize.....	30
3.2.5.1 Gojenje mirujoče kulture in izolacija genomske DNK	30
3.2.5.2 Verižna reakcija s polimerazo	30
3.2.5.3 Agarozna gelska elektroforeza	32
3.2.5.4 Določanje in obdelava nukleotidnega zaporedja	32
3.2.5.5 Izolacija celokupne DNK iz solinskega blata	32
3.2.5.5.1 Verižna reakcija s polimerazo (vgnezdena PCR)	32
3.2.5.5.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza (TTGE)	33
3.2.5.5.3 Analiza gela	34
4 REZULTATI	35
4.1 VZORČENJE	35
4.2 IZOLACIJA GLIV	35
4.3 MAKROMORFOLOGIJA	36
4.4 MIKROMORFOLOGIJA.....	43
4.5 IDENTIFIKACIJA SEVOV	46
5 RAZPRAVA	56

5.1. VZORČENJE	56
5.2 IZOLACIJA, MORFOLOGIJA IN IDENTIFIKACIJA GLIVNIH VRST	57
5.3 TTGE.....	62
5.4 POVZETEK.....	62
6 SKLEPI	63
7 POVZETEK	64
8 VIRI	65
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

PREGLEDNICA 1: KEMIJSKA ANALIZA VZORCA BLATA (VIR: ODDELEK– LABORATORIJ ZA SANITARNO KEMIJO KOPER).....	6
PREGLEDNICA 2: PREIZKUS MIKROBIOLOŠKE USTREZNOSTI ZA KOZMETIČNE PROIZVODE (VIR: ZAVOD ZA ZDRAVSTVENO VARSTVO MARIBOR).....	7
PREGLEDNICA 3: ANALIZA TEŽKIH KOVIN (VIR: ZAVOD ZA ZDRAVSTVENO VARSTVO MARIBOR).....	7
PREGLEDNICA 4: MINERALNA SESTAVA BLATA IZ MRTVEGA MORJA (MA'OR IN SOD., 2005)	7
PREGLEDNICA 5: TEŽKE KOVINE V BLATU IZ MRTVEGA MORJA (ABDEL- FATTAH IN PINGITORE JR., 2009)	8
PREGLEDNICA 6: ZAČETNI OLIGONUKLEOTIDI, KI SMO JIH UPORABILI PRI PCR IN VGNEZDENI PCR	22
PREGLEDNICA 7: TEMPERATURA IN SLANOST VZORČNIH MEST	35
PREGLEDNICA 8: ŠTETJE KULTUR NA PLOŠČAH MEA Z DODANIM 5 IN 10 % NACL. CFU JE ŠTEVILO KOLONIJ NA 10 G BLATA.....	36
PREGLEDNICA 9: SKUPNI CFU IN SKUPNO ŠTEVILO IZOLATOV V ZBIRKI EXF	36
PREGLEDNICA 10: MORFOLOŠKE SKUPINE GLIV IN NJIHOVA POJAVNOST SKOZI VZORČNO OBDOBJE.....	37
PREGLEDNICA 11: SEZNAM IZOLIRANIH IN IDENTIFICIRANIH SEVOV NA PODLAGI ITS ZAPOREDIJ	47
PREGLEDNICA 12: SEZNAM IZOLIRANIH SEVOV NA PODLAGI BETA- TUBULINSKIH ZAPOREDIJ.....	48

KAZALO SLIK

SLIKA 1: TRADICIONALEN NAČIN POBIRANJA SOLI V SEČOVELJSKIH SOLINAH (ŠKORNIK, 2008).....	4
SLIKA 2: HODOGRAM POTEKA DELA.....	21
SLIKA 3: VZORČNA MESTA.....	28
SLIKA 4: MORFOTIP 1.....	38
SLIKA 5: MORFOTIP 2.....	38
SLIKA 6: MORFOTIP 3.....	39
SLIKA 7: MORFOTIP 6.....	40
SLIKA 8: MORFOTIP 8.....	41
SLIKA 9: MORFOTIP 11.....	41
SLIKA 10: MORFOTIP 13.....	42
SLIKA 11: MORFOTIP 18.....	43
SLIKA 12: FOTOGRAFIJA SEVA EX-F 5417 (<i>A. FUMIGATUS</i>) PRI POVEČAVI 400X.....	44
SLIKA 13: FOTOGRAFIJA SEVA EX-F 5536 PRI POVEČAVI 400X.....	44
SLIKA 14: FOTOGRAFIJA SEVA EX-F 5471 PRI POVEČAVI 400X.....	45
SLIKA 15: FOTOGRAFIJA SEVA EX-F 5432 (<i>ASPERGILLUS</i> SP.) PRI POVEČAVI 400X.....	45
SLIKA 16: FOTOGRAFIJA SEVA EX-F 5432 (<i>ASPERGILLUS</i> SP.) PRI POVEČAVI 1000X.....	46
SLIKA 17: FILOGENETSKO DREVO IZBRANIH SEVOV RODU <i>FUSARIUM</i> IZOLIRANIH IZ SEČOVELJSKIH SOLIN IN REFERENČNIH SEVOV. IZRISANO PO METODI NAJBЛИŽJEGA SOSEDA NA PODLAGI ITS RDNK ZAPOREDIJ.....	47
SLIKA 18: FILOGENETSKO DREVO IZBORA SEVOV <i>ASPERGILLUS/EUROTIIUM</i> IN REFERENČNIH SEVOV. IZRISANO PO METODI NAJBЛИŽJEGA SOSEDA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ, KI KODIRAJO BETA-TUBULIN.....	49
SLIKA 19: REDČITVE DNK (S PUŠČICO SO OZNAČENE PRIMERNEJŠE KONCENTRACIJE CELOKUPNE DNK).....	52
SLIKA 20: TTGE GEL PROFILA GLIVNIH ZDRUŽB.....	53
SLIKA 21: KLADOGRAM IN TTGE PROFIL GLIVNIH ZDRUŽB (P0111 JE A, P1011 JE B, P2911 JE C, L01 JE D IN L10 JE E. JUN 08 JE PRVO VZORČENJE, SEP 08 JE DRUGO IN JAN 09 JE TRETJE).....	54

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

API test	Test za identifikacijo gliv, ki temelji na asimilacijskih sposobnostih
BLAST	Osnovno iskalno orodje lokalne poravnave (angl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
CFU	Enote, ki tvorijo kolonije (angl. <i>Colony Forming Units</i>)
CTAB	Cetil trimetil amonijev bromid
ddH ₂ O	Bidestilirana voda
DNK	Deoksiribonukleinska kislina
dNTP	Deoksinukleotid trifosfat
EPR	Elektronska paramagnetna resonanca (angl. <i>Electron Paramagnetic Resonance</i>)
EX-F	Oznaka sevov zbirke ekstremofilnih gliv EXF (Katedra za biologijo mikroorganizmov, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta)
HPLC	Tekočinska kromatografija z visoko učinkovitostjo (angl. <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
MEA	Agar s sladnim ekstraktom (angl. <i>Malt Extract Agar</i>)
s.s	Suha snov
TAE	Tris-ocetna-EDTA
TTGE	Temperaturna gradientna gelska elektroforeza (angl. <i>Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis</i>)

1 UVOD

Soline in solinsko blato so igrali veliko vlogo pri nastanku in razvoju slovenskih obalnih mest. Tradicijo pridobivanja soli lahko spremljamo že od srednjeveških časov, ko je bila sol še priznано plačilno sredstvo.

Kdaj in kako so nastale soline na severnih obalah Jadrana, ni znano. Iz vztrajnega prizadevanja Beneške republike, da bi si pridobila monopol nad solno trgovino na Jadranu, bi lahko sklepali, da so bile soline v slovenskih zalivih prisotne že vsaj v 10. stoletju (Pahor in Poberaj, 1963).

Prvi pisni viri o solinah v Piranu izhajajo šele iz druge polovice 13. stoletja in sicer v mestnih statutih iz leta 1274, ki so ohranjeni le v odlomkih in vsebujejo nekaj uredb o regulaciji solin ter poudarjajo pravice občine pri pridelovanju soli in trgovini (Pahor in Poberaj, 1963).

V 14. stoletju so ob privolitvi Beneške republike in s pomočjo solinarjev z otoka Paga obnovili soline in začeli pridobivati sol po tradicionalnem, »paškem običaju«.

Od tedaj se v sečoveljskih solinah goji petola, ki daje piranski soli tako značilno belo barvo in poseben okus (Nicolich, 1882).

Portorož kot mondeno letoviško mesto lahko svoj nastanek pripiše slanici in solinskemu blatu, ki sta omogočila razvoj Balneoterapije in zdraviliškega turizma (Škornik, 2008).

Dandanašnji je sol dostopnejša kot nekoč, saj jo pridelamo znatno več kot v preteklosti. Sol je bila nekoč izjemno cenjena dobrina: pomagala je oblikovati imperije, od rimskega do avstro-ogrškega. Beneška republika je dolgo časa imela monopol nad trgovino s soljo v Sredozemlju, kar ji je dajalo izjemno moč. Sol se je prikradla v starodavne šege in verovanja, ponekod pomeni modrost (sol v glavi). Celo angleška beseda za plačo je »salary« (Škornik, 2008).

Solinsko blato se že leta uporablja v terapevtske namene. Njegova fizikalno-kemijska sestava je poznana, saj redno opravljajo meritve: o mikrobiološki sestavi blata pa sicer vemo zelo malo. Večina mikrobioloških raziskav doslej, opravljenih v solinah, se je osredotočala na petolo in slanico.

V okviru diplomske naloge smo poskušali določiti sestavo glivne združbe v blatu sečoveljskih solin. Kultivabilne glive smo izolirali s pomočjo selekcijskih gojišč in različnih pogojev inkubacije. Prisotnost nekultivabilnih gliv pa smo določali s pomočjo molekularne metode, kot je izolacija celokupne DNK blata in določanje celotne mikrobne združbe z metodo TTGE. Predvsem nas je zanimalo, ali so v blatu prisotni potencialno patogeni mikroorganizmi in kako se sestava glivne združbe spreminja glede na koncentracijo soli v blatu.

1.1 NAMEN DELA

Naš namen je bil identificirati glivno združbo solinskega blata s klasično izolacijo in gojitvenimi tehnikami ter z metodo TTGE; ugotoviti pomen različne koncentracije natrijevega klorida v blatu na glivno združbo; gojenje glivnih kultur, določanje različnih morfortipov in preliminarni mikroskopski opis mikrobnih struktur; izolacija glivne DNK ter sekveniranje ITS regije in po potrebi drugih filogenetskih markerjev za določitev glivnih vrst.

1.2 HIPOTEZE

- Sestava glivne združbe se bo spreminjala s časom odvzema vzorca in slanostjo blata.
- Zaradi visoke organske vsebnosti blata pričakujemo, da bodo prisotne potencialno patogene vrste gliv, npr. rod *Stachybotrys*.
- Predpostavljamo, da bo velik delež glivnih sevov pripadal halotolerantnim glivnim vrstam iz rodov *Eurotium* in *Cladosporium*, ki so bile do zdaj že opisane kot naseljevalke slanice in drugih ekoloških niš

2 PREGLED OBJAV

O solinah in morskem okolju je bilo veliko napisanega. Pri našem pregledu objav smo se osredotočili na solinsko blato in njegovo mikrobiološko sestavo.

2.1 MORJE IN SOLINE

Morje in oceani predstavljajo 70 % zemeljske površine. To so slane vode, z relativno konstantno sestavo: v povprečju kilogram morske vode vsebuje 35 g raztopljenih mineralnih snovi. Največji delež predstavlja natrijev klorid, poleg tega pa slanica vsebuje še veliko drugih halogenidov ter tudi kalcijeve, magnezijeve in druge soli. Morska voda vsebuje skoraj vse elemente periodnega sistema in sicer v manjših količinah ali v sledovih (Škornik, 2008).

Slanost se izračunava iz gostote (razmerje med maso in prostornino telesa). Izražena je v stopinjah Bé (Baumé). Bauméjeva lestvica je leta 1768 ime dobila po francoskem izumitelju Antoineju Bauméju. 1 ° Bé je ekvivalent 10 g NaCl na kg vode ali 1 % (Pahor in Poberaj, 1963).

Kemijsko je sol spojina kovine in nekovine, ki nastane pri reakciji med kislino in bazo. Njena sestava je odvisna od načina proizvodnje od tod tudi njena različna obarvanost, od rožnate do bledosive barve. Pri izhlapevanju se začne NaCl obarjati in kristalizirati pri najvišjih slanostih, okoli 25,5 °Bé.

Poznamo več različnih vrst soli: evaporirana, morska, kamena itd. V sečoveljskih in strunjanskih solinah ločimo soli na prvo sol, tradicionalno sol, piransko sol in solni cvet (Škornik, 2008).

2.2 DEFINICIJA SOLIN

Morske soline so antropogena območja, kjer je človek preoblikoval naravna obrežna morska mokrišča z izgradnjo kanalov, nasipov in plitvih bazenov, v katerih je s pomočjo sonca in vetra zgoščeval s plimo ali črpalkami zajeto morsko vodo do njene nasičenosti s soljo. Morske soline najdemo najpogosteje ob izlivih rek, ki so s tisočletnim nalaganjem rečnih nanosov ustvarile naravne pogoje za njihov nastanek. Soline v notranjosti pa ležijo praviloma v neposredni bližini podzemeljskih zalog slanice.

Sečoveljske soline sodijo med tradicionalne, rokodelske soline, saj se sol pobira ročno. Uporabljajo se tradicionalna, ročno izdelana, lesena orodja. Poleg tega se vse predpriprave na poljih izvajajo po tradicionalnih metodah (Škornik, 2008).



Slika 1: Tradicionalen način pobiranja soli v sečoveljskih solinah (Škornik, 2008)

2.3 PETOLA

Petola je nekaj milimetrov debela, trdo sprijeta, želatinasta mikrobna odeja, ki jo na zgornji strani oblikuje preplet cianobakterij črne barve. Njena vloga je dvojna: preprečuje mešanje soli s solinskim blatom in deluje kot biološki filter, ki preprečuje vgrajevanje ionov, npr. železovih in manganovih, v sol (Škornik, 2008).

Nezrelo petolo sestavljajo štirje sloji. V zgornjem sloju rjavkaste barve prevladujeta cianobakteriji *Cyanobacteria entophysalis* in *Lyngbya aestuarii*. Pod tem slojem se nahaja sloj, kjer je najpomembnejša cianobakterija *Microcoleus chthonoplastes*, ki številčno prevladuje tudi v zreli petoli. Druga dva sloja sta še redoks sloj, kjer prevladujejo žveplo-oksidirajoče bakterije iz skupine *Chromatium* in pod njim še anoksični del, bogat s piritom, ki nastaja zaradi delovanja sulfat reducirajočih bakterij (Schneider, 1979; Schneider in Herrmann, 1979).

Na podlagi 16S rRNK sekvenc so halofilno vrsto *Microcoleus* preklasificirali v nov rod, imenovan *Coelofasciculus*, kjer predstavlja *Coelofasciculus chthonoplastes* tipski sev (Siegesmund in sod., 2008).

C. chthonoplastes je kozmopolitski mikroorganizem, izoliran iz različnih slanih okolij povsod po svetu. V sečoveljskih solinah so bili izolirani iz solinskih polj, kjer je slanost dosegla tudi do 300 g/L, kar je daleč nad optimumom rasti v laboratoriju in tudi daleč nad slanostjo drugih izolacijskih mest (Oren, 2010). To je izjemnega pomena, saj je edina cianobakterija, ki preživi pri tej slanosti in igra pomembno vlogo pri izboljševanju čistosti soli ter zmanjševanju izgube slanice s pronicanjem (Liu in sod., 2002).

Najnovejše raziskave petole so se poglobile v raziskovanje diverzitete ob uporabi 16S rDNK genskih knjižnic. Tkavc in sodelavci (2010) so raziskovali tako aktivno kot

neaktivno petolo in sicer do globine 10 mm. Rezultati so pokazali, da je biodiverziteta višja v neaktivni petoli, različni so tudi vzorci pojavljanja skupin mikroorganizmov. V zgornjem sloju aktivne petole so prevladovala sekvence *Proteobacteria*, med katerimi prevladuje rod *Acinetobacter* (41 % sekvenc). *Cyanobacteria* prevladujejo v srednjem sloju, med njimi skupini *Phormidium/Lyngbya* in *C. chthonoplastes*. V anoksičnem sloju najdemo največ sekvenc, ki ne pripadajo nobeni od do sedaj gojenih vrst mikroorganizmov.

Pri vzorcih neaktivne petole prevladujejo v zgornjem sloju *Bacteroidetes* in različne *Proteobacteria* (*Alpha*-, *Gamma*- in *Deltaproteobacteria*). V srednjem sloju prevladujejo sekvence, ki so podobne anoksičnim fototrofom (*Gammaproteobacteria*) in *Cyanobacteria*. Poleg njih pa še *Gemmatimonadetes*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes* in druge *Proteobacteria*. V spodnjem sloju vzorca predstavlja *Acinetobacter* 65 % vseh izolatov, prostalo pade na rod *Cammomonas* in še dva do sedaj neizolirana rodovna kandidata.

2.4 SOLINSKO BLATO

Učinkovitost solinskega blata poznamo že od pradavnine. V Egiptu so blato iz Nila uporabljali za zdravljenje kožnih bolezni, v antični Grčiji je bila prav tako razširjena uporaba blata iz termalnih virov, zdravilne in kozmetične lastnosti blata pa so še posebej cenili v antičnem Rimu, ki velja za zibelko talasoterapije.

Kot vir zdravja je iz svetopisemskih časov znano blato iz Mrtvega morja. Kraljica Kleopatra je na obalah le-tega spodbujala pridobivanje snovi z vsebnostjo soli in mineralov (Malc, 1998).

O uporabi blata iz Mrtvega morja je pisal že Galen v drugem stoletju našega štetja, o njem so pisali tudi mnogi zgodovinopisci. Prvo kemijsko analizo slanice iz Mrtvega morja je opravil Lavoisier že leta 1722 (Nissenbaum, 1993).

Danes zdravljenje ob obalah Mrtvega morja temelji na dveh principih: kopanje v slanici in obloge iz blata. Zdravijo se različne bolezni od psoriaze, dermatitisa in revmatoidnih težav (Sukenik in sod., 1992).

Pri nas so doktrino aplikacije solinskega peloida in matične lužine ali slanice ter indikacije (kožna obolenja, obolenja dihal, vnetni in degenerativni revmatizem, postravmatska stanja, vodenica) že v 13. stoletju postavili benediktinski menihi iz samostana Svetega Lovrenca nad portoroškimi solinami. V času avstro-ogrske nadvlade se je Portorož razvil v zdraviliški kraj. Leta 1894 se je zaključila gradnja balneoterapevtskega centra ob zdraviliškem hotelu Palace, ki je bil eden bolje opremljenih hotelov v tem delu sveta.

Ministrstvo za zdravje je z odprtjem novih term leta 1985 kot zdravilne faktorje priznalo portoroško klimo, solinski peloid fango iz sečoveljskih solin in slanico (Malc, 1998).

V Londonu so leta 1928, na prvem mednarodnem tečaju o zdravilnem blatu, tako blato poimenovali s skupnim imenom »peloid«. Beseda ima izvor v grški besedi »pelos«, ki pomeni blato, mulj. Definicijo za peloid je leta 1937 uvedlo Mednarodno društvo za

medicinsko hidrologijo (ISMH) na zborovanju v Wiesbadnu in jo na zborovanju v Daxu leta 1949 dopolnilo; danes se glasi: peloidi so naravni produkti, sestavljeni iz mešanice mineralne, morske ali jezerske vode z organskimi ali anorganskimi snovmi, ki so nastali z geološkimi ali biološkimi procesi in se uporabljajo v terapijah v obliki oblog ali kopeli. Njihove anorganske sestavine so glina, kremenec, dolomit, pesek, silikati, lapor in minerali. Med organske sestavine pa sodijo razpadli produkti živalskih in rastlinskih organizmov, kot so alge, bakterije in produkti njihovega metabolizma (Amelung in Hildebrandt, 1985).

Sama kakovost in uporabnost peloida je odvisna od velikosti delcev. Več ko je delcev, manjših od 20 mikrometrov, boljši je peloid.

Solinsko zdravilno blato za razliko od ostalih peloidov nastaja samo v solinah oziroma na solinskih poljih. Pri zdravilnem blatu iz sečoveljskih solin se slanica, pomešana s kraško ilovico, spremeni v mehko testenasto blato, ki se v velikih koncentracijah navzame tudi drugih elementov. Poimenovali so ga fango, ki ima korenine v italijanski besedi za blato, tj. »fangi« (Kraševac, 1985).

2.5 SESTAVA BLATA

Leta 1990 so na Balneološkem inštitutu naredili analizo solinskega blata sečoveljskih solin. Definirali so ga kot mehek, nekoliko židko-lepljiv, plastičen material z lastnostmi maže/kreme. Blato je na površini rjavo, zaradi oksidacije, v notranjosti intenzivno črne barve. Delež delcev manjših od 0,002 mm je 62,2 %, kar ustreza mednarodnim zahtevam za zdravilno blato. V naravno vlažnem stanju vsebuje 43,8 % vode in ima pH-vrednost 6,5. Blato ima visoko toplotno kapaciteto, ki je 461 sek/cm² in se na ta način nahaja v zgornjem območju anorganskih peloidov (Eichelsdörfer, 1990).

Leta 2002 je bila narejena kemijska analiza vzorca blata (Preglednica 1). S.s. je suha snov.

Preglednica 1: Kemijska analiza vzorca blata (vir: Oddelek–laboratorij za sanitarno kemijo Koper)

	REZULTAT		REZULTAT
Mangan	0,37 gMn/kg s.s.	Sulfati	4300 mgSO ₄ /kg s.s.
Baker	< 0,05 mgCu/kg s.s.	Sulfid	24 mgS/kg s.s.
Cink	6,4 mgZn/kg s.s.	Kalij	1,5 gK/kg s.s.
Železo	6,1 gFe/kg s.s.	Jodidi	26 gJ/kg s.s.
Kloridi	39 gCl/kg s.s.	Bromidi	40 mgBr/kg s.s.
Magnezij	4,2 gMg/kg s.s.	Fluoridi	1600 mgF/kg s.s.
Kalcij	97 gCa/kg s.s.	Amonijev dušik	115 mgN/kg s.s.

V raziskavi iz leta 2009 so odvzeli blato iz petih vzorčnih mest in naredili preizkus mikrobiološke ustreznosti za kozmetične proizvode in preizkus vsebnosti težkih kovin.

Za tri vzorčna mesta L1, P2 in B2, so dobili ustrezne rezultate. Mikroorganizmi *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* in *Candida albicans* niso bili prisotni

Prole A. Združba gliv v zdravilnem blatu sečoveljskih solin.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2013

(ustrezen rezultat je 0 v 0,1 g ali mL). Neustrezni pa so bili rezultati v primeru aerobnih mezofilnih bakterij (tu je kriterij 10^3 CFU/g ali mL). Poleg tega so v vzorčnem mestu L1 ugotovili prisotnost bakterije *Bacillus subtilis* (Preglednica 2).

Vzorčni mesti L1 in B2 sta lido oziroma bužet (luknja, vdolbina v vogalih kristalizacijske grede), P2 pa je vzorec iz poslužnice, ki je zbiralnik za zgoščeno slanico.

Preglednica 2: Preizkus mikrobiološke ustreznosti za kozmetične proizvode (vir: Zavod za zdravstveno varstvo Maribor)

	Vzorčno mesto L1	Vzorčno mesto P2	Vzorčno mesto B2
Aerobne mezofilne bakterije	7650 CFU/g ali ml	1750 CFU/g ali ml	3400 CFU/g ali ml
<i>B. subtilis</i>	1500 CFU/g ali ml		

Analiza težkih kovin je bila opravljena na istih vzorčnih mestih (Preglednica 3).

Preglednica 3: Analiza težkih kovin (vir: Zavod za zdravstveno varstvo Maribor)

	Vzorčno mesto L1	Vzorčno mesto P2	Vzorčno mesto B2
Arzen	4,2	3,4	2,6
Kadmij	<0,1	0,14	<0,1
Kobalt	6,3	5,6	4,5
Krom	28	24	17
Mangan	220	360	170
Nikelj	36	32	26
Svinec	10	15	<10

Živega srebra in antimona je bilo v vseh vzorcih manj kot 1 mg/kg. Vse enote so v mg/kg

Blato iz Mrtvega morja ima podobne lastnosti kot blato sečoveljskih solin.

Mrtvomorsko blato je po kompoziciji podobno fini glini. Vsebuje 35,6% vode, njegova gostota je $1,67 \text{ g/cm}^3$ in pH-vrednost 6,4. Mineralna sestava je predstavljena v nadaljevanju (Ma'or in sod., 2005).

Preglednica 4: Mineralna sestava blata iz Mrtvega morja (Ma'or in sod., 2005)

Glavni minerali	% sestave	Glavni minerali	% sestave
SiO ₂	20	K ₂ O	1,3
CaO	15,5	TiO ₂	0,5
Al ₂ O ₃	4,8	SO ₃	0,4
MgO	4,5	P ₂ O ₅	0,3
Fe ₂ O ₃	2,8	Cl	6,7
Na ₂ O	1,7	Br	0,2

Glavni kationi so Si^{4+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} in Na^{+} medtem ko sta glavna aniona Cl^{-} in Br^{-} .

Raziskava iz leta 2009 je merila koncentracijo težkih kovin v blatu. Vzorci so bili odvzeti iz štirih vzorčnih mest vzhodne obale Mrtvega morja, kjer sta vzorčni mesti DS 3 in 4 izpred hotela, kjer so dejansko opravljali terapije z blatom. Vzorci so bili odvzeti iz tal, 30–50 cm pod vodno gladino (Abdel-Fattah in Pingitore Jr., 2009).

Preglednica 5: Težke kovine v blatu iz Mrtvega morja (Abdel-Fattah in Pingitore Jr., 2009)

	DS 1	DS 2	DS 3	DS 4
Arzen	3,0	3,3	2,7	2,7
Kadmij	0,9	1,0	0,4	0,4
Svinec	4,1	3,2	5,0	5,1
Kobalt	5,8	6,4	5,7	6,1
Krom	49	54	23	26
Nikelj	28	32	15	16

Raziskava iz leta 2005 (Ma'or in sod., 2005) je opravila tako mikrobiološko kot tudi kemijsko analizo blata iz Mrtvega morja. Vzorci so bili odvzeti na severo-zahodnem delu, 200–400 m od obale, 40–60 cm pod gladino.

Pripravili so različna gojišča, kjer so pod aerobnimi in anaerobnimi pogoji izolirali mikroorganizme. Ta gojišča so bila OGYE (Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract) agar, za štetje kvasovk in gliv v kozmetičnih produktih, MacConkey agar, ki je selektivno gojišče za G- bakterije, CAB (Centrimide-Agar-Base), selektivno gojišče za pseudomonade in Baird-Parker agar, selektivno gojišče za *Staphylococcus aureus* iz kozmetičnih produktov.

Pod anaerobnimi pogoji niso določili rasti pseudomonad, G- bakterij in *S. aureus*. Pod aerobnimi pogoji so bile vrednosti za pseudomonade in G- bakterije pod 100 CFU/g blata in za *S. aureus* 150 ± 130 CFU/g. Kvasovke in glive so pri obeh pogojih imele CFU/g pod 100.

Poleg tega so v raziskavi opazovali še bakteriocidni učinek blata. Ko so bakterije *Escherichia coli*, *Propionibacterium acnes*, *S. aureus* in kvasovko *Candida albicans* zmešali s blatom je CFU izbranih mikroorganizmov močno upadel. Ta učinek gre pripisati visoki slanosti blata, visoki koncentraciji sulfida ter nizkemu pH-ju (Ma'or in sod., 2005).

2.6 MEHANIZMI DELOVANJA IN ZDRAVILNI UČINKI FANGA

Fango ima tri načine delovanja: mehanski, termični in kemični. Pri mehanskem načinu blato zaradi svoje teže pritiska na podporno tkivo in s tem posledično na ožilje, srce in dihalni aparat. Zaradi svoje toplotne prevodnosti dovaja telesu toploto in jo zadržuje. Pri tem igra pomembno vlogo debelina obloge. Kemijski učinek na človeka še ni popolnoma raziskan. Človeška koža je selektivno prepustna in lahko v določenih oblikah prepušča različne snovi, kot so žveplo, vitamina C in D, žveplovodiki itd. Različni minerali, ki so v blatu, imajo tako na telo ugoden učinek. Ene izmed najpomembnejših sestavin blata naj bi

bile huminske kisline, poleg njih pa še različne soli kalcija, silicija, železa, žveplene soli, itd. (Rautar, 1991).

Fangoobloge na mestu, kamor jih nanesemo, pospešujejo cirkulacijo, kar v tkivih pospeši obnavljanje in ima protivnetno delovanje. Deluje tudi analgetično in zmanjšuje procese vnetja. Poleg tega lajša bolečine v mišicah, sklepih, vezivnem in živčnem tkivu (Malc, 1996).

2.7 UPORABA FANGA V ZDRAVILNE IN KOZMETIČNE NAMENE

Solinsko blato ali fango se v termah Palace Portorož uporablja v različne namene. Zaradi močnega antiinflamatornega in analgetičnega delovanja ga v obliki oblog uporabljajo pri zdravljenju degenerativnih obolenj lokomotornega sistema, kronične oblike revmatoidnega artritisa, po ginekoloških posegih in vnetjih genitalij.

Blato aplicirajo na ustrezna mesta, in sicer že segreto na 42 °C. Na obolelih mestih ga pustijo učinkovati 20 minut in nato sperejo z morskovo vodo. V lepotnem programu se blatne obloge nanašajo tudi na mesta celulita.

Poleg tega se fangoobloge lasišča priporočajo psoriatikom, kot peloid se fangomaska obraza nanaša pri mladostnikih z aknasto kožo, kjer zaradi žvepljenih sestavin deluje antiseptično, zaradi visokih koncentracij soli pa izboljšuje obnavljanje in popravljanje kože.

Fango se v kombinaciji s soljo in slanico uporablja v obliki kopeli, kjer na telo nanesena mešanica deluje na kožo in sprošča mišice.

Blatne kopeli so najbolj priporočljive pri ljudeh, ki si zaradi deformiranosti skeleta ne morejo privoščiti fangooblog. Namenjene so tudi psoriatikom, revmatikom in ljudem s težavami zaradi osteoporoze (Malc, 1996).

2.8 MIKROBIOLOGIJA SEČOVELJSKIH SOLIN

2.8.1 Definicija halofilov

Med halofile (ali tudi »sol ljubeče organizme«) sodijo tako evkarionti kot tudi prokarionti, ki so se prilagodili na bivanje v slanih okoljih. Pogosta značilnost takih okolij je pojav gradienta slanosti kot posledica izhlapevanja morske vode. Halofile delimo glede na njihovo potrebo po soli za rast (Kerker, 2004).

Razdelimo jih lahko v tri skupine na podlagi tolerance na sol (Ollivier in sod., 1994).

- Halofili, ki rastejo optimalno med 2–5 % NaCl (0,2–0,85 M)
- Zmerni halofili, ki kažejo hitro rast med 5–20 % NaCl (0,85–3,4 M)

- Ekstremni halofili, katerih optimum rasti je med 20–30 % NaCl (3,4–5,1 M)

2.8.2 Prilagoditve mikroorganizmov na slanost

Da mikroorganizmi lahko živijo v okolju s tako visokimi koncentracijami soli, morajo vzdrževati izotoničnost citoplazme z zunanjim okoljem. Pri tem uporabljajo dve strategiji.

Pri prvi strategiji mikrobne celice vzdržujejo visoke koncentracije ionov v njej. Namesto Na^+ glavno vlogo prevzema K^+ in je celokupno delovanje celice prilagojeno visoki koncentraciji le-tega. To strategijo imajo aerobne arheje iz družine *Halobacteriaceae* in anaerobne bakterije iz reda *Haloanaerobiales* (Dennis in Shimmin, 1997).

Druga strategija je kopičenje posebnih molekul, tako imenovanih kompatibilnih topljencev, ki nimajo zaviralnih učinkov na encimatske procese v celici (Ventosa in sod., 1998). Ti topljenci so pri bakterijah glicin-betain, ektoin, glukozilglicerol in drugi (Galinski in Louis, 1999), pri večini evkariontov pa je to glicerol.

Pri obeh opisanih strategijah se znotraj celice vzdržuje nizka koncentracija Na^+ . Pri tem igrajo pomembno vlogo Na^+ črpalke, ki črpajo Na^+ iz celice in tako poleg ionskega ravnovesja vplivajo tudi na pH (Oren, 1999).

2.8.3 Arheje

Znotraj domene Arhej poznamo veliko halofilov. Največ jih prihaja iz debla *Euryarchaeota*, družina *Halobacteriaceae*. Spadajo med ekstremne halofile, saj optimalno rastejo pri najvišjih slanostih (3,4–5 M). Pri teh slanostih tvorijo goste združbe celic, ki dosežejo koncentracijo do 10^8 celic/ml in vplivajo na rdečo obarvanost solnih polj ali slanih jezer. Celice so različnih oblik, od kokov, paličic nekatere so celo kvadratne ali trikotne. Pri nižjih slanostih večina celic lizira (slanosti nižje od 1–1,5 M) (Kerkar, 2004).

Najbolj prepoznavna lastnost je vijolična membrana, ki vsebuje bakteriorodopsin in rdeče-oranžne karotene. Najbolj številčni karoteni so C-50 bakterioruberini, nekaj je tudi beta-karotenov.

Arheje so tudi drugače prilagojene na slanost. Visoke koncentracije K^+ v citoplazmi, so posledica tega, da so proteini arhej odporni na te ione in jih potrebujejo za stabilnost. Proteini imajo visoko razmerje kisle: bazične aminokisliline, v korist kislil aminokisliln, kar je pogoj za aktivnost in stabilnost encima pri visokih slanostih (Kerkar, 2004).

V solinah je bilo v zadnjem času narejenih več raziskav, kjer so s pomočjo *in situ* PCR metod dokazovali raznolikost arhejskih populacij. Prevladovali so izolati sorodni *Haloquadratum walsbyi*. Ta je dominirala v kristalizacijskih poljih solin v Izraelu (Benloch in sod., 2001), v Avstraliji (Burns in sod., 2004) in celo v perujskih Andih (Maturrano, 2004).

Sečoveljske soline pa se od teh celoletnih solin razlikujejo po omejeni časovni produkciji soli in načinu produkcije soli. V Sečovljah je gostota populacije haloarhej le 10^6 celic/ml. Z uporabo 16S rRNK, kot molekularnega markerja, so ugotovili, da prevladujeta dve

skupini, sorodni rodu *Halorubrum* (43 in 36 od 120 zbranih okoljskih sekvenc). Najštevilčnejša je bila skupina sorodna vrsti *Halorubrum lacusprofundi*, druga pa je bila najbolj podobna haloarheji CSW 5.28.5, s katero je imela 99 % podobnost. Naslednja najbolj številčna skupina (16 sekvenc) je bila podobna rodu *Haloarcula*. Le tri sekvence so bile sorodne s *H. walsbyi*, s katero so imele 91 % identičnost sekvenc (Pašić in sod., 2005).

V raziskavi so se kot molekularni marker odločili uporabiti še gen za bakteriorodopsin. Izbrali so 60 klonov ter jih sekvencirali in izrisali drevesa. Podobno kot pri 16S RNK je tudi tu večina (73 %) sekvenc kazala podobnost z rodом *Halorubrum*, 16,6 % sekvenc pa je bilo sorodnih gruči *H. walsbyi*. Preostale sekvence so bile razdeljene v dve skupini: ena je bila sorodna doslej še nepoznani sekvenci bakteriorodopsina, druga pa sekvenci *Nastrinema altunensis* (Pašić in sod., 2005).

Podobna raziskava je bila opravljena še za sezonske soline v Stonu pri Dubrovniku. Pri obeh solinah so opravili kultivacijo arhej na različnih gojiščih, kjer so s pomočjo analize 16S sRNK genov in primerjave fenotipov dobili raznolikost gojenih arhej. Zaradi krajšega časa delovanja solin je bila arhejska populacija za red nižja (10^6 celic/ml) kot v solinah iz suhih predelov (10^7 – 10^8 celic/ml). Diverziteto mikroorganizmov so določali s fenotipsko karakterizacijo in s komparativno analizo 16S RNK sekvenc. Pri obeh solinah so prevladovali izolati sorodni rodu *Haloferax*. Poleg roda *Haloferax* so bili drugi najštevilčnejši izolati, ki so filogenetsko sodili v rod *Haloarcula*, ki je pri Stonu predstavljala 20 % izolatov, v sečoveljskih solinah pa 17 % (*H. hispanica* in *H. mediteranii* iz Stona in *H. hispanica* iz Sečovelj). Sledita jima rodova *Haloterrigena*, z vrsto *H. thermotolerans* v obeh solinah in *Halobacterium* z vrsto *H. salinarum* iz Stona (Pašić in sod., 2007).

Pri obeh solinah so pri klonskih izolatih prevladovale sekvence roda *Halorubrum*, vendar so komparativne analize sekvenc pokazale visoko verjetnost, da vsebujeta genski knjižnici različne taksonomske linije. Višja diverziteta pa je bila v sečoveljskih solinah, kar bi lahko bila posledica bolj oligotrofne vode v Stonu (Pašić in sod., 2007).

2.8.4 Bakterije

Pri raziskavi solin Maras v Peruju so izolirali bakterije in pridobili sekvence. Od 107 izolatov je bila večina sorodna rodu *Pseudomonas*, največ sevu *Pseudomonas halophila*, druga najštevilčnejša sta seva *Pseudomonas sp.*. Poleg teh so dobili tudi sekvence novih vrst *Halovibrio denitrificans* in *Halospina denitrificans*. Od šestnajstih bakterijskih izolatov jih polovica pripada sevu *Pseudomonas sp.* in štiri *Salinibacter ruber* (Maturrano in sod., 2006a).

Bakterijske sekvence rodu *Pseudomonas* so izkazovale visoko stopnjo sorodnosti in tvorijo dve gruči. Dva izolata v tej gruči, sta bila opisana kot nova vrsta *Salicola marasensis*. Izoliranih je bilo šest sevov, ki genetsko in fenotipsko sodijo v nov rod *Salicola*, Gram-negativna, zmerno halofilna bakterija z optimumom rasti pri 14 % NaCl. Sorodstveno najbližji sev *Pseudomonas halophila* ponovno pregledujejo, saj je fenotipsko podoben opisu *Halovibrio variabilis* (Maturrano in sod., 2006b).

Leta 2000 so iz španskih solin (Santa Pola in Mallorca) izolirali pet sevov, ki so jih uvrstili v novo vrsto, tj. *Salinibacter ruber*, rod *Salinibacter*. To je Gram-negativna, rdeče obarvana, ekstremno halofilna vrsta, ki raste pri optimumu slanosti 20–30 % NaCl in ne more rasti pod 15 % NaCl. To jo uvršča med najbolj halofilne vrste iz domene *Bacteria*. Njena fiziološka podobnost z arhejsko družino *Halobacteriaceae* je presenetljiva. Poleg omenjene rdeče obarvanosti kolonij, sta obe skupini mikroorganizmov aerobni heterotrofi in vzdržujeta visoko znotrajcelično koncentracijo K^+ (Anton in sod., 2002).

Sulfat oksidirajoče bakterije (SOB) prav tako naseljujejo slana območja. Po zadnjih raziskavah slanih jezer, solin in globokomorskih slaníc so odkrili šest linij obligatnih kemolitotavtrofov. Vse linije pripadajo razredu *Gammaproteobacteria* (Sorokin in sod., 2006).

Od šestih linij sta dve ekstremno halofilni in pripadata do sedaj še neznanim ekotipom. Za aerobno skupino je bil določen nov rod, imenovan *Thiohalospira* (Sorokin in sod., 2008a), druga skupina fakultativnih denitrifikatorjev pa je na podlagi genotipskih in fenotipskih raziskav predlagana za nov rod *Thiohalorhabdus* s *Thiohalorhabdus denitrificans* kot tipsko vrsto (Sorokin in sod., 2008b).

Izoliranih je bilo sedem sevov roda *Thiohalorhabdus* iz slanih jezer v notranjosti Sibirije in en sev iz sečoveljskih solin. Skupna značilnost sevov je rast pri pH optimumu 7,5–7,8 in pri optimalni slanosti 3,0 M NaCl. Celice, ki so rasle pri 4,0 M NaCl, so akumulirale velike količine kompatibilnega topljenca glicin betaina. Oznaka sečoveljskega izolata je HLD 18 (Sorokin in sod., 2008b).

Pri rodu *Thiohalospira*, kjer je *Thiohalospira halophila* tipska vrsta, poznamo 20 izoliranih sevov, razdeljenih v tri vrste, in sicer na podlagi DNK-DNK hibridizacije. Ena izmed genomskih vrst je iz sečoveljskih solin z oznako HL 25 (Sorokin in sod., 2008a).

2.8.5 Glive in njihova prilagoditev na slanost

Poleg že prej omenjenih načinov je za evkarionte značilna še pigmentacija membrane in celične stene. Zaradi pomanjkanja študij o glivah v slanih okoljih ni bilo do sedaj veliko mikroorganizmov, ki bi lahko predstavljali modelne halofilne evkarionte. To se je spremenilo v zadnjih letih, zlasti zaradi raziskav profesorice N. Gunde-Cimerman in njene skupine v sečoveljskih solinah. Pred tem so kot modelni mikroorganizmi bile uporabljene kvasovke, kot sta *Debaryomyces hansenii* in *Saccharomyces cerevisiae*.

D. hansenii je mikroorganizem, ki pod stresnimi pogoji povišane slanosti vključuje Na^+ . Visoka koncentracija Na^+ nima bistvenega vpliva na rast. Poleg tega lahko ta kvasovka prevzema K^+ iz okolja, ko je koncentracija le-tega nizka in je koncentracija Na^+ visoka, kar predstavlja prednost v večini naravnih slanih okoljih. Zato se *D. hansenii* v slanih okoljih obnaša kot halofilna kvasovka (Prista in sod., 1997).

Črna kvasovka *Hortaea werneckii* je zaradi lastnosti, da lahko raste brez soli in tudi blizu nasičenosti, eden izmed najbolj halofilnih mikroorganizmov nasploh in kot tak idealen modelni organizem za prikaz evkariontske prilagoditve na slanost.

Ta gliva vzdržuje zelo nizko koncentracijo Na^+ in K^+ ionov znotraj celice, tudi ko raste pri visoki koncentraciji NaCl. Najnižja koncentracija teh ionov v celici je pri 17 % NaCl, kjer *H. werneckii* še raste uspešno, a predstavlja ta slanost neki obrat, ki se kaže v počasnejši rasti, zmanjšani velikosti kolonij in značilnih fizioloških spremembah. Podobno je bilo sproženo tudi pri zmerno halofilni glivi *Aureobasidium pullulan*, kjer je bila prav tako najnižja koncentracija ionov pri 17 % NaCl (Kogej in sod., 2005).

Kogej in sodelavci (2005) so pri merjenju znotrajceličnih koncentracij Na^+ in K^+ izračunali razmerje med ionoma. Najvišje razmerje K^+/Na^+ je bilo pri rasti brez soli in se je nižalo z višanjem koncentracije. Ko so celice *H. werneckii* in *A. pullulans* izpostavili hiperosmotskemu šoku, so pokazale svojo različno prilagoditev. V splošnem je bila znotrajcelična koncentracija ionov pri *H. werneckii* mnogo nižja kot pri *A. pullulans*. Pri neprilagojenih celicah obeh vrst, ki so rasle na mediju brez soli, se je ob dodatku 10 % NaCl znižala koncentracija K^+ . Pri *A. pullulans* je ta šok vodil k povišanju koncentracij Na^+ medtem ko pri *H. werneckii* tega povišanja ni bilo opaziti. Ponovni dodatek 10 % NaCl je pri *H. werneckii* znižal koncentracijo K^+ in povišal koncentracijo Na^+ , pri *A. pullulans* pa so koncentracije Na^+ ostale visoke in nespremenjene. Te spremembe so v skladu z rastnima krivuljama teh dveh vrst, kjer dodatno povišanje koncentracije soli do 20 % NaCl inhibira rast *A. pullulans*, a le upočasni rast *H. werneckii*. Raziskava poleg tega dokaže, da so koncentracije Na^+ pri povišanih slanostih pri obeh črnih kvasovkah mnogo nižje kot pri *D. hansenii*.

Večina gliv uporablja ENA P-tip ATP-az za izločanje Na^+ in/ali K^+ ionov. Ob izolaciji in karakterizaciji dveh genov *HwENA*, ki kodirajo ATP-aze v *H. werneckii*, so ugotovili, da so ti geni odzivni na visoko koncentracijo soli. V prilagojenih celicah se je pri 25 % NaCl močno povišala ekspresija genov, še posebej gena *HwENA2*. Pri celicah, ki so bile neprilagojene, pa je bila povišana ekspresija gena *HwENA1*. Tudi mRNK ekspresija je bila povišana šele po 90 minutah. Zaključili so, da so geni *HwENA* vključeni v pozen odziv celice na slanost, kjer se geni *HwENA1* odzivajo na nenadne spremembe slanosti, geni *HwENA2* pa pri mehanizmih vzdrževanja nizke vsebnosti kationov pri prilagojenih celicah (Gorjan in Plemenitaš, 2006).

Najpomembnejši kompatibilni topljenec pri evkariontih je glicerol. Merili so spreminjanje koncentracije glicerola zunaj in znotraj celice, tj. pri različnih slanostih. Koncentracija znotrajceličnega glicerola je naraščala do 10 % NaCl, pri višjih koncentracijah pa je ostajala praktično nespremenjena. Zunajcelična koncentracija glicerola je bila nizka in neodvisna od slanosti med 0 % in 17 % NaCl, pri višjih slanostih pa je naraščala, kar je v skladu z zmanjšano rastjo glive pri teh slanostih.

V raziskavi so merili tudi ekspresijo gena za domnevno glicerol-3-fosfat dehidrogenazo. Ta igra pomembno vlogo pri preusmeritvi metabolnega pretoka od glikolize k produkciji glicerola. Klonirali in sekvencirali so del *H. werneckii glp D* gena in ga uporabili pri hibridizaciji odtisa po Northernu in RT-PCR analizi. Opazili so povišano ekspresijo gena pri višjih slanostih, kar je potrdilo hipotezo, da je sinteza glicerola v *H. werneckii* regulirana predvsem s transkripcijsko regulacijo glicerol-3-fosfat dehidrogenaze. Glicerol predstavlja pomemben kompatibilni topljenec v *H. werneckii*, nespreminjanje njegove koncentracije pri višjih koncentracijah pa nakazuje na možnost prisotnosti še kakšnega kompatibilnega topljenca (Petrovič in sod., 2002).

Kogej in sodelavci so leta 2007 s pomočjo HPLC metode raziskovali koncentracijo kompatibilnih topljencev med različnimi fazami rasti in pri različnih slanostih. Rezultati so potrdili, da je glavni kompatibilni topjenec *H. werneckii* glicerol, ki ga v stacionarni fazi nadomesti eritritol in delno mikosporin-glutaminol-glikozid. Vlogo glicerola in eritritola so dokazali s hipoosmotskim šokom. Celice so v stacionarni fazi nižale nivo glicerola in eritritola, zaradi spremenjenega osmotskega pritiska. *H. werneckii* pri nižjih slanostih akumulira mešanico poliolov (glicerol, arabitol, eritriol in manitol), medtem ko pri višjih slanostih prevladujeta glicerol in eritritol.

H. werneckii sintetizira 1,8-dihidroksinaftalen (DHN) melanin pri slanih in neslanih pogojih rasti (Kogej in sod., 2004). Vendar pa slanost vpliva na organizacijo melanina. Pri slanostih med 0 % in 5 % NaCl tvorijo granule melanina tanko, kontinuirano plast na zunanem delu celične stene in tako tvorijo prepustno prepreko za glicerol. To se je pokazalo, ko so s triklazolom inhibirali tvorbo melanina. Take celice so zadržale bistveno manj glicerola v celici in bistveno višje količine poliolov z višjo molekulsko maso. Pri višjih slanostih (10 in 20 % NaCl) pa so granule melanina ločene in ne tvorijo kontinuirane plasti. Pri teh slanostih melanin najbrž ne igra tako pomembne vloge pri prepustnosti glicerola, kar se kaže tudi v manjši razliki v vsebnosti le-tega pri melaniziranih in nemelaniziranih celicah (Kogej in sod., 2007). Višja prepustnost glicerola pri višjih koncentracijah soli je v skladu z izmerjeno povišano koncentracijo zunajceličnega glicerola (Petrovič in sod., 2002).

Podobna melanizacija celične stene je opazna tudi pri rodu *Trimmatostroma*. Kogej in sodelavci (2006) so raziskovali vpliv slanosti na še eno halofilno glivo iz sečoveljskih solin: *Trimmatostroma salinum* in njeno kserofilno sorodnico *T. abietis*. *T. salinum* je kazala optimum rasti pri 2–6 % NaCl in je lahko rasla do 26 % NaCl. Podobno kot pri *H. werneckii* tudi pri *T. salinum* triklazol zavira nastanek melaninskih granul. Vendar za razliko od *H. werneckii* melaninski sloj *T. salinum* tudi pri najvišjih slanostih (20 %) tvori gost in kompakten sloj na zunanem delu celične stene.

Raziskave so pokazale, da kljub stresu *H. werneckii*, *A. pullulans* in *P. triangularis* ne spreminjajo skupne vsebnosti sterolov, višajo pa vsebnost fosfolipidov z visokim številom C atomov (največ C₁₆ in C₁₈). Poviša se tudi koncentracija nenasičenih maščobnih kislin v membrani pri *H. werneckii* in *A. pullulans*, rahlo zniža pa pri *P. triangularis*. EPR (elektronska paramagnetna resonanca) meritve so tako pokazale bistveno višjo fluidnost membrane obeh halofilnih gliv v primerjavi z zmerno halofilno *Aureobasidium pullulans*. Poleg tega *H. werneckii* to fluidnost vzdržuje skozi različne slanosti, kar je v skladu z njeno dominantno pojavnostjo v teh okoljih (Turk in sod., 2004).

2.8.5.1 Črne kvasovke

Prevladujoče glive v solinah spadajo v polifiletsko skupino »črnih kvasovk«. Spadajo v deblo *Ascomycota*, redovi *Chaetothyriales*, *Dothideales* in *Pleosporales* (Sterflinger in sod., 1999).

Prvotno je bilo predpostavljeno, da so razmere v solinah preostre za evkarionte. Gunde-Cimerman in sodelavci (2000) so iz vodnih vzorcev solnih polj, zbranih med sezono pobiranja soli leta 1999 v sečoveljskih solinah, izolirali različne glivne vrste. Prevladovale so *Hortea werneckii*, *Phaeotheca triangularis*, *Trimmatostroma salinum*, *Aureobasidium pullulans* in *Cladosporium* spp.

Glive so imele čez leto tri viške rasti. Prva dva v začetku pomladi, torej začetku sezone pobiranja soli, in tretjega proti koncu sezone, ko sta bili slanost in koncentracija hranil najvišja (Butinar in sod., 2005a).

Uporabili so štiri različne metode izolacije gliv, da bi se izognili možnim napakam pri oceni številčnosti vrste. Te so bile: filtriranje slane vode (10–100 ml), uporaba agarnih vab, obogatitvenih gojišč in biofilmov, ki so jih razpršili po selektivnih gojiščih.

H. werneckii je bila dominantna v okolju skozi celotno sezono in je bila edina gliva, ki je rasla pri vseh koncentracijah soli, od 0 % do nasičenosti. Še posebej je bila številčna v obdobju kristalizacije soli v avgustu. Glede na dobljene podatke, bi lahko sklepali, da okolje solinskih polj predstavlja njeno naravno ekološko nišo (Gunde-Cimerman in sod., 2000).

Butinar in sodelavci (2005a) so raziskovali prisotnost melaniziranih gliv v petih različnih solnih poljih sečoveljskih solin skozi vse leto 1999 ter med sezonama pobiranja soli leta 1997 in 1999. Poleg tega so preverjali prisotnost teh gliv še v šestih solinah na treh kontinentih (soline La Trinitat in Santa Pola v Španiji, Camargue v Franciji in soline na atlantskih obalah Portugalske, Namibije in Dominikanske republike).

H. werneckii je poleg sečoveljskih solin dominirala še v vseh drugih solinah, kjer je bila naravna slanost višja od 20 %. Njen CFU (enote, ki tvorijo kolonije) je bil najvišji pri višjih slanostih in je znašal skoraj 4000 CFU/L (pri 22 % slanosti na MEA+30 % NaCl).

Druga najštevilčnejša vrsta je bila *P. triangularis*, z najvišjo frekvenco pojavljanja pri 22 in 28 % slanosti, vendar z nezmožnostjo rasti pri 32 % slanosti (Gunde-Cimerman in sod., 2000).

Pojavljala se je v vseh solnih poljih sečoveljskih solin skozi vse leto ter tudi v solinah po svetu. Pri *in vitro* gojenju je bil razpon slanosti od 0 do 24 % NaCl, z ožjim optimumom rasti, od 6 do 12 % NaCl, kot pri *H. werneckii*. Večinoma je bila izolirana iz biofilmov na površini slanice in iz mikrobnih preprog. Kakor kaže, predstavljajo različne adhezivne površine prekrte s slanico primarni habitat te vrste (Butinar in sod., 2005a).

Vrsta, ki je bila izolirana le iz solnih polj sečoveljskih solin, je *T. Salinum*. Razpon rasti je bil med 8 in 25 % NaCl, najvišja je bila pri 25 % slanosti (700 CFU/L). Skoraj izključno je bila izolirana iz enega polja, kjer je rasla na ograji iz lesa, potopljeni v slanico (Butinar in sod., 2005a).

Aureobasidium pullulans je bila prisotna v vseh slanih poljih sečoveljskih in drugih solin, vendar v nizkem številu. Najštevilčnejša je bila pri slanostih pod 8 % NaCl, kjer je vrednost CFU narasla do 800/L. Pri *in vitro* pogojih je prenašala slanosti do 18 %, vendar je najbolje rasla na gojiščih brez NaCl, zato jo uvrščamo med zmerne halofile (Butinar in sod., 2005a).

Rod *Cladosporium* je bil najbolj prisoten pri različnih slanostih in okoljih, tako med sezono pobiranja soli kakor tudi čez vse leto. V sečoveljskih solinah je najbolje rasel pri slanostih med 15–25 % (1000–3600 CFU/L), pod to mejo slanosti pa je bil CFU med 300 in 500 L⁻¹. Vrste, izolirane večinoma s plošč s sladkorji, so pripadale že znanim vrstam *C. herbarum*, *C. cladosporioides* in *C. sphaerospermum*. Izolati s slanih plošč pa so predstavljali nove, še neopisane halofilne vrste rodu *Cladosporium* (Gunde-Cimerman in sod., 2000; Butinar in sod., 2005a).

Le-te so opisali Zalar in sodelavci leta 2007. Večina je bila izolirana iz slanice sečoveljskih solin. Te so poimenovane *Cladosporium fusiforme*, *C. halotolerans*, *C. psychrotolerans*, *C. salinae*, *C. spinulosum* in *C. velox*. Izolat, ki je bil izoliran iz solin iz Dominikanske republike, je bil poimenovan *C. dominicanum*.

2.8.5.2. Kvasovke

Butinar in sodelavci (2005b) so v sečoveljskih in drugih solinah po svetu ter v različnih slanih jezerih (Mrtvo morje, Veliko slano jezero) iskali prisotnost kvasovk. V ta namen so uporabili različna gojišča, agarne vabe in biofilme iz slanice, ki so jih razlili po ploščah.

V vseh solinah je bilo število izoliranih kvasovk nizko. Povprečje je bilo med 0 in 300 CFU/L ter je redko presegalo 1000 CFU/L, pa še to izven sezone pobiranja soli (sečoveljske soline) ali v vzorcih s koncentracijo NaCl pod 20 %. Iz biofilmov kvasovke niso bile izolirane. V večini primerov so bili izolati s plošč z 10 % NaCl, v manjšem številu s plošč s 17–25 % NaCl. Na ploščah z 32 % NaCl ni bilo izolatov.

Najpogostejše izolirani kvasovki v sečoveljskih solinah sta bili *Picchia guilliermondii* (do 270 CFU/L) in *Candida parapsilopsis*. V sečoveljskih solinah sta sledili *Rhodospiridium sphaerocarum* in *R. babjevae*, ki sta imeli CFU do 20/L. *Debaryomyces hansenii* je bila izolirana iz solin v Namibiji in iz vzorca slanice iz Velikega slanega jezera (do 50 CFU/L). V izraelskih solinah je bila najpogostejše izolirana kvasovka *Trichosporon mucoides* (do 1000 CFU/L), sledila ji je vrsta *Yarrowia lipolitica*, a v mnogo nižjem številu (23 CFU/L). V grenčicah iz solin La Trinitat, bogatih z magnezijevim kloridom, so izolirali dve novi vrsti na različnih ploščah, vključno na plošči s 17 % NaCl. Provizorično so jih poimenovali podobna-*Candida atmosphaerica* in podobna-*Pichia philogaea* (Butinar in sod., 2005b).

V večini primerov so bile kvasovke izolirane le enkrat ali v različnem časovnem obdobju. Glede na to, da izolacija večine vrst ne sledi nekemu prostorskemu ali časovnemu vzorcu, lahko sklepamo, da za večino vrst to ni naravno okolje. Vrste, ki se najpogostejše pojavljajo skozi daljše časovno obdobje in na različnih lokacijah, so *P. guilliermondii*, *C. parapsilopsis* in *T. mucoides* (Butinar in sod., 2005b).

2.8.5.3 Rod *Eurotium*

Vzorci so bili vzeti iz istega časovnega obdobja, tj. leta 1997 na vsake tri tedne med sezono pobiranja soli in leta 1999 čez vse leto (enkrat mesečno). Poleg tega so uporabili še vzorce

iz prej omenjenih solin iz Španije, Francije, Izraela, Portugalske, Namibije in Dominikanske Republike (Butinar in sod., 2005c).

Od celokupnega števila 208 izolatov so identificirali šest različnih vrst rodu *Eurotium*. 74 % izolatov je pripadalo vrsti *E. amstelodami*, 10 % vrstama *E. repens* in *E. herbariorum*, preostanek pa *E. rubrum*, *E. chevalieri* in *Eurotium* sp.

Eurotium sp. naj bi predstavljala novo vrsto, pogojno poimenovano »*E. halotolerans*« (Butinar in sod., 2005c).

E. amstelodami, *E. repens* in *E. herbariorum* so predstavljale eno ekološko skupino. Iz sečoveljskih solin so bile izolirane v obeh letih jemanja vzorcev, pa tudi iz mikrobioloških vab in biofilmov. Prav tako so bile konstanto izolirane iz vseh solin v raziskavi. Najvišjo pojavnost so imele v vzorcih z 18–25 % koncentracijo NaCl. Drugo skupino gliv pa so le občasno izolirali iz solin in le pri nižjih slanostih (5–15 % NaCl). Iz sečoveljskih solin so bile te tri vrste izolirane le v letu 1999, *E. halotolerans* pa je bila izolirana le iz teh solin.

Izven sezone produkcije soli so imele vse *Eurotium* vrste nizek CFU (pod 100/L). S povišanjem slanosti v začetku spomladi se je narahlo povišal tudi CFU (do 500/L). Med sezono produkcije soli sta bila izrazita dva vrha, ki sta sovpadala s povišanjem slanosti in koncentracije dušika. Prvi vrh je bil pri slanosti 10–15 % NaCl, kjer se je CFU povzpел do 5000/L, in drugi, najvišji pri 18–25 % slanosti s CFU do 30000/L. Med vrhovoma je bil CFU posameznih vrst le 250/L.

Pri *in vitro* pogojih so dokazali, da so te vrste sposobne preživeti velik razpon slanosti (0–30 % NaCl koncentracije) in da nekatere celo sporulirajo pri visokih slanostih (do 22 % NaCl).

Raziskava je nakazala, da sta vrsti *E. rubrum* in »*E. halotolerans*« le občasni naseljevalki solin, in sicer pri slanica h z nižjo slanostjo. Vrste iz prve ekološke skupine pa naj bi predstavljale avtohtono halofilno glivno skupnost iz solin po vsem svetu (Butinar in sod., 2005c).

2.8.5.4 Rod *Wallemia*

Rod *Wallemia* je edini rod znotraj redu *Wallemiales* (deblo *Basidiomycota*). Znotraj rodu so tri vrste, ki so jih izolirali iz slanica h iz sečoveljskih solin, solin iz Namibije in solin iz Dominikanske republike. To so *Wallemia ichthyophaga*, *Wallemia sebi* in *Wallemia muriae*. *W. ichthyophaga* je ena izmed najbolj halofilnih evkariontskih vrst do sedaj opisanih, saj ne more rasti brez dodanega 9 % NaCl (Zalar in sod., 2005).

2.8.5.5 Nitaste glive

Nitaste glive so izolirali iz sečoveljskih solin med sezono pobiranja soli v letih 1993 (februar, maj in avgust), 1994 (junij, julij), 1995 (junij, julij, avgust) in 1996 (junij, julij, avgust). Uporabili so različne izolacijske tehnike in selekcijska gojišča ter izolirali glive iz zraka, vode in tal. Najbolj raznolike glive so bile iz tal: izoliranih je bilo 150 sevov, z metodo raztapljanja tal v agarju. Največ vrst je pripadalo rodovoma *Aspergillus*, vrste

Aspergillus terreus, *A. melleus*, *A. niger*, *A. versicolor*, *A. ruber*, *A. ustus*, *A. flavus*, *A. fumigatus* in *Penicillium*, vrste *Penicillium griseoroseum*, *P. spinulosum*, *P. chrysogenum*, *P. expandosum* in *P. brevicompactum*. Poleg njih so izolirali še rodove *Acremonium*, *Alternaria*, *Arthrimum*, *Beauveria*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Verticillium* in *Ulocladium*. Z metodo filtriranja vodnih vzorcev je bilo izoliranih 25 sevov, ki pripadajo naslednjim vrstam: *Fusarium oxysporum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. griseoroseum*, *P. islandicum*, *P. brevicompactum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus terreus*, *A. niger*, *A. silvaticus*, *A. fumigatus*, *Apiospora montagnei*, *Artriunium sp.* in *Chaetomium globosum* (Gunde-Cimerman in sod., 2001).

2.9 METODE ZA IDENTIFIKACIJO GLIV

Poznamo različne metode za identifikacijo gliv; od morfoloških, kemotaksonomskih, fizioloških in molekularno-genetskih.

2.9.1 Morfologija gliv

Taksonomijo gliv si je skorajda nemogoče predstavljati brez morfologije, ne glede na razvoj molekularnih in biokemijskih metod. Osnova za ločevanje organizmov na višjih ravneh, pa tudi na ravni vrst in podvrst, so opisne metode.

S pomočjo binokularne lupe in mikroskopa opazujemo naslednje parametre:

- morfološke makroskopske znake (oblika, barva micelija in razmnoževalnih struktur),
- morfološke mikroskopske znake (oblika, barva, dimenzije spor in drugih mikroskopskih struktur),
- kriterije mikroskopske dinamike (sporogeneza, konidiogeneza).

Pri mikroskopski dinamiki so pomembni naslednji parametri: izvor ter razvoj konidijev, izvor stene konidija, ureditev konidijev, način sproščanja spor in drugi. Na podlagi teh parametrov in gojitvenih zahtev so napisani morfološki ključi za določanje neznane glive. Pomembne so tudi glivne zbirke ali glivariji (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

2.9.2 Kemotaksonomija

Kemotaksonomija uporablja razlike v kemijski sestavi pri različnih organizmih. Glive lahko razlikujemo na osnovi naslednjih sestavin: celokupni proteini, izoencimi, sekundarni metaboliti, lipidi, ubikinoni, ogljikovi hidrati. Biokemijske metode so uporabne kot dopolnilne tehnike pri identifikaciji gliv, zlasti na nižjih taksonomskih nivojih (vrste in nižje) in ko imamo opravka z morfološko zelo podobnimi organizmi (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

2.9.3 Fiziologija

Razviti so komercialni in polavtomatski testi za identifikacijo gliv: npr. API test, ki temelji na asimilacijskih sposobnostih. Uporabni so predvsem za identifikacijo kvasovk, kjer reakcije interpretiramo s primerjavo rasti, kvasovko pa identificiramo s pomočjo identifikacijskih tabel in analitičnega indeksa profilov (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

2.9.4 Molekularno-genetske metode

Identifikacija na ravni fenotipa je pogosto nezanesljiva saj na rezultate vplivajo pogoji gojenja: zato jih kombiniramo z molekularnimi metodami. Ko govorimo o njih, govorimo o analizi nukleinskih kislin DNK in RNK, in sicer o dveh pristopih:

- analiza celotnega genoma,
- analiza specifičnih genov ali genskih sklopov (clusters) (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

2.9.4.1 Analiza celotnega genoma

Za analizo celotnega genoma so najpogostejše uporabljene naslednje metode:

- določanje vsebnosti gvanina in citozina,
- polimorfizem fragmentov rezanih z endo- ali eksonukleazami (RFLP ali t-RFLP)
- DNK-DNKA hibridizacija,
- naključno pomnoževanje polimorfne DNK s polimerazno verižno reakcijo (RAPD PCR),
- polimorfizem naključno pomnoženih delov (AFLP) (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002),
- temperaturna gradientna gelska elektroforeza (TTGE) (Muyzer in Smalla, 1998) je metoda, ki ločuje fragmente enake dolžine glede na razliko v bazni sestavi. DNK fragmenti pri tej elektroforezi potujejo skozi poliakriamidni gel, kjer temperaturo višamo v časovnih intervalih. Le-ta je zato konstantna na celem gelu, narašča pa časovno. Rezultat tako predstavlja linearni temperaturni gradient med elektroforezo. Različni DNK fragmenti se talijo pri različnih temperaturah in jih zato na gelu vidimo na različnih mestih. Večinoma se uporablja mešanica 16S rRNK genov pri prokariotih in 18S rRNK genov pri evkariotih, ki se pomnožijo z PCR metodo, iz okoljskih vzorcev. Ko interpretiramo rezultate, se je pomembno zavedati, da imajo DNK sekvence različnih bakterij isto kritično temperaturo taljenja in jih zato na gelu ne ločimo. Dobljeni profil združbe nam pokaže raznolikost okoljskih vzorcev, ne pove pa nam, ali gre pri teh vrstah za najbolj aktivne, zastopane vrste v združbi.

2.9.4.2 Analiza specifičnih genov

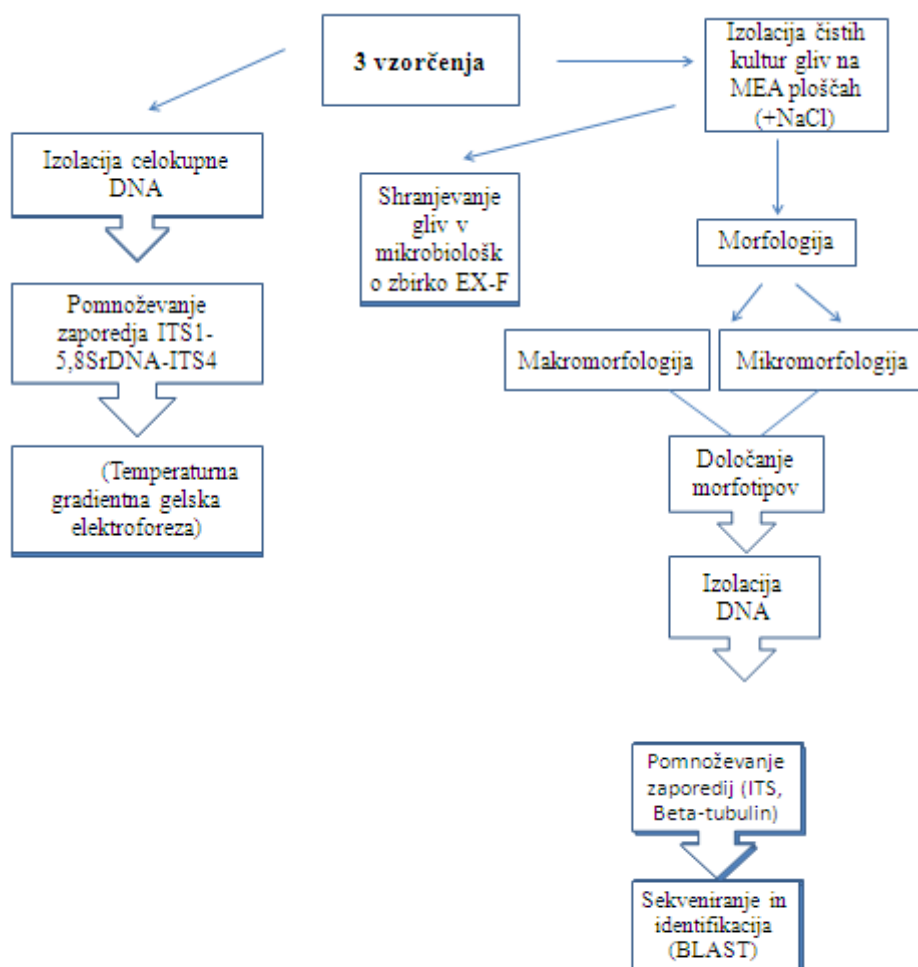
Na podlagi ugotavljanja zaporedja različnih odsekov DNK ali RNK lahko ob primerjavi zaporedja baz točno določenih delov DNK ali RNK določamo identiteto posameznih sevov.

V mikologiji uporabljamo na filogenetskem nivoju ribosomske gene oz. različne dele kodirajočih in nekodirajočih delov ribosomske DNK. Analiziramo sekvence 18S rRNK, 28S rRNK ter 5S rRNK.

Za identifikacijo na nivoju vrste pa določamo zaporedje medgenskih distančnikov ITS 1 in ITS 2 (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

3 MATERIALI IN METODE

Izhajajoč iz postavljenega namena diplomske naloge je bil oblikovan plan poskusov in vzorčenj, kot jih predstavlja slika 2. Po posvetu z mentorico smo določili materiale in metode. Nekateri od njih smo modificirali, da so ustrezali specifičnemu okolju sečoveljskih solin.



Slika 2: Hodogram poteka dela

3.1 MATERIALI

V diplomskem delu smo uporabili sledeče materiale.

3.1.2 Začetni oligonukleotidi

Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri PCR in vgnezdni PCR

Začetni oligonukleotidi	Nukleotidno zaporedje 5'-3'
ITS 1F (Gad) Gardes in Bruns, 1993.	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A
ITS 4 (Whi) White in sod., 1990.	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
ITS 3 GC May, Smiley in Schmidt, 2001.	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CGC ATC GAT GAA GAA CGC AGC
Bt2a Glass, N.L., in Donaldson, G.C. 1995.	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC
Bt2b Glass, N.L., in Donaldson, G.C. 1995.	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC

3.1.3 Kemikalije

40% akrilamid/Bis

Agar

Agaroz

APS

Brom timol modro

BSA (20 mg/ml)

Celit

CTAB

CuSO₄

dNTP

EDTA-Kompleksal III

Glicerol

Glukoza

KH₂PO₄

K₂HPO₄

Kloramfenikol (0,05 g/L)

Ksilen cianol

Malt extract

MgSO₄×7H₂O

Bio-Rad, ZDA

Carl Roth GmbH, Nemčija

Sigma, ZDA

Sigma, ZDA

Riedel de Haen Ag, Nemčija

Fermentas, Litva

Merck, Nemčija

Sigma, ZDA

Merck, Nemčija

Fermentas, Litva

Kemika, Hrvaška

Carlo Erba, Italija

Kemika, Hrvaška

Merck

Merck

Sigma, ZDA

Serva, ZDA

Biolife, Italija

Acros Organics, ZDA

MgCl ₂	Fermentas, Litva
NaCl	Merck, Nemčija
Ocetna kislina	Carl Roth GmbH, Nemčija
PCR pufer	Fermentas, Litva
Mesni pepton	Merck, Nemčija
Silikagel	Merck, Nemčija
Taq polimeraza	Fermentas, Litva
TEMED	Sigma, ZDA
Tris Ultrol grade	Calbiochem, Nemčija
Tween 80	Biolife, Italija
Urea	Merck, Nemčija
Želatina	Biolife, Italija

3.1.4 Aparature

- Aparatura za PCR (Mastercycler), Eppendorf, Nemčija
- Aparatura za sušenje DNK, MiVac, Genevac, Ltd, Anglija
- Avtomatske pipete, Eppendorf, Nemčija
- Avtoklav Kambič A-63c, Semič, Slovenija
- Centrifuga 5810 R, Eppendorf, Nemčija
- Digitalna kamera DP12, Olympus, Japonska
- Elektroforeza 2301Macrodrive 1, LKB Bromma, Švedska
- Stresalnik MM301, Retsch, Nemčija
- UV/VIS Spectrometer, Perkin Elmer, Kanada
- pH meter Metrohm 713, Tehnica, Slovenija
- Laminarij IBK 1V2, Iskra, Slovenija
- Magnetno mešalo, Rotamix 550 MMH, Tehnica, Železniki, Slovenija
- Mikroskop Olympus BX51, Olympus, Japonska
- Mikrovalovna pečica, Gorenje, Slovenija
- Stresalnik Belly Dancer, Stovall Life Science Inc., ZDA
- Tehnica SBA 53, Scaltec, Nemčija
- Tehnica Železniki ET-1111, Železniki, Slovenija
- Tehnica PGB1200-2, KERN, Nemčija
- TTGE aparat Bio-Rad D code, Bio-Rad, ZDA
- TTGE napajalnik Power pac basic, Bio-Rad, ZDA
- Vodna kopel, Memmert, Nemčija
- Vrtinčasto mešalo, Železniki, Slovenija

3.1.5 Gojišča

Sestavine za gojišča smo raztopili v destilirani vodi. Pred dodatkom agarja smo umerili pH, če je to bilo potrebno. Gojišča smo avtoklavirali pri 121 °C za 15 minut. Trdna gojišča smo po ohladi na 55 °C aseptično razlili v sterilne plastične petrijevke. Do uporabe smo jih shranjevali v hladni komori na 4 °C.

3.1.5.1 Trdno gojišče MEA (agar s sladnim ekstraktom–*Malt extract agar*) (Raper in Thom, 1949)

Glukoza	10 g
Pepton	1 g
Sladni ekstrakt	20 g
Agar	20 g
dH ₂ O	do 1000 mL

3.1.5.2 Trdno gojišče MEA (agar s sladnim ekstraktom–*Malt extract agar*) z dodatkom NaCl (Raper in Thom, 1949)

Postopek priprave trdnega gojišče MEA z dodatkom NaCl z ustreznimi antibiotiki je enak postopku priprave trdnega gojišča MEA, le da smo gojišču dodali NaCl in po avtoklaviranju gojišču dodali ustrezno količino določenega antibiotika. Delovne koncentracije uporabljenih antibiotikov v LB gojišču:

Ampicilin	[Amp]	50 µg/mL
Kloramfenikol	[Cm]	0,05 g/L
Natrijev Klorid	[NaCl]	50 g/L

3.1.5.3 Tekoče gojišče za izolacijo DNK (Raper in sod., 1972)

Glukoza	10,0 g
Pepton	2,0 g
Kvasni ekstrakt	2,0 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,46 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
dH ₂ O	do 1000 mL

3.1.6 Raztopine

3.1.6.1 TAE pufer (50×) (Sambrook in sod., 1989)

Tris baza	242,0 g
Ocetna kislina, ledena	57,1 g
0.5 M EDTA, pH 8.0	100,0 mL
dH ₂ O	do 1000 mL

3.1.6.2 SSS raztopina (Spore Suspension Solution) (Van den Ende in de Hoog, 1999)

Tween 80	0,05 g
Agar	0,05 g
dH ₂ O	do 100 mL

Avtoklaviramo v epruvetah (2 mL).

3.1.6.3 10 % amonijev persulfat (Sambrook in sod., 1989)

Amonijev persulfat	0,1 g
dH ₂ O	do 1,0 mL

Hranimo pri -20 ° C največ en teden.

3.1.6.4 2× nanašalni pufer (Sambrook in sod., 1989)

Bromfenol modro	0,25 mL
Ksilen cianol	0,25 mL
Glicerol	7,0 mL
dH ₂ O	2,5 mL

Hranimo pri sobni temperaturi.

3.1.6.5 Zmes silikagela in celita (Van den Ende in de Hoog, 1999)

Silikagel	30 g
Celit 545	15 g

Zmes pripravimo v laminariju in avtoklaviramo.

3.1.6.6 Pufer CTAB (Sambrook in sod., 1989)

Trizma	2,42 g
NaCl	8,2 g
NaEDTA	0,74 g
CTAB	2,0 g
ddH ₂ O	do 100 mL

Umerimo pH na 7,5.

3.1.6.7 Fiziološka raztopina (Sambrook in sod., 1989)

NaCl	8,5 g
dH ₂ O	do 1000 mL

Prelijemo v infuzijske stekleničke in avtoklaviramo.

3.1.7 Geli za analizo DNK

3.1.7.1 PAA gel za TTGE (Sambrook in sod., 1989)

Urea	14,4 g
Akrilamid/bis	6,0 mL
50×TAE	0,75 mL
TEMED	30 µL
10% amonijev persulfat	300 µL
dH ₂ O	do 30 mL

3.1.7.2 10 1% agarozni gel (Sambrook in sod., 1989)

Agaroz	1,0 g
1×TAE	100 mL

Segrevamo v mikrovalovni pečici.

3.1.8 Laboratorijski pribor

Pri raziskovalnem delu smo uporabili naslednji laboratorijski pribor:

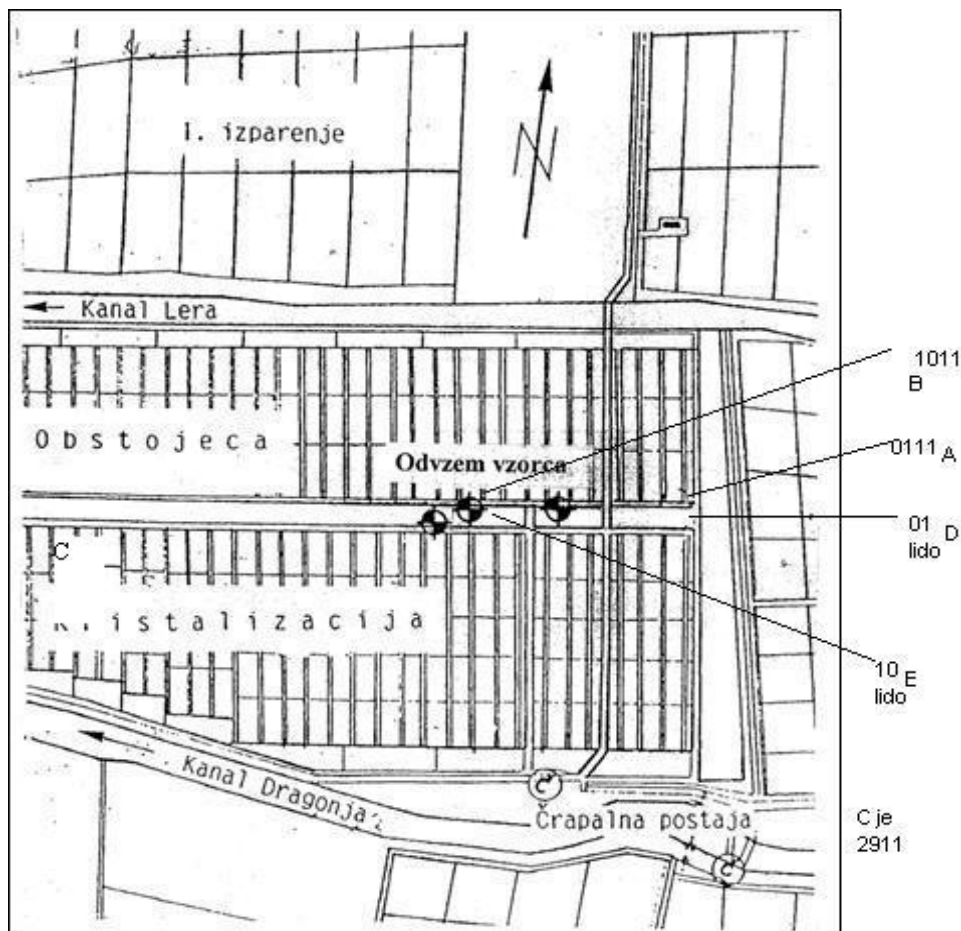
- cepilne zanke,
- igle in brizge,
- laboratorijsko steklovino (erlenmajerice, čaše, infuzijske steklenice, epruvete, pipete, steklo za TTGE, krovna, objektna stekelca),
- laboratorijske rokavice,
- nastavke za avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija),
- mikrocentrifugirke (Eppendorf, Nemčija) (200 μ L, 1500 μ L in 2000 μ L),
- pincete in lancete
- plastične petrijevke (Golias, Slovenija) ($\Phi=70$, 90 mm),
- plastične slamice,
- polavtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija) (2–20 μ L, 10–100 μ L in 100–1000 μ L).

3.2 METODE

Uporabili smo različne metode, primerne za slano okolje in delo z glivami.

3.2.1 Vzorčenje

Vzorčna mesta so podana na sliki (Slika 3).



Slika 3: Vzorčna mesta

Prvo vzorčenje je potekalo pred začetkom sezone pobiranja soli, in sicer v začetku junija 2008. Drugo je bilo predvideno med sezono oz. med viškom pobiranja soli. Zaradi dežja viška sezone ni bilo in smo drugo vzorčenje opravili šele v začetku septembra, tj. po treh tednih odsotnosti dežja. Zadnje vzorčenje je bilo konec januarja leta 2009.

Vzorke smo odvzeli iz vdolbin ob robu treh delujočih solnih polj (bužet), kjer je slanost višja, in iz dveh kanalov (lidov), kjer je slanost nižja. Pri oznakah vzorčnih mest smo uporabili dvojno označevanje, kot je razvidno iz slike (Slika 3). Vzorčno mesto A je označeno pod zaporedno številko 0111 na Sliki 3, B pod 1011, C pod 2911, D pod 01 in E

pod 10 (Slika 2). Številke nam je za lažje prepoznavanje mest posredoval g. Čendak. P predstavlja poslužnico in L lido. Pri vsakemu vzorčenju smo izmerili temperaturo in slanost z Baumejevim aerometrom (Gunde-Cimerman in sod., 2000; nekoliko prilagojeno).

3.2.2 Prvotna izolacija gliv iz solinskega blata

V 0,5-litrskih erlenmajericah smo pripravili 200 mL gojišča MEA. Za vsako izmed vzorčnih mest smo pripravili po dve seriji gojišč (MEA 5 % NaCl in MEA 10 % NaCl). Po avtoklaviranju smo sterilno dodali 10 g blata in antibiotik kloramfenikol, resuspendirali z magnetnim mešalom in razlili na plošče (Gunde-Cimerman in sod., 2001; nekoliko prilagojeno).

Polovico pripravljenih plošč (4) smo dali na sobne (aerobne) pogoje in polovico (4) na mikroaerofilne pogoje. Za mikroaerofilne pogoje smo dali plošče v anaerobni lonec in prižgali svečo ter lonec zatesnili. Plošče smo pustili na teh pogojih za štiri tedne.

3.2.3 Gojenje gliv do čistih kultur na gojiščih MEA (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

Po štetju kultur na trdemu gojišču MEA smo izbrane kulture v laminariju precepljali na čiste plošče s fino pinceto (če kulture niso bile sporulirajoče) ali z lanceto (za sporulirajoče kulture). Z lanceto smo iz dela gojišča, kjer ni bilo rasti, izrezali košček, se dotaknili ene kolonije in nacepili v ravni črti po površini gojišča MEA, dokler nismo izolirali čistih kultur.

3.2.4 Morfološke analize

Morfološko smo seve opisali na makroskopskem in mikroskopskem nivoju.

3.2.4.1 Makromorfološki opis

Čiste kulture smo nacepili na sredino gojišča MEA in inkubirali pri sobnih pogojih (Samson, 1974, prilagojeno). Po 10 dneh smo opisali rob, barvo, izgled, premer in reverz kolonije ter opazovali produkcijo eksodatov. Na podlagi teh značilnosti smo seve združili v makromorfološko podobne skupine.

3.2.4.2 Mikromorfološki opis

Del sporulirajočega micelija smo prenesli na objektno stekelce, na katerega smo pred tem kapnili vodo. Rodove *Aspergillus* in *Penicillium* smo spirali s 70% etanolom. Vse vzorčke smo fiksirali z mlečno kislino in prekrili s krovnim stekelcem. Ob prisotnosti zračnih mehurčkov smo preparat rahlo potegnili preko plamena. Preparate smo opazovali pod mikroskopom Olympus BX51 in fotografirali s kamero Olympus DP15 (Humber, 1998).

3.2.5 Molekularno-genetske taksonomske analize

Sevom, ki smo jih na podlagi morfoloških značilnosti prepoznali kot *Penicillium* in *Aspergillus* (*Eurotium*), smo pomnožili β -tubulinsko regijo z verižno reakcijo s polimerazo z začetnimi nukleotidi Bt2a in Bt2b.

Ostalim izbranim sevom smo pomnožili del regije ITS1-5,8S rRNA-ITS2. Vsa dobljena zaporedja smo sekvencirali (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

3.1.5.1 Gojenje mirujoče kulture in izolacija genomske DNK

DNK smo izolirali po protokolu Gerrits van den Ende in de Hoog (1999). Dva tedna stare kulture smo precepili iz gojišča MEA v 4 mL tekočega gojišča za izolacijo DNK v epruveti. Po štirih dnevih inkubacije na sobni temperaturi smo s sterilno cepilno zanko prenesli micelij s površine tekočega gojišča v mikrocentrifugirko (2 mL) s 500 μ L pufra CTAB, 0,5 g mešanice celita in silikagela ter sterilno jekleno šibro. Micelij smo homogenizirali s homogenizatorjem eno minuto pri frekvenci 30 tresljajev na sekundo. Homogeniziran micelij smo inkubirali 30 minut v vodni kopeli pri 65 °C in nato centrifugirali pet minut pri 14000 obr/min. Supernatant smo odpipetirali v novo mikrocentrifugirko, dodali 500 μ L kloroforma, vorteksirali 1–2 sekundi in ponovno centrifugirali 5 minut pri 14000 obr/min. Vodno (zgornjo) fazo smo prenesli v sterilno mikrocentrifugirko, ponovno dodali 500 μ L kloroforma, vorteksirali in centrifugirali pri istih pogojih. Vodno fazo smo prenesli v čisto mikrocentrifugirko, ki smo ji dodali 2-kraten volumen ohlajenega 96% etanola (–20 °C). Zmes vodne faze in etanola smo inkubirali čez noč na –20 °C.

Po inkubaciji smo zmes centrifugirali pet minut pri 14000 obr/min in pazljivo odstranili supernatant. Usedlino smo sprali s 500 μ L 70% etanola, centrifugirali pet minut pri 14000 obr/min in pazljivo odstranili etanol. DNK smo posušili na zraku, nato pa raztopili v 50 μ L bidestilirane vode.

3.2.5.2 Verižna reakcija s polimerazo

Za identifikacijo izbranih sevov smo pomnoževali zaporedje ITS1-5,8S rRNA-ITS4. Uporabili smo nukleotidna začetnika ITS1 in ITS4 (White in sod., 1990). Za identifikacijo

rodu *Cladosporium* do vrste smo pomnožili še aktinsko regijo z nukleotidnima začetnikoma ACT-512f in ACT-783 (Carbone in Kohn, 1999).

Rodovom *Penicillium* in *Aspergillus* oz. telemorfni obliki *Eurotium*, smo pomnožili β -tubulinsko regijo z začetnikoma Bt2a in Bt2b (Glass in Donaldson, 1995).

Pomnoževanje zaporedja ITS1-5,8S rRNA-ITS4 z verižno reakcijo s polimerazo:

1 μ L DNK izolirane iz solinskega blata
 po 1,25 μ L začetnih oligonukleotidov ITS1 in ITS4 (10 μ M)
 0,5 μ L dNTP (10 mM)
 2,5 μ L $MgCl_2$ (25 mM)
 0,15 μ L Taq F DNK-polimeraze (5 U/ μ L)
 2,5 μ L 10 $\times$ Pufer
15,85 μ L ddH₂O
 25 μ L

Program za reakcijo:

začetna denaturacija	94 °C	1 min	} 30 ciklov
	94 °C	35 s	
	55 °C	53 s	
	72 °C	30 s *	
zaključno podaljševanje	72 °C	10 min	} *vsak cikel 5 s daljše podaljševanje
shranjevanje produkta do uporabe	10 °C	∞	

Pomnoževanje β -tubulinske regije z Bt2a in Bt2b začetnikoma

1 μ L DNK izolirane iz solinskega blata
 po 0,5 μ L začetnih oligonukleotidov Bt2a in Bt2b (10 μ M)
 0,5 μ L dNTP (10 mM)
 0,1 μ L Taq F DNK-polimeraze (5 U/ μ L)
 2,5 μ L 10 $\times$ Pufer
19,9 μ L ddH₂O
 25 μ L

Program za reakcijo:

začetna denaturacija	94 °C	2 min	}
	94 °C	30 s	
	53 °C	30 s	
	72 °C	45 s	
zaključno podaljševanje	72 °C	5 min	}
	10 °C	∞	
shranjevanje produkta do uporabe			

35 ciklov

3.2.5.3 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozni gel smo uporabili za kontrolo velikosti, čistosti in izolacijo pridobljenih vzorcev DNK. Uporabili smo 1-odstotni agarozni gel, ki smo mu dodali barvilo SYBR green v končni koncentraciji 1×. Elektroforeza je tekla v 1× pufu TAE. Uporabili smo lestvico znanih velikosti fragmentov DNK 100 bp (Sambrook in sod., 1998).

3.2.5.4 Določanje in obdelava nukleotidnega zaporedja

Nukleotidno zaporedje pomnožka je določilo podjetje Macrogen (Seoul, J. Koreja) z DNK sekvenatorjem 3730xl, ki temelji na Sangerjevi metodi in kapilarni elektroforezi (Sanger in sod., 1977).

3.2.5.5 Izolacija celokupne DNK iz solinskega blata

Za izolacijo DNK iz solinskega blata smo uporabili kit MO BIO UltraClean DNK (MO BIO) po navodilih proizvajalca za izolacijo DNK po Alternativnem protokolu za maksimalni izkoristek (MoBio Laboratories Inc., Solana Beach, California).

3.2.5.5.1 Verižna reakcija s polimerazo (vgnezdena PCR)

Vgnezdeno PCR metodo smo uporabili za pomnoževanje ITS regije in 5,8S rRNK. V prvi reakciji smo uporabili ITS 1 in ITS 4 oligonukleotidna začetnika, da bi pomnožili ITS1-5,8S rRNK-ITS4 regijo. V drugi PCR reakciji smo 1 µL PCR pomnožka prve reakcije dodali ITS 3 in ITS4 začetnika, da bi pomnožili ITS 2 regijo (May in sod., 2001).

1. Pomnoževanje zaporedja ITS1-5,8S rRNK-ITS4 z verižno reakcijo s polimerazo:

1 µL DNK izolirane iz solinskega blata
 po 1,25 µL začetnih oligonukleotidov ITS1 in ITS4 (10 mM)
 0,5 µL dNTP (10 mM)
 2,5 µL MgCl₂ (25 mM)
 0,15 µL Taq F DNK-polimeraze (5 U/µL)
 2,5 µL 10×Pufer
 15,85 µL ddH₂O
 25 µL

2. Pomnoževanje zaporedja ITS 2 z verižno reakcijo s polimerazo:

1 μL PCR reakcije dobljene v prvi verižni reakciji s polimerazo
 po 0,5 μL začetnih oligonukleotidov ITS3 in ITS4 (10 mM)
 2 μL dNTP (10 mM)
 2,5 μL MgCl_2 (25 mM)
 5U/ μL Taq F DNK-polimeraze
 2,5 μL 10 $\times$ Pufer
15,85 μL ddH₂O
 25 μL

Program za reakcijo:

začetna denaturacija	94 °C	1 min	} 35 ciklov
	94 °C	35 s	
	55 °C	53 s	
	72 °C	30 s *	
zaključno podaljševanje	72 °C	10 min	} *vsak cikel 5 s daljše podaljševanje
shranjevanje produkta do uporabe	10 °C	∞	

3.2.5.5.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza (TTGE)

Poliakrilamidno gelsko elektroforezo (TTGE) smo uporabili za ločevanje manjših fragmentov DNK (Muyzer in Smalla, 1998).

Ureo smo zatehtali in raztopili v 23 ml destilirane vode, dodali 6 ml akrilamid/bis raztopine in 0,75 ml 50X TAE ter mešanico degazirali. Nazadnje smo dodali 30 μL TEMED in 300 μL 10% amonijevega persulfata, premešali in gel hitro vlili med stekleni plošči.

Gel smo pustili polimerizirati približno tri ure. Nato smo ga vpeli v nosilec ter prenesli v 1,25X pufer, ki ga je bilo predhodno treba segreti na delovno temperaturo 54 °C. Na sredino gela smo dodali 5 μL markerja λ /pst (0,5 U/ μL). Prvo luknjico smo spustili, v vse ostale pa smo dodali 25 μL vzorca in nanašalni pufer v končnem volumnu 50 μL (2 $\times$ nanašalni pufer).

Program za TTGE:

Razpon temperatur:	52 °C – 68 °C
Napetost:	20 V (prvih 15 minut), nato na 100 V
Hitrost spreminjanja temperature:	0,9 °C/h

Po končani elektroforezi smo gel vzeli iz nosilca, označili kje je vrh, in razbarvali z barvilom Syber safe, 10 minut na stresalniku Belly Dancer. Postopek smo ponovili z destilirano vodo in gel poslikali s sistemom za obdelavo slike Gene snap.

3.2.5.5.3 Analiza gela

TTGE gele smo analizirali s programsko opremo BioNumerics (MathLab, ZDA). Z istim programom smo narisali kladograme na podlagi izračunanega Jaccardovega koeficienta podobnosti. Le-ta upošteva prisotnost ali odsotnost posameznih fragmentov v vrsticah v gelu (Lapanje, 2005).

4 REZULTATI

Celotno raziskovalno delo je potekalo od junija 2008 do februarja 2010. Vzorčenje je potekalo na petih lokacijah v eni sezoni in enkrat izven sezone, na istih lokacijah. Na vsaki lokaciji smo odvzeli en vzorec, ki je bil analiziran na prisotnost halofilnih gliv. Laboratorijsko delo, ki je sledilo, je potekalo na determinaciji s klasičnimi in tudi z molekularnimi metodami neposredno po odvzemanju vzorcev in se je zaključilo v februarju 2010.

4.1 VZORČENJE

Preglednica 7: Temperatura in slanost vzorčnih mest

Vzorčenje	Vzorčno mesto	Temperatura [°C]	Slanost [°Be]
Junij 2008	A	24,0 °C	7,4 °Be
	B	24,0 °C	7,9 °Be
	C	24,0 °C	3,4 °Be
	D	23,5 °C	6,8 °Be
	E	23,0 °C	5,9 °Be
September 2008	A	22,5 °C	27,3 °Be
	B	22,5 °C	25,9 °Be
	C	20,0 °C	17,5 °Be
	D	21,0 °C	24,1 °Be
	E	21,0 °C	17,3 °Be
Januar 2009	A	8,5 °C	4,0 °Be
	B	8,5 °C	4,0 °Be
	C	9,0 °C	3,2 °Be
	D	7,0 °C	2,0 °Be
	E	7,0 °C	3,0 °Be

4.2 IZOLACIJA GLIV

Po štiri tedenski inkubaciji smo opravili štetje kultur na trdnem gojišču MEA (preglednica 8). Izbrane glive smo precepljali iz gojišč z dodano soljo na gojišča MEA brez dodane soli, dokler nismo izolirali čistih kultur. Te smo nato precepili na poševnike. Vse izolate smo shranili v mikrobiološko zbirko kultur EX-F Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Preglednica 8: Štetje kultur na ploščah MEA z dodanim 5 in 10 % NaCl. CFU je število kolonij na 10 g blata

	A+5%	A+10%	B+5%	B+10%	C+5%	C+10%	D+5%	D+10%	E+5%	E+10%
1. vzorčenje										
Aerobni pogoji	6	7	8	3	20	3	3	1	7	2
Mikroaerofilni	9	4	4	1	20	5	2	0	6	5
2. vzorčenje										
Aerobni pogoji	6	6	1	1	13	1	28	17	12	2
Mikroaerofilni	7	4	1	1	5	1	22	18	2	5
3. vzorčenje										
Aerobni pogoji	3	8	5	0	0	0	3	3	6	4
Mikroaerofilni	2	3	8	2	2	1	2	4	7	7

Preglednica 9: Skupni CFU in skupno število izolatov v zbirki EXF

	Skupaj CFU	Skupaj	Št. izolatov shranjenih v EXF
1. vzorčenje			
Aerobni pogoji	60		
Mikroaerofilni	56	116	45
2. vzorčenje			
Aerobni pogoji	87		
Mikroaerofilni	66	153	35
3. vzorčenje			
Aerobni pogoji	32		
Mikroaerofilni	38	70	33
		339	113

4.3 MAKROMORFOLOGIJA

Izolirane seve smo na podlagi makromorfoloških značilnosti uvrstili v različne morfološke skupine (morfotipe). Opazovali smo rob kolonije, barvo, izgled, premer, produkcijo eksudatov in reverz. Opisali smo najpogostejše prisotne morfološke skupine.

Preglednica 10: Morfološke skupine gliv in njihova pojavnost skozi vzorčno obdobje

	JUNIJ					SEPTEMBER					JANUAR				
Morfološke skupine	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
tip 1	+	+	+		+			+	+			+			
tip 2	+	+	+	+	+			+		+	+				+
tip 3	+	+				+		+				+			+
tip 4			+		+				+						
tip 5					+				+						
tip 6									+						+
tip 7									+		+				
tip 8		+							+						+
tip 9			+		+				+	+					
tip 10	+	+	+		+										
tip 11	+	+	+			+									
tip 12									+						
tip 13									+						
tip 14											+				
tip 15										+					
tip 16							+					+			
tip 17			+								+			+	+
tip 18									+	+	+				
tip 19						+									
tip 20			+												
tip 21											+				
tip 22				+											

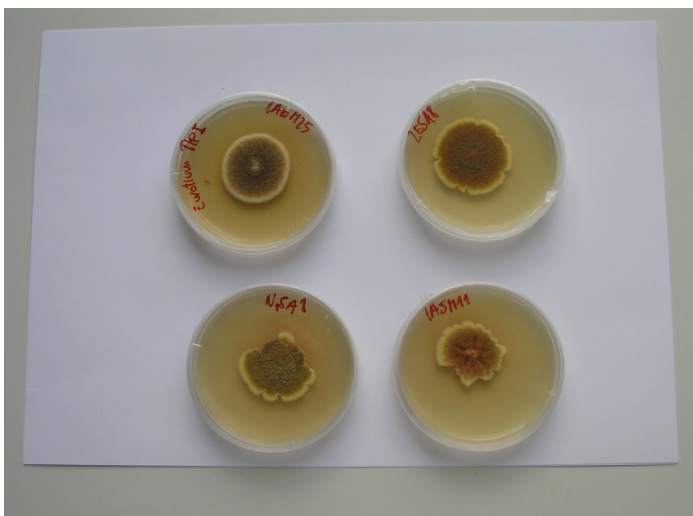
Iz preglednice 10 je razvidno, da so se morfološke skupine različno pojavljale. Določeni morfotipi, kot so morfotip 1, 2, 3, 8 in 17, so se pojavljali v vseh obdobjih vzorčenja; določeni samo pri prvemu vzorčenju, npr. morfotip 10, ali samo pri zadnjem (morfotip 14) ter določeni samo pri najvišji slanosti (morfotipa 13 in 14).

TIP 1

Okrogla kolonija, nepravilnega roba z rumeno oranžno barvo micelija. Reverz je barve gojišča, premer kolonije je 16–23 mm. Izgled kolonije je žametast.

Prole A. Združba gliv v zdravilnem blatu sečoveljskih solin.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2013



Slika 4: Morfortip 1

TIP 2

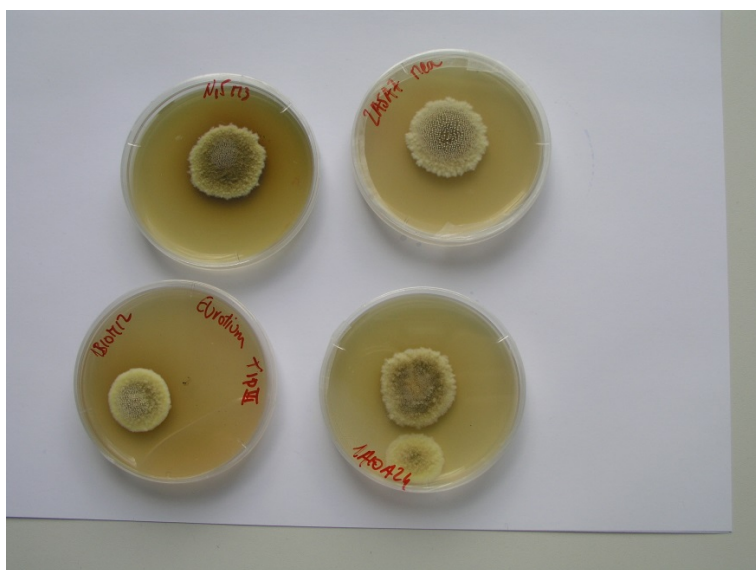
Kolonija nepravilnih oblik, nepravilnega roba, barva micelija je različna, zelena, rdeča in oranžna. Premer kolonije je 16–28 mm, eksudatov ni, reverz je barve gojišča.



Slika 5: Morfortip 2

TIP 3

Okrogla kolonija, nepravilnega roba, belozelena barva micelija. Premer kolonije je 15–17 mm, eksudatov ni, reverz je barve gojišča oz. rumen.

**Slika 6: Morfotip 3****TIP 4**

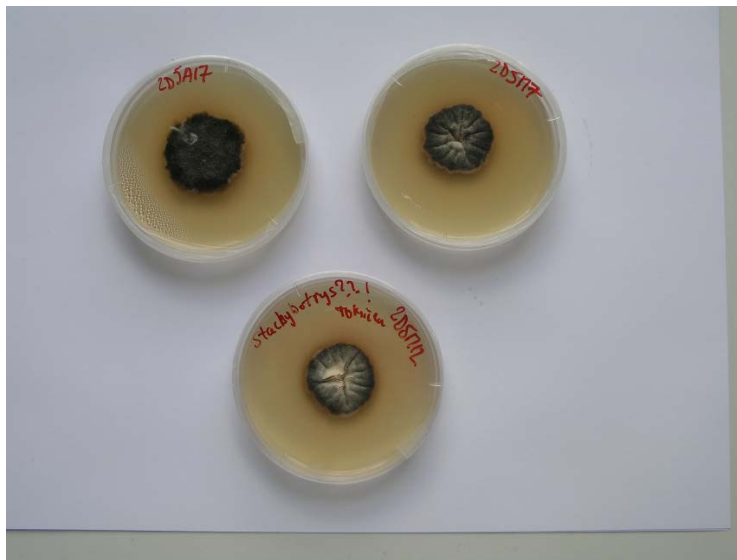
Okrogla kolonija, rumena barva micelija, premer 20 mm. Ne izloča eksudatov, reverz je barve gojišča.

TIP 5

Okrogla, popkasto izbočena kolonija z nepravilnim robom, bele barve micelija. Premer kolonije je 39 mm, prisoten je eksudat, reverz je rjave barve.

TIP 6

Okrogla kolonija, bel micelij, na robovih črn. Premer kolonije je 24–25 mm, ni eksudatov, reverz je črn.



Slika 7: Morfotip 6

TIP 7

Okrogla kolonija, nepravilnega roba in zažete rasti. Micelij je bele barve. Črn na robovih. Premer je 23 mm, eksudata ni, reverz je barve gojišča.

TIP 8

Kolonija nepravilne oblike, bele barve micelija. Premer kolonije je od 23 mm do prerasti celotne plošče. Eksudata ni, reverz je črn.

TIP 9

Kolonija nepravilne oblike, bele roza barve micelija in puhastega izgleda. Premer je 18–46 mm, brez eksudata, reverz je bel ali barve gojišča.

Prole A. Združba gliv v zdravilnem blatu sečoveljskih solin.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2013



Slika 8: Morfotip 8

TIP 10

Kolonija nepravilne oblike, belo oker barve micelija, puhastega izgleda. Premer kolonije je od 18 mm do prerasti celotne plošče. Reverz je temno rjav, oranžen.

TIP 11

Rast kolonije čez celotno ploščo, belo siva barva micelija. Eksudat je prisoten, reverz je črne barve.



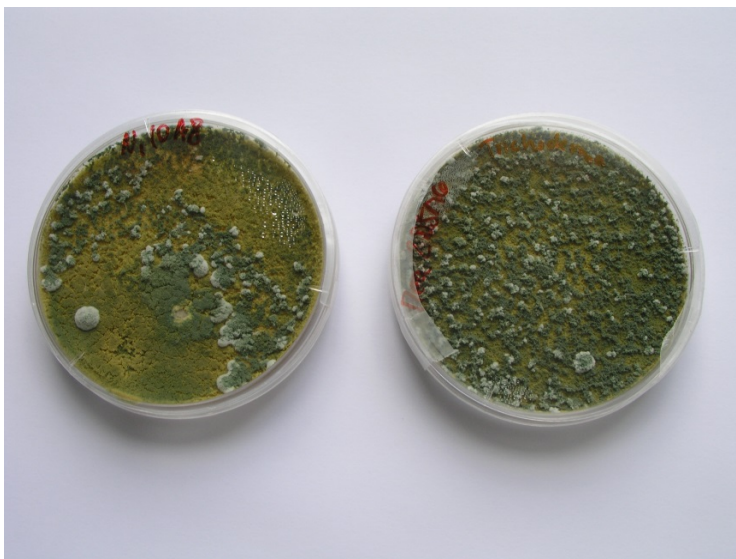
Slika 9: Morfotip 11

TIP 12

Okrogla kolonija z definiranim robom. Barva micelija je bela, premer kolonij je 17–28 mm. Eksudata ni, reverz je barve gojišča.

TIP 13

Prerast kolonije čez celotno ploščo. Barva micelija je zelena. Eksudat je prisoten, reverz je rumen.



Slika 10: Morfotip 13.

TIP 14

Kolonija puhastega izgleda, zelene barve micelija. Premer kolonije je 20 mm. Eksudata ni, reverz je bele barve.

TIP 15

Kolonija žametastega izgleda. Barva micelija je rumeno-oranžna. Premer kolonije je 19,5 mm, eksudata ni, reverz je rumen.

TIP 16

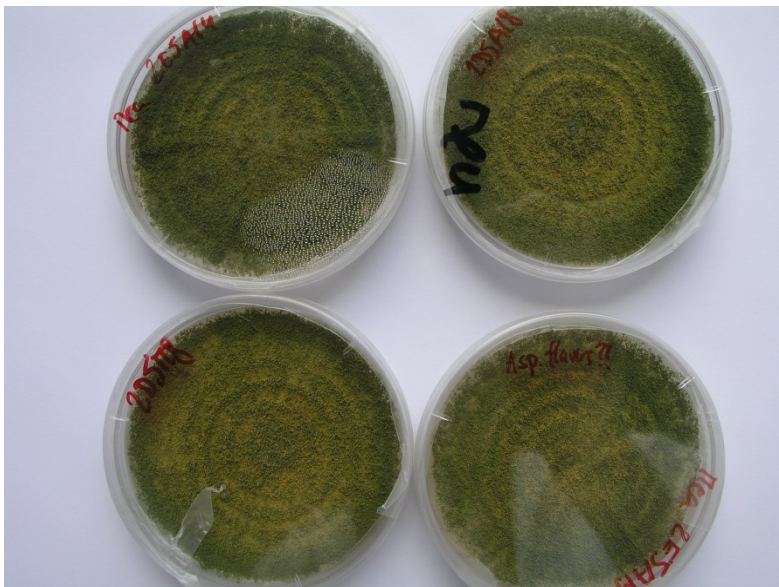
Kolonija nepravilne oblike. Barva micelija je zelena. Premer kolonije je 18,8 mm. Eksudata ni, reverz je črn.

TIP 17

Rob kolonije je zažet. Barva micelija je zelena, rdeča, ob robu rumena. Premer kolonij je 10–25 mm. Eksudata ni, reverz je od temnordeč do oranžen.

TIP 18

Prerast kolonij čez celo ploščo. Barva micelija je zelena, eksudata ni, reverz je bele barve.

**Slika 11: Morfotip 18****TIP 19**

Kolonija nepravilne oblike z definiranim robom. Barva micelija je oranžna, rast je zažeta. Premer kolonije je 39 mm, eksudata ni, reverz je temnorjave barve.

TIP 20

Kolonija nepravilne oblike, rumene barve micelija. Premer kolonije je 53 mm, eksudata ni, reverz je rumene barve.

TIP 21

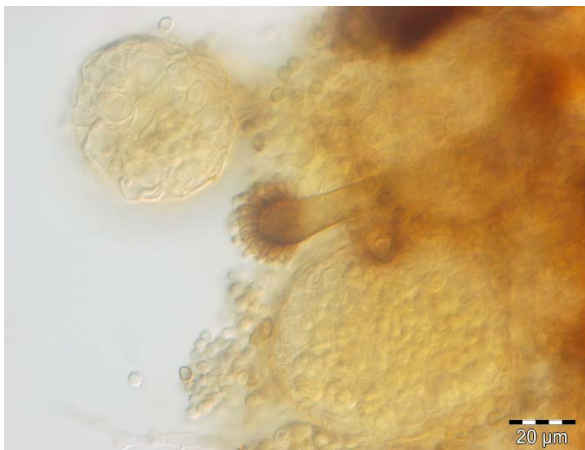
Kolonija nepravilne oblike z ravnim robom. Micelij je bele barve, ob robu rumen. Premer kolonije je 35 mm, eksudata ni, reverz je temnordeč.

TIP 22

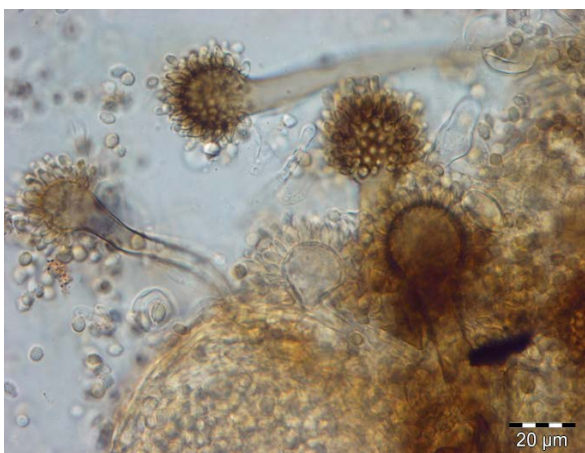
Prerast kolonije čez celo ploščo. Micelij je črne barve, hife so bele. Eksudata ni, reverz je črn.

4.4 MIKROMORFOLOGIJA

S pomočjo mikromorfologije smo želeli opisati določene strukture, ki so značilne za glive, ki prevladujejo v slanih okoljih. Predstavili bomo strukture, njihove velikosti in kateri vrsti oz. rodu pripadajo, v primeru, kjer smo to uspeli določiti.



Slika 12: Fotografija seva EX-F 5417 (*A. fumigatus*) pri povečavi 400x



Slika 13: Fotografija seva EX-F 5536 pri povečavi 400x

Opis: na obeh slikah se vidijo konidiofori z veziklom (premera 20 µm), fialide in konidiji. Na zgornji sliki vidimo tudi kleistotecij. Spolna oblika je za to vrsto redek pojav. Sev EX-F 5417 je bil molekularno identificiran kot *Aspergillus fumigatus*. Morfološko smo ga uvrstili v 2. morfortip, kakor tudi sev EX-F 5536.

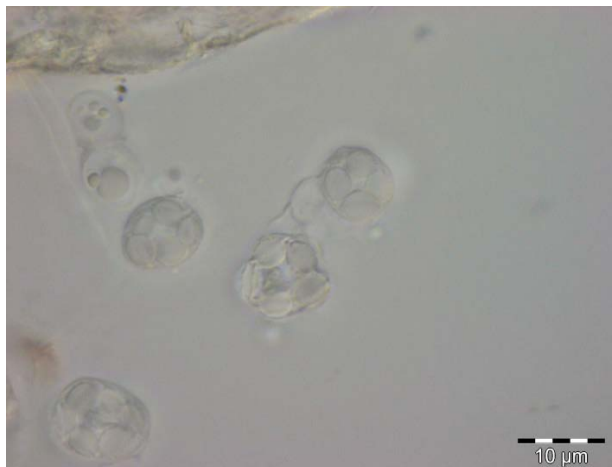


Slika 14: Fotografija seva EX-F 5471 pri povečavi 400x

Opis: na sliki so vidni konidiofori s končnim svežnjem fialid in konidiji. Ta sev je bil morfološko prepoznan kot *Stachybotrys*, kar smo tudi potrdili z molekularno identifikacijo sevov iz njegove morfoskupine.



Slika 15: Fotografija seva EX-F 5432 (*Aspergillus* sp.) pri povečavi 400x



Slika 16: Fotografija seva EX-F 5432 (*Aspergillus* sp.) pri povečavi 1000x

Opis: na zgornji sliki vidimo septiran konidiofor z veziklom, fialide in aske z askosporami, na spodnji sliki pa povečane aske. Sev EX-F 5432 je bil identificiran kot *Aspergillus* sp.

4.5 IDENTIFIKACIJA SEVOV

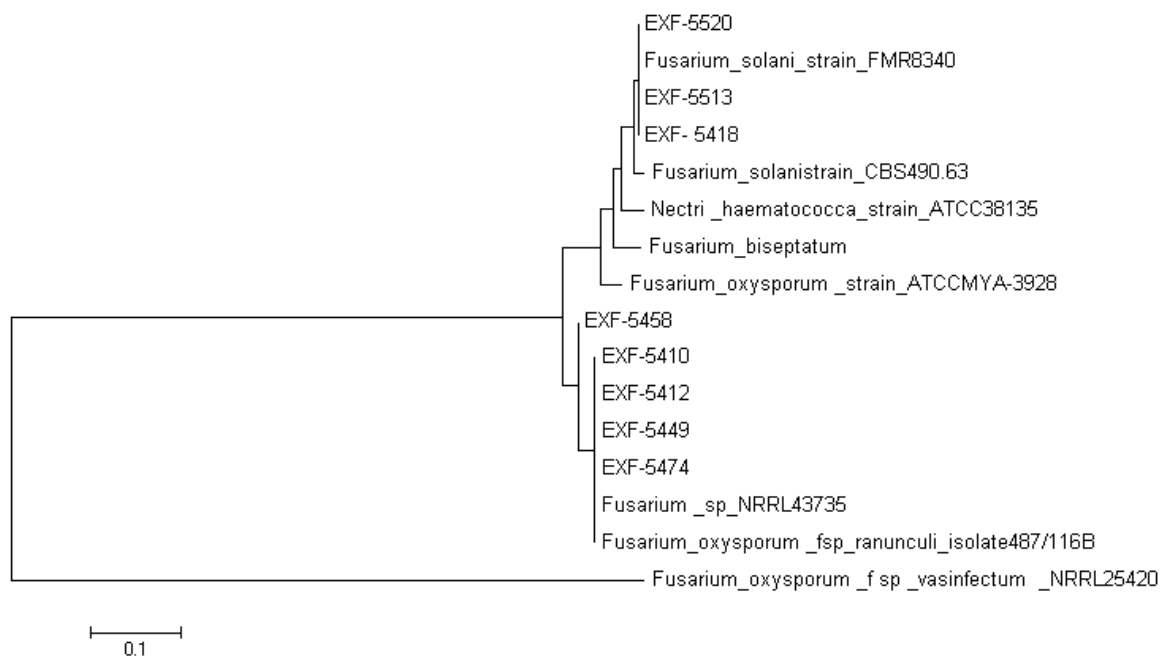
Na podlagi makromorfologije smo izbranim sevom z verižno reakcijo s polimerazo pomnožili del zaporedja ITS1-5,8S rRNA-ITS4, z oligonukleotidnima začetnikoma ITS1 in ITS4 (White in sod., 1990). Uspešno pomnožena zaporedja smo poslali na sekvenciranje.

Za vse izbrane seve nismo uspeli dobiti pomnoženega zaporedja. Pozitivna pomnožena zaporedja smo obdelali s pomočjo BLAST iskalnika v bazi podatkov GeneBank in le-ta primerjali z že znanimi zaporedji. V Preglednici 11 so predstavljeni prvi zadetki, % podobnosti s prvim zadetkom in E-vrednost.

Preglednica 11: Seznam izoliranih in identificiranih sevov na podlagi ITS zaporedij

EX-F	PRVI ZADETEK	PODOBNOST	E-VREDNOST
5410	<i>Fusarium oxysporum</i>	551/551 (100%)	0.0
5412	<i>Fusarium oxysporum</i>	369/370 (99%)	0.0
5414	<i>Penicillium</i> sp.	569/576 (99%)	0.0
5418	<i>Fusarium</i> sp.	321/321 (100%)	2,00E-166
5428	<i>Eurotium</i> sp.	510/510 (100%)	0.0
5447	<i>Emericellopsis</i> sp.	533/533 (100%)	0.0
5449	<i>Fusarium oxysporum</i>	402/402 (100%)	0.0
5458	<i>Fusarium</i> sp.	485/485 (100%)	0.0
5459	<i>Stachybotrys chartarum</i>	495/495 (100%)	0.0
5470	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	425/427 (99%)	0.0
5473	<i>Emericellopsis</i> sp.	525/525 (100%)	0.0
5474	<i>Fusarium oxysporum</i>	554/554 (100%)	0.0
5475	<i>Stachybotrys chartarum</i>	515/515 (100%)	0.0
5513	<i>Fusarium</i> sp.	501/503 (99%)	0.0
5520	<i>Fusarium solani</i>	497/499 (99%)	0.0
5527	<i>Aspergillus ruber</i>	559/559 (100%)	0.0
5442	<i>Humicola fuscoatra</i>	485/485 (100%)	0.0
5528	<i>Stachybotrys chartarum</i>	263/263 (100%)	3,00E-134

Najbolje zastopan rod je bil rod *Fusarium*, zato smo zanj izrisali filogenetsko drevo.

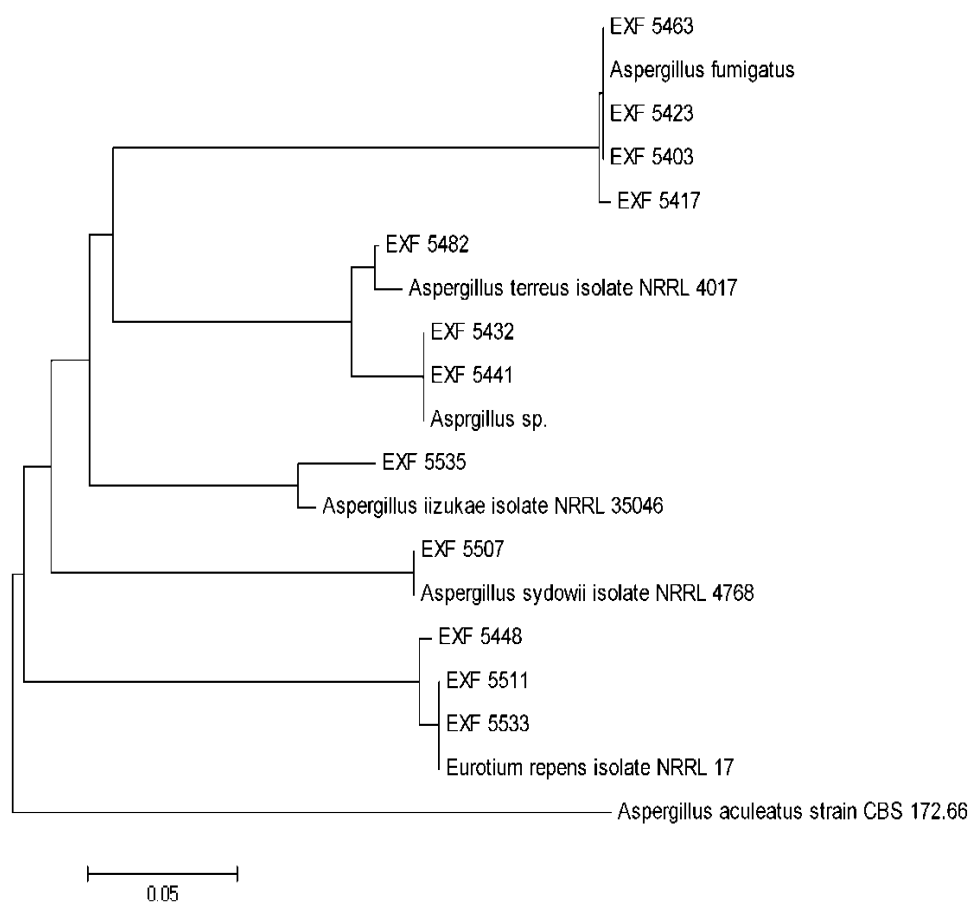


Slika 17: Filogenetsko drevo izbranih sevov rodu *Fusarium* izoliranih iz sečoveljskih solin in referenčnih sevov. Izrisano po metodi najbližjega soseda na podlagi ITS rDNA zaporedij

Za seve, ki smo jih makromorfološko prepoznali kot *Aspergillus/Eurotium* in *Penicillium*. (Preglednica 12 in slika 18), smo uporabili še oligonukleotidna začetnika Bt2a in Bt2b (Glass in Donaldson, 1995).

Preglednica 12: Seznam izoliranih sevov na podlagi beta-tubulinskih zaporedij

EX-F	PRVI ZADETEK	PODOBNOST	E-VREDNOST
5403	<i>Aspergillus fumigatus</i>	419/419 (100%)	0.0
5417	<i>Aspergillus fumigatus</i>	413/414 (99%)	0.0
5423	<i>Aspergillus fumigatus</i>	479/479 (100%)	0.0
5432	<i>Aspergillus</i> sp.	493/493 (100%)	0.0
5441	<i>Aspergillus</i> sp.	459/459 (100%)	0.0
5448	<i>Eurotium repens</i>	369/371 (99%)	0.0
5452	<i>Fusarium oxysporum</i>	276/276 (100%)	2,00E-141
5463	<i>Aspergillus fumigatus</i>	463/463 (100%)	0.0
5480	<i>Chaetomium megalocarpum</i>	265/286 (93%)	7,00E-111
5482	<i>Aspergillus terreus</i>	421/434 (97%)	0.0
5535	<i>Aspergillus iizukae</i>	448/481 (93%)	0
5507	<i>Aspergillus sydowii</i>	334/334 (100%)	1,00E-173
5511	<i>Eurotium repens</i>	387/387 (100%)	0.0
5533	<i>Eurotium repens</i>	257/257 (100%)	6,00E-131



Slika 18: Filogenetsko drevo izbora sevov *Aspergillus/Eurotium* in referenčnih sevov. Izrisano po metodi najbližjega soseda nukleotidnih zaporedij, ki kodirajo beta-tubulin.

Za identificiranje seve smo naredili skupno Preglednico 13. V njej smo predstavili identificirane seve in morfološke skupine katere predstavljajo, ter kdaj so bili izolirani.

Prole A. Združba gliv v zdravilnem blatu sečoveljskih solin.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2013

Preglednica 13: Seznam identificiranih sevov, njim pripadajočih morfoloških skupin in mesto ter čas vzorčenja.

OZNAKA SEVA	VRSTA	MORFOTIP	VZORČNO MESTO
	<i>Eurotium amstelodami</i> *	1	
EX-F 5403	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	D1
EX-F 5417	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	B1
EX-F 5423	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	C1
EX-F 5463	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	C2
EX-F 5448	<i>Eurotium repens</i>	3	C2
EX-F 5511	<i>Eurotium repens</i>	3	E3
EX-F 5533	<i>Eurotium repens</i>	3	E3
EX-F 5428	<i>Eurotium</i> sp.	4	C1
EX-F 5482	<i>Aspergillus terreus</i>	5	D2
EX-F 5459	<i>Stachybotrys chartarum</i>	6	D2
EX-F 5475	<i>Stachybotrys chartarum</i>	6	D2
EX-F 5528	<i>Stachybotrys chartarum</i>	6	E3
EX-F 5520	<i>Fusarium solani</i>	7	A3
EX-F 5418	<i>Fusarium</i> sp.	8	B1
EX-F 5428	<i>Fusarium</i> sp.	8	C1
EX-F 5458	<i>Fusarium</i> sp.	8	D2
EX-F 5513	<i>Fusarium</i> sp.	8	E3
EX-F 5452	<i>Fusarium oxysporum</i>	9	E2
EX-F 5410	<i>Fusarium oxysporum</i>	9	E1
EX-F 5412	<i>Fusarium oxysporum</i>	9	E1
EX-F 5449	<i>Fusarium oxysporum</i>	9	D2
EX-F 5474	<i>Fusarium oxysporum</i>	9	D2
	<i>Alternaria</i> sp.*	11	
EX-F 5432	<i>Aspergillus</i> sp.	10	A1
EX-F 5441	<i>Aspergillus</i> sp.	10	B1
EX-F 5447	<i>Emericellopsis</i> sp.	12	D2
EX-F 5473	<i>Emericellopsis</i> sp.	12	D2
EX-F 5470	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	13	D2
EX-F 5507	<i>Aspergillus sydowii</i>	14	A3
EX-F 5527	<i>Aspergillus ruber</i>	17	A3
	<i>Aspergillus flavus</i> *	18	
EX-F 5480	<i>Chaetomium megalocarpum</i>	19	A2
EX-F 5414	<i>Penicillium</i> sp.	20	C1
EX-F 5535	<i>Aspergillus iizukae</i>	21	E3
EX-F 5442	<i>Humicola fuscoatra</i>	22	D1

*vir: Tkavc in sod., 2012

Dr. Rok Tkavc je v doktorski disertaciji identificiral določene seve gliv iz blata (Tkavc, 2012). Iz njegovih podatkov izhaja taksonomska identifikacija še treh morfotipov. To so morfotip 1, ki je bil identificiran kot *Eurotium amstelodami*, morfotip 11 kot *Alternaria* sp. in morfotip 18 kot *Aspergillus flavus*. Poleg tega je identificiral še tri seve rodu *Aspergillus* in tri seve rodu *Eurotium*, kar samo potrdi dejstvo, da te vrste prevladujejo v blatu sečoveljskih solin.

Večina sevov, izoliranih iz vzorčenega blata, je pripadala rodu *Aspergillus* oziroma teleomorfni obliki *Eurotium*. Rod *Fusarium* je predstavljal tri različne morfotipe, tudi rod *Stachybotrys* je bil številčen. Najvišje število identificiranih sevov je bilo pridobljeno iz vzorčnega mesta D2, ki je imel najvišji CFU.

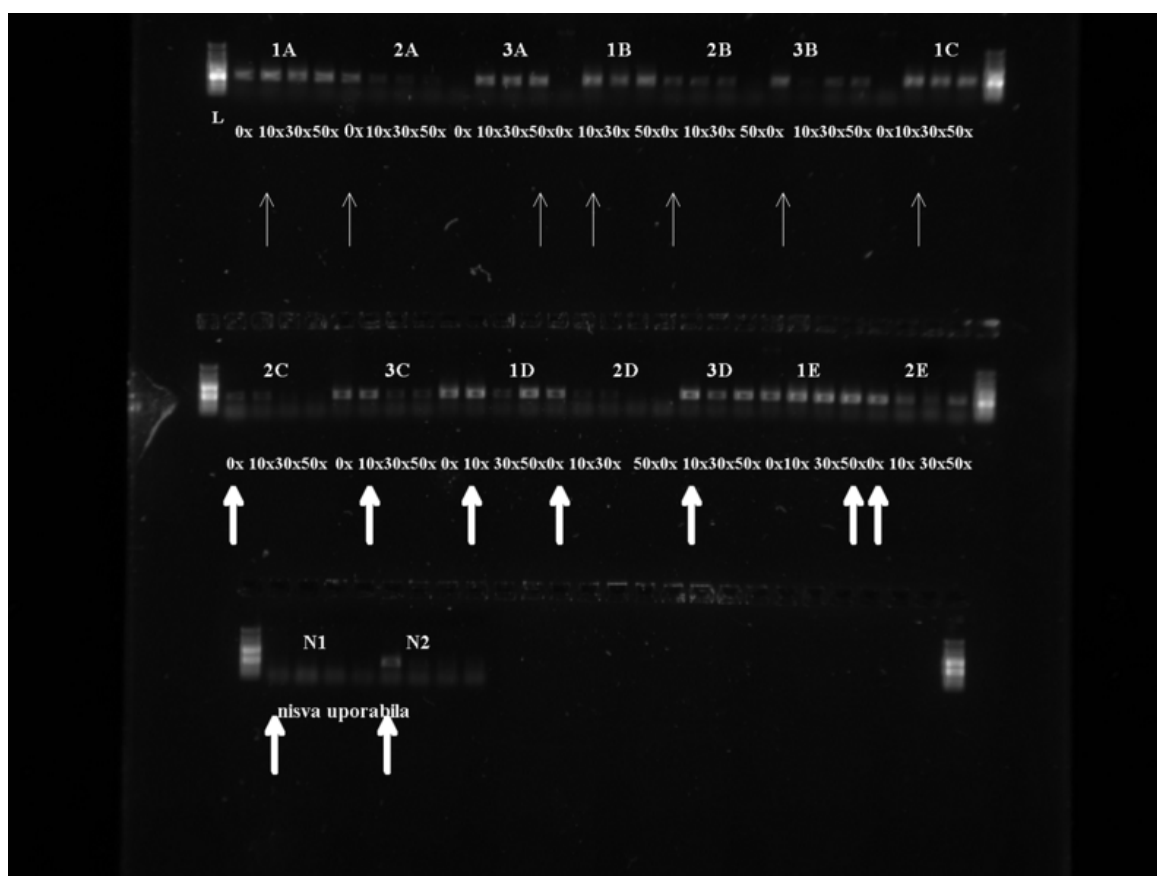
Molekularno smo identificirali 33 sevov, ki pripadajo 9 rodovom in 17 vrstam. Od tega je 10 sekvenc pripadalo rodu *Aspergillus*, 10 rodu *Fusarium*, 4 rodu *Eurotium*, 3 sekvence so pripadale rodu *Stachybotrys*, 2 sekvenci rodu *Emericellopsis* ter po 1 sekvenca rodovom *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Humicola*, in *Penicillium*. Najštevilčnejša vrsta je *Fusarium oxysporum* s 5 sekvencami, *Aspergillus fumigatus* in *Fusarium* sp. s po 4 sekvencami, *Stachybotrys chartarum* in *Eurotium repens* s po 3 ter *Emericellopsis* sp. in *Aspergillus* sp. s po 2 sekvencama.

Preglednica 14: Skupno število identificiranih sevov

ŠTEVILO VRST	VRSTA	ŠTEVILO IZOLATOV
1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	4
2	<i>Aspergillus</i> sp.	2
3	<i>Aspergillus terreus</i>	1
4	<i>Aspergillus sydowii</i>	1
5	<i>Aspergillus ruber</i>	1
6	<i>Aspergillus iizukae</i>	1
7	<i>Fusarium oxysporum</i>	5
8	<i>Fusarium</i> sp.	4
9	<i>Fusarium solani</i>	1
10	<i>Eurotium repens</i>	3
11	<i>Eurotium</i> sp.	1
12	<i>Stachybotrys chartarum</i>	3
13	<i>Emericellopsis</i> sp.	2
14	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	1
15	<i>Chaetomium megalocarpum</i>	1
16	<i>Penicillium</i> sp.	1
17	<i>Humicola fuscoatra</i>	1
		33

4.6 IZOLACIJA CELOKUPNE GLIVNE DNK IN NJENO POMNOŽEVANJE

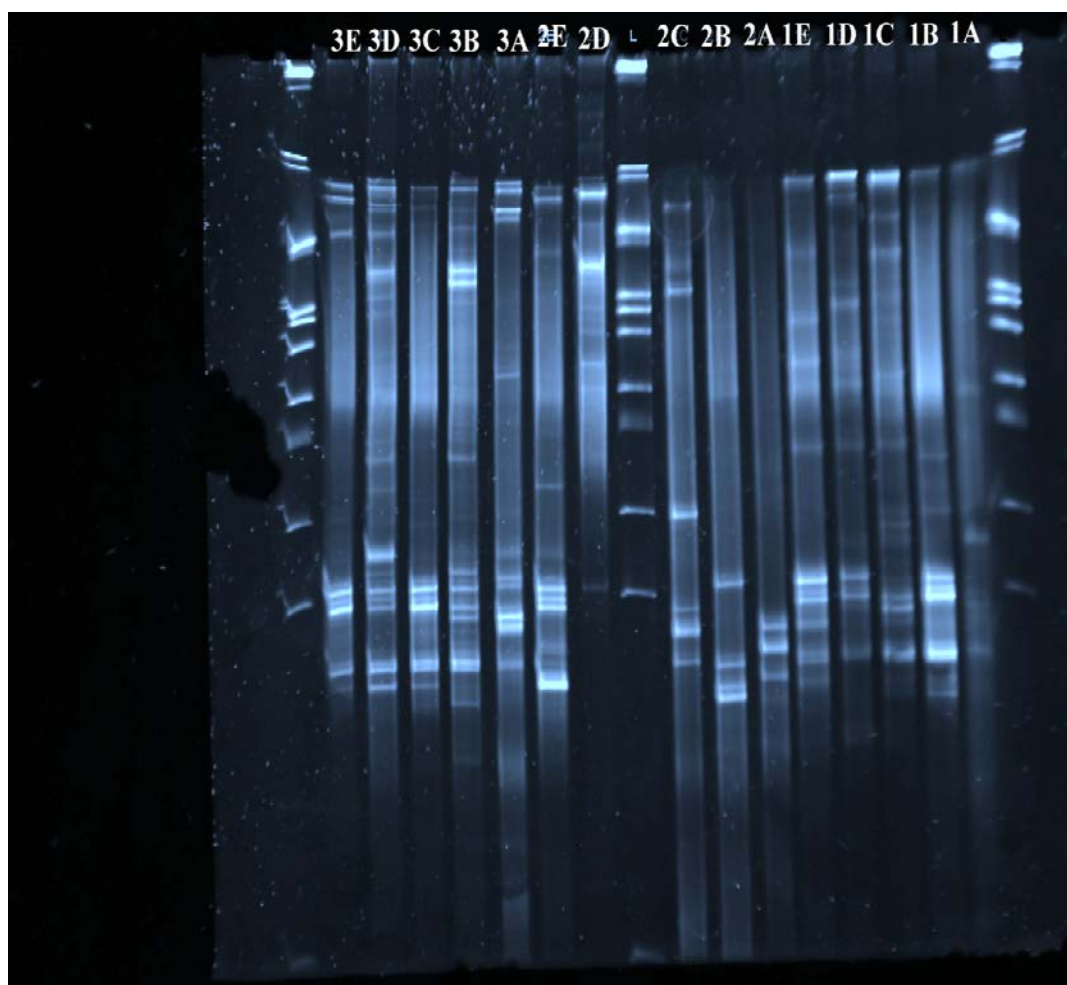
S pomočjo protokola za maksimalni izkoristek smo izolirali celokupno glivno DNK. Dobljeno DNK smo nato redčili 10-, 30- in 50-krat, da bi dobili najboljšo redčitev za PCR (Slika 19).



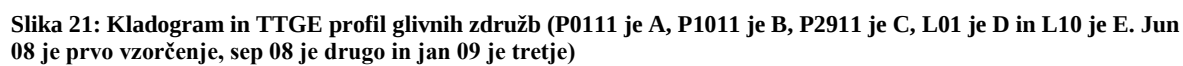
Slika 2: Redčitve DNK (s puščico so označene primernejše koncentracije celokupne DNK)

Ustrezne redčitve smo nato pomnožili z vgnezdno verižno reakcijo s polimerazo, da bi pridobili DNK za TTGE.

4.7 TTGE IN ANALIZA POLIAKRILAMIDNEGA GELA



Slika 20: TTGE gel profila glivnih združb (na sredini in ob robovih je marker λ /pst v koncentraciji 0,5U/ μ L. 1 je junij, 2 je september in 3 je januar)



Profil glivne združbe po posamičnih vzorčnih mestih smo primerjali z metodo TTGE, kot je opisano v poglavju Materiali in metode. Na istih vzorcih smo metodo ponovili v treh ponovitvah in dobili primerljive rezultate profilov.

Profili združb se med seboj razlikujejo, in sicer najbolj v odvisnosti od slanosti. Vsi profili z najvišjo slanostjo imajo specifične fragmente, ki se razlikujejo od drugih. Slanost je imelavečji vpliv na raznolikost profilov kot mesto vzorčenja.

Opazili smo skupne fragmente, ki so bili prisotni pri različnih vzorčnih mestih, tako pri lidih kot tudi pri poslužnicah.

5 RAZPRAVA

Naše rezultate smo primerjali s solinami, ki so izolirale glive iz blata. To sta soline v Portoriku in soline Ribandar v Indiji. Kot sem omenil že v uvodu se večina solin osredotoča na petolo.

5.1. VZORČENJE

Večina vzorčenj v sezonskih solinah se opravlja v treh serijah. Pred sezono pobiranja soli (začetek poletja), med sezono pobiranja (sredi poletja), ker sta takrat slanost in temperatura najvišji, in po koncu sezone (konec poletja). Glavnina vzorčenja je bila opravljena leta 2008.

Ker je bila sezona leta 2008 večkrat prekinjena z dežjem, ni prišlo do običajnega, izrazitega viška slanosti, zato smo eno vzorčenje opravili v septembru, po nekaj tednih brez dežja, ko je bila slanost primerna za pobiranje soli. Zadnje vzorčenje smo nato opravili sredi zime, da bi dobili vpogled v združbo, ko sta slanost in temperatura najnižji. Vzorčenja slanice so sicer v sečoveljskih solinah potekala enkrat na tri tedne, tj. med sezono pobiranja soli leta 1997 in enkrat na mesec skozi celotno leto 1999 (Gunde-Cimerman in sod., 2000 in Butinar in sod., 2005a). V večini drugih člankov, ki obravnavajo mikrobiologijo solin, so raziskovalci vzorčili predvsem slanico, malo pa je objav o vzorčenju sedimentov.

Vzorci sedimentov so bili v Portoriku nabrani med majem in julijem leta 2003 in 2004 (Cantrell in sod., 2006) in v Indiji v predmonsunskem poletnem obdobju leta 2010 (Nayak in sod., 2011). Slanost je bila v solinah v Indiji primerljiva, in sicer je bila 29,5% pri vzorcih slanice in 12,5% pri sedimentih. V Portoriku pa je bil razpon slanosti med 25% in 30%.

Slanost v sečoveljskih solinah merijo z Baumejevim aerometrom. Preden so aerometri prišli v uporabo, so iznajdljivi solinarji slanost določevali s krompirjem, ki se pri 14 °Be dvigne na površje vode. Bolj izkušeni solinarji pa so jo določevali celo na oko ali dotik (Pahor in Poberaj, 1963).

1 °Be ustreza 10 g NaCl na kg morske vode ali 1 %. Sol začne kristalizirati pri 25 °Be, pri 25,5 °Be je dosežena saturacija NaCl in le-ta kristalizira s čistostjo več kot 99,8 % pri slanostih med 26 °-29 °Be (Javor, 1983).

Slanost je bila v našem primeru primerna za pridobivanje čistega halita, vendar ni dosegla ekstremnih slanosti, torej čez 30 °Be, ki jo dosega v sezonah z manj dežja.

Naša vzorčna mesta so bila razdeljena tako, da smo dobili vpogled v različna okolja. Vzorčni mesti A in B sta bili bužeti, znotraj delujočih kristalizacijskih bazenov, za katera

smo predvidevali, da bo slanost najvišja, kar se je izkazalo za pravilno. Vzorčno mesto C je bila bužeta v opuščenem bazenu, ker smo hoteli videti razliko v sestavi in številu vrst med opuščenimi in delujočimi kristalizacijskimi bazeni. Tu je bila po predvidevanjih slanost nižja kot pri vzorcih A in B, primerljivo slanosti v lidih. Vzorčni mesti D in E sta bila lida, kjer naj bi bila slanost nižja kot v bužetah. Vendar je bila v drugem vzorčenju slanost lida D primerljiva s slanostjo obeh bužet, A in B, in je bila celo za 7 °Be višja kakor v vzorčnem mestu E (lido), kar je najbrž posledica tega, da se je iz kristalizacijskih bazenov nad tem kanalom spustila slanica.

5.2 IZOLACIJA, MORFOLOGIJA IN IDENTIFIKACIJA GLIVNIH VRST

Iz vseh vzorcev smo celokupno izolirali 113 glivnih izolatov iz različnih obdobj pobiranja soli. Najvišje število CFU je bilo prešteto pri drugem vzorčenju, najmanjše pa pri tretjem – skupaj 339. Pri prvemu vzorčenju je bil najvišji CFU določen za vzorčno mesto C5, kar 40 od 116 izolatov. Pri drugemu vzorčenju je vzorčno mesto D prispevalo več kot polovico izolatov, tj. kar 85 (D5 50 in D10 35). Pri zadnjem vzorčenju pa je bil najvišji CFU pri vzorčenju E (24 od 70).

Nizek CFU lahko pripišemo težavnemu okolju, v katerem je večina gliv v dormantnem stanju.

Zanimiva je bila porazdelitev med vzorčenjem na istih vzorčnih mestih. Vzorčni mesti A in E sta imeli podoben CFU med vsemi tremi vzorčenji. Vzorčno mesto B je imelo najnižji CFU pri najvišji slanosti, pri vzorčenem mestu C pa je CFU padal od prvega do zadnjega vzorčenja. Pri vzorčnem mestu D je bil najvišji CFU pri drugem vzorčenju. Po tem vidimo, da si vzorci ne sledijo oziroma da ni bilo možno določiti viška, v katerem prevladujejo glivni izolati. Le skupno število nam pove, da je bilo najvišje število izolatov, ko je bila slanost najvišja, in da skupni CFU pada vzporedno s slanostjo. Vendar je treba biti pri CFU vzorčnega mesta D previden, saj je slanost višja kot ponavadi, najbrž zaradi izlita slanice. Cantrell in sodelavci (2006) za svoje vzorce iz slanice prav tako navajajo, da je CFU najvišji, ko je slanost najvišja.

Glive so bile morfološko raznolike. Tretjino smo izolirali do čistih kultur. Morfotipi so se različno pojavljali skozi obdobje pobiranja soli, kar je bilo pričakovano, saj niso vse vrste do enake mere prilagojene na visoko slanost in temperature. V primerjavi z drugimi raziskavami, kjer so jemali vzorce iz solinskih sedimentov, smo dobili višje število izolatov. Nayak in sodelavci (2012) so iz sedimentov v solinah Ribandar in iz sedimentov mangrov dobili skupno 37 izolatov, Cantrell in sodelavci iz sedimentov iz solin iz Portorika pa 44. Pri izolatih iz Indije so prevladoval vrste rodu *Aspergillus*, in sicer vrste *A. candidus*, *A. flavus*, *A. sydowii*, *A. versicolor* in *A. wentii* iz solin ter *A. flavipes*, *A. terreus var terreus* in *A. versicolor* iz mangrovskih sedimentov. Dodatno so izolirali še

vrsti *Eurotium amstelodami* in *Hortaea werneckii* iz solin ter *E. amstelodami* in *E. repens* iz mangrov. V sedimentih iz portoriških solin so prevladovali vzorci sterilnega micelija s po 16 izolati in »Moniliaceae« s po 10. Poleg teh dveh skupin pa še *Aspergillus* sp. s po 9 in *Chaetomium globosum* s po 5 sevi. *Penicillium variable*, *Penicillium* sp., *Aspergillus japonicus* in *Cladosporium cladosporoides* so se enkrat. Število izolatov se torej razlikuje med solinami v tropskem območju in sečoveljskimi solinami.

To smo predvidevali, saj na število izolatov vplivajo različni faktorji: od zemljepisne širine do habitata v okolici solin (Cantrell in sod., 2006). Čeprav so bile te soline v tropskih območjih, so bile omejene s sezono, predvsem zaradi sezonskih padavin (monsuni v Indiji). Pri indijskih solinah gre nižje število izolatov pripisati tudi gojišču z visoko koncentracijo dodane soli. Naših 113 izolatov gre pripisati relativno velikemu vzorcu odvzetega blata in gojišču, ki favorizira glive iz slanih okolij, saj smo poleg sladkornega ekstrakta dodali tudi 5 oziroma 10 % NaCl.

Z molekularno identifikacijo smo iz sečoveljskih solin dobili največ sekvenc, pripadajočih rodu *Fusarium*. Drugi najštevilčnejši rod je bil *Aspergillus*, ki prevladuje tudi v vzorcih iz Indije. Vrsti, ki sta bili prisotni v obeh raziskavah, sta *A. sydowii* in *E. repens*. *E. repens* je bila v dveh od treh primerov izolirana iz lida E3, ki je imel takrat nižjo slanost, prav tako kot pri izolatih iz Indije. Pri halotolerantnem testu se je uvrščal med fakultativne halofile z optimumom rasti pri 10 % slanosti. Tudi *A. sydowii* je bil pri nas izoliran pri nižji slanosti (A3), kar potrjuje tudi halotolerantni test vzorcev iz Indije, kjer je *A. sydowii* uvrščen med fakultativne halofile, z nižjim optimumom rasti (Nayak in sod., 2012).

Obe raziskavi sta opravili tako imenovane halotolerantne teste, kjer so na različnih gojiščih z dodano soljo primerjali rast gliv. Samo ena gliva iz obeh raziskav je bila opisana kot obligatno halofilna gliva: to je bila *Aspergillus penicillioides*, ki kot edina ni mogla rasti brez dodane soli v gojišču. Izolirana je bila iz Indije, iz različnih vzorcev, vendar zanimivo, največkrat iz vode v mangrovah, in ne iz slanice iz solin. To nam pove, da najbolj halofilne vrste niso nujno izolirane iz najbolj slanih okolij (Nayak in sod., 2012).

Butinar in sodelavci (2011) so analizirali prisotnost nitastih gliv v slanica različnih solin po svetu. Od gliv, izoliranih v blatu, so v slanici sečoveljskih solin bile izolirane štiri vrste. Najštevilčnejša je bila *E. repens* s CFU do 10000/L, sledijo ji *A. fumigatus* s 3000 CFU/L, *A. terreus* z 200 CFU/L in *A. sydowii* s 40 CFU/L. *A. fumigatus* in *A. terreus* sta bili izolirani le iz sečoveljski solin. Na gojišču z dodano 17 % oziroma 12 % NaCl sta imeli najvišji CFU. *A. fumigatus* je bila v našem vzorčenju izolirana tudi iz vzorčnega mesta C2, kjer je bila slanost 17,5 %, na gojišču pa 10 % NaCl. Pomembna je predvsem zato, ker je znan človeški patogen. *A. terreus* je bila izolirana iz vzorčnega mesta D2, kje je bila slanost 24,1 %, gojišče pa je prav tako vsebovalo 10 % NaCl.

Za *A. sydowii*, ki je bila izolirana iz še petih solin po svetu in je imela najvišji CFU v solinah iz Namibije, je znano da je povzročitelj aspergiloze pri koralah. Pred izbruhom te bolezni je bila ta gliva poznana kot saprofit v tleh in je njena pojavnost v morskih okoljih načela vprašanje o njenem izvoru. Glede na njeno pojavnost v različnih solinah po svetu sklepajo, da služijo solinska polja kot rezervoar za morske seve te vrste, ki so se razširili globalno po morskih ekosistemih (Butinar in sod., 2011). Gliva je poznana tudi kot oportunistični patogen pri imunsko oslabljenih ljudeh.

Za vrsto *Eurotium repens*, ki je bila izolirana še iz solin na delti reke Ebro, vendar v manjšem CFU, je značilno, da proizvaja različne metabolite, kot so ehinulin, flavoglaucin, eritroglaucin, fiskoin in asperentin, med katerimi zadnji kaže izrazito protiglivno in protibakterijsko delovanje (Podofil in sod., 1978). Vrsta je bila izolirana iz blata sečoveljskih solin skozi vsa tri vzorčenja, in sicer po dvakrat v vsakem vzorčnem obdobju.

Aspergillus fumigatus sintetizira širok razpon mikotoksinov, kot so fumigaklavin C, fumitremorgin A in B, verukologen (Butinar in sod., 2011), ter sekundarnih metabolitov, ki so za človeka toksični (gliotoksin) (Samson in sod., 2010). V razvitih državah je med najbolj prevladujočimi glivnimi patogeni, ki se prenašajo z zrakom in pri imunsko oslabljenih ljudeh povzročajo nevarne invazivne aspergiloze s smrtnim izidom. Poleg toksinov in sekundarnih metabolitov igra pomembno vlogo pri virulenci te vrste sama majhnost konidija (par mikronov), ki omogoča vstop v celoten dihalni trakt, hitra rast pri 37 °C, ter nezahtevnost po dodatnih hranilih (Latge, 2001). *A. fumigatus* je bil iz našega vzorčenja izoliran iz vseh vzorčnih mest pri prvem vzorčenju ter dvakrat v drugem in tretjem. Pri sevu EX-F 5417 je na mikroskopski sliki viden kleistotecij. Do nedavnega so memili, da se ta vrsta razmnožuje le nespolno, a so novejša raziskava dokazale prisotnost spolnega ciklusa in teleomorfa *Neosartorya fumigata*. Spolna oblika je bila dokazana pri okoljskih vzorcih iz Irske (O'Gorman in sod., 2009). Najbrž so ekstremne razmere tiste, ki so pripeljale do tega pojava. Tako *E. repens* kot tudi *A. fumigatus* sta bili vrsti, ki sta bili izolirani tako pri nizkih kot tudi pri visokih slanostih, kar bi lahko pomenilo, da sta v blatu konstantno prisotni. Glede na to, da sta v visokem številu prisotni tudi v slanici, bi to lahko pomenilo, da sta vrsti specifični za slano okolje sečoveljskih solin.

Tudi *Stachybotrys chartarum* je patogena gliva, ki jo povezujejo s številnimi boleznimi človeka in živali. Najpomembnejša bolezen je bila vrsta idiopatskih pljučnih krvavitev (angl. *Idiopathic Pulmonary Hemorrhage*, IRH) pri dojenčkih, leta 1993 v Clevelandu (Ohio). Oboleli otroci so živeli v t. i. »bolnih hišah«, kjer je bilo prisotno veliko število plesni. Sevi *S. chartarum*, izolirani iz domov obolelih, so bili bolj toksični od preostalih vrst. Izjemno toksični in konstantno hemolitični so bili le trije od 28 sevov. S pomočjo RAPD analize so pri teh sevih ugotovili pogostejšo prisotnost petih fragmentov kakor pri drugi sevih. Le-ti naj bi imeli vpliv na toksičnost same vrste (Kuhn in Ghannoum, 2003).

S. charatrum proizvaja veliko število različnih mikotoksinov, med katerimi so najpogostejši trihoteceni, satratoskini F, G in H, roriden E, verukarin J in trihoverola A in B (Hossain in sod., 2004). Povzročajo inhibicijo proteinske sinteze *in vitro* in posledično vodijo v apoptozo (Yang in sod., 2000). Pri človeku povzročajo različna bolezenska stanja: od draženje kože, bruhanja, driske, krvavitve itd. (Hosaa in sod., 2004).

Rod *Fusarium* vsebuje določene vrste, ki so patogene. Med njimi sta *Fusarium solani*, ki je odgovorna za dve tretjini bolezni, povezanih s tem glivnim rodом, in *F. oxysporum*. Fusarioze, ki jih povzroča *F. solani*, so zelo smrtonosna obolenja, saj je smrtnost pri imunsko kompromitiranih pacientih skoraj 100% (Dignani in sod., 2004). Eden od razlogov je, da so sevi te vrste odporni na veliko število antifungicidnih sredstev (Arikan in sod., 1999).

Najvišja morfološka raznolikost je bila določena pri najnižji slanosti, tj. tretjem vzorčenju, saj smo skoraj polovico prešteti gliv izolirali do čistih kultur. Pri prvem vzorčenju je bilo takih manj kot polovica, pri drugem pa le tretjina prešteti gliv. To nam je potrdila tudi TTGE metoda. Ne glede na najvišji skupni CFU drugega vzorčenja je število fragmentov takrat najnižje. V našem primeru smo iz vzorcev drugega vzorčenja izolirali *Chaetomium megalocarpum*, *Trichoderma longibrachiatum* in *Emmericelopsis* sp., ki so bile izolirane le takrat. Vrsto *Chaetomium megalocarpum* so izolirali iz slanih tal v okolici Mrtvega morja, v plasteh lehnjaka (Steiman in sod., 2004), preostali dve vrsti pa nista omenjeni v slanih ekosistemih. Potrebna bi bila večkratna izolacija teh vrst iz slanega okolja, da bi jih lahko upoštevali kot mikobioto značilno za solinsko blato.

Če pogledamo vzorca z najvišjo slanostjo, to sta A2 in B2, vidimo da iz njih nismo izolirali nobene od potencialno patogenih vrst. Slanost ima torej vpliv na raznolikost in sestavo glivnih vrst. Če bi se morali odločiti, katero blato bi uporabljali za terapevtske namene, bi glede na naše rezultate izbrali blato z najvišjo slanostjo slanice nad njim. Primerna slanost bi po moji oceni znašala nad 25 °Be, torej slanost, pri kateri se sol izloča.

Črnih kvasovk iz blata nismo izolirali. Ne glede na to, da prevladujejo v slanici sečoveljskih solin (Gunde-Cimerman in sod., 2000; Butinar in sod., 2005), jih z našimi metodami izolacije nismo uspeli izolirati.

Razlog je lahko v tem, da jih je zaradi njihove morfološke plastičnosti in polimorfni anamorfni stanj izjemno težko natančno identificirati. Potreben je natančen morfološki opis v povezavi z molekularnimi metodami in fiziološkimi testi ogljikovega in dušikovega metabolizma na gojiščih z dodano visoko koncentracijo NaCl ali brez nje (Zajc in sod., 2012). Možno je tudi, da jih v naših vzorcih preprosto ni.

Podobno je z rodом *Cladosporium*. Ne glede na to, da so leta 2007 opisali sedem novih vrst tega rodu (Zalar in sod., 2007) na ploščah iz slanice in da je ta rod med najštevilčnejšimi melaniziranimi glivami znotraj sečoveljskih solin skozi vse leto (Gunde-

Cimerman in sod., 2000; Butinar in sod., 2005), jih mi nismo izolirali. Nayak in sodelavci (2011) navajajo, da tudi njim ni uspelo izolirati tega rodu. Kot razlog so navedli gojišče, ki je bilo Czapek Dox agar z dodano 20% soljo in 0,5 g/L streptomicina. Povišana koncentracija soli v gojišču naj ne bi podpirala rasti vrst iz rodu *Cladosporium*. Glede na to, da smo tudi mi uporabljali gojišča z dodano soljo do 10 %, je razlog lahko ta. Iz slanice je bila namreč večina sevov izolirana iz gojišč s sladkorji (Gunde-Cimerman in sod., 2000). Najbrž je slanost samega blata previsoka in ne dovoljuje rasti.

Glivne združbe v solinskem blatu ne kažejo značilnega vzorca ponavljanja; treba bi bilo opraviti vzorčenja, ki bi si pogosteje sledila (večkrat skozi obdobje pobiranja soli) ter večkrat pred sezono pobiranja in po končani sezoni. Tako bi dobili pravi vpogled v to, katera mikrobiota je značilna za solinsko blato. Uporabiti bi morali tudi različna gojišča, ki ne bi vsebovala samo soli, temveč tudi sladkor, blato bi lahko pred tem bolje resuspendirali in uporabili različne redčitve. Za primerljivo okolje lahko vzamemo slana in suha tla v okolici Mrtvega morja. Različne raziskave (Grisham in sod., 2003; Steinman in sod., 1995) so prišle do zaključka, da ni specifične mikrobiote za tak tip tal. Zelo malo je bilo izoliranih izrazitih halofilov, pretežno so izolirali halotolerantne vrste, podobno kakor mi. Treba bi bilo obdelati še primerljivo blato iz drugih solin. Za začetek bi se lahko osredotočili na sezone soline s področja Jadrana, kasneje pa bi lahko obdelali še preostale soline, ki »proizvajajo« solinsko blato oziroma fango.

Analize, ki so jih predhodno opravili na Zavodu za zdravstveno varstvo Koper, kažejo na to, da solinsko blato ustreza standardom in ne presega zgornje dovoljene meje koncentracij težkih kovin. Kar zadeva mikrobiološke analize, so bile le-te narejene izključno za prisotnost kvasovke *Candida albicans* in bakterij (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ter mezofilnih aerobov). Visok titer aerobnih mezofilov bi bilo treba podrobneje analizirati. *Bacillus subtilis* je sporulirajoča, ubikvitana bakterija, ki povzroča obolenje izključno pri imunsko oslabljenih ljudeh, pri zdravih ljudeh pa se uporablja celo kot probiotik (Oggioni in sod., 1998).

Ne glede na to, da je solinsko blato mešanica slanice, ostankov petole in kraške ilovice, ostaja vprašanje o aktivnosti gliv nejasno. Prisotnost potencialno patogenih sevov nas še bolj zavezuje k temu, da sledimo navodilom za uporabo. Kljub temu da vzorce blata predhodno prefiltrirajo in avtoklavirajo, bi bilo treba izvajati monitoring še na morebitno prisotnost mikotoksinov in cianotoksinov. Priporočljivo bi bilo tudi jemati blato iz mest z visoko slanostjo. Vendar je treba vedeti, da se »fango« uporablja segreto na temperaturo 42 °C, tako da bi lahko povišana temperatura zavrla ali izničila delovanje določenih toksinov.

5.3 TTGE

Profil genov za ITS in 5,8S rRNA je pokazal razlike v vzorčnih mestih in sicer glede na čas odvzeta. Najmanjše število fragmentov je bilo pri vzorcih z najvišjo slanostjo (A2 in B2), najvišje pa pri vzorcih z najnižjo (B3 in E3). Pri teh vzorcih se je pojavila skupina fragmentov, ki se je ponavljala pri večini vzorcev. Prav tako je pri teh vzorcih najvišje število fragmentov, ki so bili tudi najbolj raznoliki (A3 in C3).

Pri vzorčnem mestu P2911 ali C je bilo zanimivo opaziti fragmente, ki jih drugod ni bilo. Gre za opuščen kristalizacijski bazen, kjer je sestava gliv najbrž drugačna od delujočih bazenov. Tega z morfološkimi metodami nismo potrdili, nismo izolirali vrst, ki bi bile specifične le za ta bazen.

Pri raznolikosti med istimi vzorčnimi mesti skozi čas je opaziti večji vpliv slanosti, kot temperature. Profili združb istih vzorčnih mest se pri drugemu vzorčenju oz. pri najvišji slanosti skoraj pri vseh (izjema je E2) mestih ločijo od prvega in tretjega vzorčenja s svojevrstnimi fragmenti. To pomeni, da takrat prevladujejo vrste, ki so najbolj prilagojene.

S pomočjo TTGE metode smo dobili potrditev, da so glive v blatu prisotne skozi celotno obdobje pobiranja soli, tudi ko je slanost izjemno visoka. Število fragmentov nam potrjuje dobljeno morfološko raznolikost; za nadaljnje potrditve pa bi bilo treba dodatno analizirati same fragmente in dobiti molekularno potrditev, za katero vrsto gre.

5.4 POVZETEK

Identificirali smo različne halotolerantne rodove gliv, med katerimi so prevladovali rodovi *Aspergillus*, *Eurotium* in *Fusarium*. Najštevilčnejše vrste izolirane iz blata so bile *Aspergillus fumigatus*, *Eurotium repens* in *Fusarium oxysporum*. *Aspergillus fumigatus* in *Eurotium repens* sta prisotni skozi celotno vzorčenje in morebiti predstavljata stalno združbo gliv v blatu sečoveljskih solin.

Izolirane glive smo razdelili v 22 morfoloških skupin, od katerega smo jih 18 uspeli molekularno identificirati. Z TTGE metodo smo dobili vpogled v raznolikost glivne združbe in določili slanost kot dejavnik z največjim vplivom.

Za človeka nevarne vrste, ki smo jih izolirali so bile *Aspergillus fumigatus*, *Stachybotrys chartarum*, *Fusarium solani* in *Fusarium oxysporum*.

6 SKLEPI

- Slanost ima odločilen vpliv na sestavo glivne združbe, ki se spreminja s časom odvzema vzorca in slanostjo blata.
- Skladno s postavljeno hipotezo je bila potrjena prisotnost rodov, ki vključujejo patogene vrste. Ti rodovi so *Aspergillus*, *Stachybotrys* in *Fusarium*
- Skladno s pričakovanji smo dobili prevladujoč delež vrst roda *Eurotium* medtem ko roda *Cladosporium* nismo dokazali.

7 POVZETEK

Sečoveljske soline so tradicionalne soline z dolgo zgodovino uporabe blata in slanice v terapevtske namene, katere začetki segajo daleč nazaj v 13. stoletje. Blato ali fango je tako že stoletja priznано in uveljavljeno kot medicinsko-terapevtski pripomoček, ki je ob upoštevanju navodil, relativno varen za uporabo. Njegova kemijsko-fizikalna sestava je dobro poznana in se redno meri. Večina prejšnjih raziskav se je osredotočala na slanico in petolo, zato smo v diplomski nalogi dali poudarek solinskemu blatu in njegovi glivni sestavi. Uporabili smo gojitvene metode, kjer smo na gojišču MEA z dodanim NaCl gojili glive do čistih kultur, in molekularno metodo TTGE in sicer za določanje profila glivne združbe v blatu. Izolirali smo 113 glivnih sevov in jih razporedili v 22 morfoloških skupin. Določenim smo izolirali DNK za molekularno identifikacijo, vse čiste izolate pa smo shranili na stabilen način v mikrobiološko zbirko EX-F. Z izolacijo glivne DNK in analizo dela ITS in beta-tubulinskega zaporedja smo identificirali 33 glivnih sevov, ki smo jih uvrstili v 9 rodov in 17 vrst. Prevladovala so vrste *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus* in *Eurotium repens* ter rodovi *Stachybotrys* in *Emericellopsis*. Z TTGE metodo smo dobili potrditev o mikrobiološki raznolikosti blata in dokaz o tem, da nanjo najbolj vpliva slanost. Pri najvišji slanosti je ta raznolikost najmanjša, takrat je prisotnih najmanj vrst. Nismo ugotovili stalnega in določenega vzorca ponavljanja vrst gliv. Vrsti ki sta prisotni skozi celotno obdobje vzorčenja, sta bili *A. fumigatus* in *E. repens*, ki bi lahko glede na to, da sta bili prisotni v velikem številu tudi v slanici predstavljali skupino, ki je značilna za blato. »Črnih kvasovk« in rodu *Cladosporium* nismo uspeli izolirati. Od patogenih vrst smo izolirali določene, ki bi lahko predstavljale nevarnost za zdravje človeka. To so *Aspergillus fumigatus*, *Stachybotrys chartarum*, *Fusarium solani* in *Fusarium oxysporum*. Te vrste proizvajajo širok nabor sekundarnih metabolitov, na katere bi bilo treba biti pozoren pri uporabi blata in bi bil priporočljiv monitoring.

8 VIRI

- Abdel-Fattah A., Pingitore Jr. N. E. 2009. Low levels of toxic elements in Dead Sea black mud and mud-derived cosmetic products. *Environmental Geochemistry and Health*, 31, 4: 487-492
- Amelung W., Hildebrandt G. 1985. *Balneologie und medizinische klimatologie*. Berlin, Springer-Verlag: 321 str.
- Anton J., Oren A., Benloch S., Rodriguez-Valera F., Amann R., Rossello-Mora R. 2002. *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the *Bacteria* from saltern crystallizer ponds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 485-491
- Arikan S., Lozano-Chiu M.V., Paetznick S., Nangia Rex J.H. 1999. Microdilution susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 3946-3951
- Benloch S., Acinas S.G., Anton J., Lopez-Lopez A., Luz S.P., Rodriguez-Valera F. 2001. Archeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: culture versus PCR. *Microbial Ecology*, 41: 12-19
- Burns D.G., Camakaris H.M., Janssen P.H., Dyal-Smith M. 2004. Combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicates that members of most haloarchaeal groups in an Australian crystallizer ponds are cultivable. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 5258-5265
- Butinar L., Sonjak S., Zalar P., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2005a. Melanized halophilic fungi are eukaryotic members of microbial communities in hypersaline waters of solar salterns. *Botanica Marina*, 48, 1: 73-79
- Butinar L., Santos S., Spencer-Martins I., Oren A., Gunde-Cimerman N. 2005b. Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiology Letters*, 244, 2: 229-234
- Butinar L., Zalar P., Frisvad J.C., Gunde-Cimerman N. 2005c. The genus *Eurotium* – members of indigenous fungal community in hypersaline waters of salterns. *FEMS Microbiology Ecology*, 51, 2: 155-166
- Butinar L., Frisvad J.C., Gunde-Cimerman N. 2011. Hypersaline waters – a potential Source of foodborne toxigenic aspergilli and penicillia. *FEMS Microbiology Ecology* 77:186-199
- Cantrell S.A., Casillas-Martinez L., Molina M. 2006. Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Mycological Research*, 110: 962-970

- Dennis P. P., Shimmin L. C. 1997. Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbial Molecular Biology Review*, 61: 90-104
- Dignani M. C., Anaissie E.J. 2004. Human fusariosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 67-75
- Eichelsdörfer D. 1990. Izvedensko mnenje glede blata iz solin (solinsko blato) iz Nahajališča »Droga Saline Lera« pri Portorožu, Jugoslavija. Sečovlje, Soline Pridelava soli d.o.o: 21 str. (interno gradivo)
- Galinski E. A., Louis P. 1998. Compatible solutes: ectoine production and gene expression. *Microbiology and biogeochemistry of hypersaline environments*. Boca Raton, CRC Press Inc.: 187-202
- Gardes M., Bruns T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity of basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2: 113-118
- Gerrits van den Ende A.G.H., de Hoog G.S. 1999. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophiarophora bantiana*. *Studies in Mycology*, 43: 151-162
- Glass N. L., Donaldson G. C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1323-1330
- Gorjan A., Plemenitaš A. 2006. Identification and characterization of ENA ATPases HwENA1 and HwENA2 from the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *FEMS Microbiology Letters*, 265, 1: 41-50
- Grishkan I., Nevo E., Wasser S. P. 2003. Soil micromycete diversity in the hypersaline Dead Sea coastal area, Israel. *Mycological Progress*, 2, 1: 19-28
- 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
- Gunde-Cimerman N., Cerovac S., Zalar P. 2001. Biodiversity of filamentous fungi in the salt pans Sečovlje = Biotska pestrost gliv Sečoveljskih solin. *Acta Biologica Slovenica*, 44: 25-30
- Hossain M. A., Ahmed M. S., Ghannoum M. A. 2004. Attributes of *Stachybotrys chartarum* and its association with human disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113, 2: 200-208

- Humber R.A. 1998. Entomopathogenic fungal identification. V: APS/ESA joint annual meeting, Las Vegas, NV, 8.-12. November 1998. Humber R.A. (eds.). Las Vegas, Workshop: 35-43
- Javor B.J. 1983. Planktonic standing crop and nutrients in a saltern ecosystem. *Limnology and Oceanography*, 28: 153-159
- Kerkar S. 2004. Ecology of hypersaline microorganisms. V: Marine microbiology: Facets and opportunities. Ramaiah N. (ed.). Goa, National Institute of Oceanography: 37-47
- Kogej T., Ramos J., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2005. Halophilic fungus *Hortaea werneckii* and the halotolerant fungus *Aureobasidium pullulans* maintain low intracellular cation concentrations in hypersaline environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 6600-6605
- Kogej T., Stein M., Volkmann M., Gorbushina A. A., Galinski E. A., Gunde-Cimerman N. 2007. Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization. *Microbiology*, 153: 4261-4273
- Kogej T., Gorbushina A.A., Gunde-Cimerman N. 2006. Hypersaline conditions induce changes in cell-wall melanization and colony structure in a halophilic and a xerophilic black yeast species of the genus *Trimmatostroma*. *Mycological Research*, 110, 6: 713–724
- Kraševac J. 1985. Kratek prikaz balneologije in njen pomen v našem zdravstvu. *Medicinski razgledi*, 24:89-102
- Kuhn D. M., Ghannoum M. A. 2003. Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 1: 144-172
- Lapanje A. 2005. Vpliv onesnaženosti z živim srebrom na vrtsno raznolikost bakterij v prebavilih enakonožnih rakov. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 164 str.
- Latgé J. P. 2001. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends in Microbiology*, 9: 382–389
- Liu Z., Li P., Liu X. 2002. Culturing artificial algal mats to improve the salt yield and quality in saltworks. *Ecological Engineering*, 18: 379-383
- Malc M. 1996. Talasoterapija. V: Fizikalna medicina v lokomotorni rehabilitaciji. Zbornik predavanj. VIII. rehabilitacijski dan. 22. in 23. marec. Ljubljana. Štefančič M. (ur.). Ljubljana, Inštitut Republike Slovenije za rehabilitacijo: 87-89

Prole A. Združba gliv v zdravilnem blatu sečoveljskih solin.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2013

- Malc M. 1998. Talasoterapija nekdanj in danes, I. Slovenski kongres zdravnikov za fizikalno in rehabilitacijsko medicino. 15. do 17. oktober. Bled. Marinček Č. (ur.). Ljubljana, Inštitut Republike Slovenije za rehabilitacijo: 59-59
- Ma'or Z., Henis Y., Alon Y., Orlov E., Sørensen K.B., Oren A. 2006. Antimicrobial properties of Dead Sea mineral mud. *International Journal of Dermatology*, 45: 504-511
- Maturrano L. 2004. Characterization of the microbiota from the Maras solar saltern and hypersaline environments in Peruvian Andes. PhD thesis. Alicante, University of Alicante: 124 str.
- Matturano L., Santos F., Rosello-Mora R., Anton J. 2006a. Microbial diversity in Maras Salterns, a hypersaline environment in the Peruvian Andes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 3887-3895
- Maturrano L., Valens-Vadell M., Rosselló-Mora R., Antón J. 2006b. *Salicola marasensis* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic bacterium isolated from the Maras solar salterns in Peru. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 7: 1685-1691
- May L. A., Smiley B., Schmidt M. G. 2001. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Canadian Journal of Microbiology*, 47, 9: 829-841.
- Muyzer G., Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 127-141
- Nayak S. S., Gonsalves V., Nazareth S. W. 2012. Isolation and salt tolerance of halophilic fungi from mangroves and solar salterns in Goa-India. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 41: 164-172
- Nicolich E. 1882. Cenni storico-statistici sulle saline di Pirano. Pirano, Consorzio delle saline: 74 str.
- Nissenbaum A. 1993. The Dead Sea-an economic resource for 10,000 years. *Hydrobiologia*, 267:137-141
- Oggioni R. M., Pozzi G., Valensin P. E., Galieni P., Bigazzi C. 1998. Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of *Bacillus subtilis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 325-326
- O'Gorman C.M., Fuller H.T., Dyer P.S. 2008. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 457, 7228: 471-474

Prole A. Združba gliv v zdravilnem blatu sečoveljskih solin.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2013

Ollivier B., Caumette P., Garcia J. L., Mah R. A. 1994. Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiology Reviews*, 58, 1: 27-38

Oren A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbial Molecular Biology Review*, 63, 2: 334-348

Oren A. 2010. Mats of filamentous and unicellular Cyanobacteria in Hypersaline environments. V: *Microbial Mats: Modern and ancient microorganisms in stratified systems*. Seckbach J., Oren A. (eds.). Dordrecht, Springer: 389-402

Pahor M., Poberaj T. 1963. Stare piranske soline. Ljubljana, Mladinska Knjiga: 175 str.

Pašić L., Galan Bartual S. G., Poklar Ulrih N., Grabnar M., Herzog Velikonja B. 2005. Diversity of halophilic archaea in the crystallizers of an Adriatic solar saltern. *FEMS Microbiology Ecology*, 54: 491-498

Pašić L., Poklar Ulrih N., Črnigoj M., Grabnar M., Herzog Velikonja B. 2007. Haloarchaeal communities in the crystallizers of two adriatic solar salterns. *Canadian Journal of Microbiology*, 53: 8-18

Petrovič U., Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A. 2002. Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Molecular Microbiology*, 45, 3:665–672

Podojil M., Sedmera P., Vokoun J., Betina, V., Baráthová H., Duracková Z., Horáková K., Nemec P. 1978. *Eurotium (Aspergillus)* repens metabolites and their biological activity. *Folia Microbiologica (Praha)*, 23: 438-443

Prista C., Almagro A., Loureiro-Dias M. C., Ramos J. 1997. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 10: 4005-4009

Raper H.B., Thom C. 1949. A manual of the Penicilia. Baltimore, Wilkins and Wilkins: 875 str.

Raper C.A., Raper J.R., Miller R.E. 1972. Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 64: 1088-1117

Rautar I. 1991. Peloidoterapija in zorenje peloida. *Zdravniški vestnik*, 60: 233–235

Rinaldi M. G. 1983. Invasive aspergillosis. *Review of Infectious Diseases*, 5, 6:1061-1077

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor: 854 str.

Prole A. Združba gliv v zdravilnem blatu sečoveljskih solin.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2013

Samson R. A., Houbraken J., Thrane U., Frisvad J. C., Andersen B. 2010. Food and indoor fungi. Utrecht, CBS-KNAW- Fungal Biodiversity Centre: 389 str.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 12: 5463-5467

Schneider J. 1979. Stromatolithische Milieus in Salinen der Nord-Adria (Sečovelje, Portorož, Jugoslawien). V: 1. Oldenburger Symposium über Cyanobakterien, 1977, - Taxonomische Stellung und Ökologie. Oldenburg, Universität Oldenburg: 234-238

Schneider J., Herrmann G. A. 1979. Saltworks - Natural laboratories for microbiological and geochemical investigations during the evaporation of seawater. V: Fifth international symposium on salt. Coogan A. H., Hauder L. (eds.). Cleveland, Northern Ohio Geological Society: 371-381

Siegesmund M. A., Johansen J. R., Karsten U., Friedl T. 2008. *Coleofasciculus* gen. nov. (Cyanobacteria): morphological and molecular criteria for revision of the genus *Microcoleus* Gomont. *Journal of Phycology*, 44: 1572-1585

Sorokin D. Yu., Tourova T. P., Lysenko A. M., Muyzer G. 2006. Culturable diversity of halophilic sulfur-oxidizing bacteria in hypersaline habitats. *Microbiology*, 152, 10: 3013-3023

Sorokin D. Y., Tourova T. P., Muyzer G., Kuenen G. J. 2008a. *Thiohalospira halophila* gen. nov., sp. nov. and *Thiohalospira alkaliphila* sp. nov., novel obligately chemolithoautotrophic, halophilic, sulfur-oxidizing gammaproteobacteria from hypersaline habitats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58,7: 1685-1692

Sorokin D. Y., Tourova T. P., Galinski E. A., Muyzer G., Kuenen J. G. 2008b. *Thiohalorhabdus denitrificans* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic, sulfur-oxidizing, deep-lineage gammaproteobacterium from hypersaline habitats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 12: 2890-2897

Steiman R., Ford L., Ducros V., Lafond J. L., Guiraud P. 2004. First survey of fungi in hypersaline soil and water of Mono Lake area (California). *Antonie van Leeuwenhoek*, 85, 1: 69-83

Steiman R., Guiraud P., Sage L., Seigle-Murandi F. 1995. Mycoflora of soil around the Dead Sea. I. Ascomycetes (including *Aspergillus* and *Penicillium*), Basidiomycetes, Zygomycetes. *Systematic and Applied Microbiology*, 18: 310-317

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

Prole A. Združba gliv v zdravilnem blatu sečoveljskih solin.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2013

Škornik I. 2008. Spoznajmo soline. 1. izd. Seča, SOLINE Pridelava soli d.o.o: 160 str.

Tkavc R., Gostinčar C., Turk M., Visscher P. T., Oren A., Gunde-Cimerman N. 2011. Bacterial communities in the 'petola' microbial mat from the Sečovlje salterns (Slovenia). *FEMS Microbiology Ecology*, 75, 1: 48-62

Tkavc R. 2012. Mikrobne združbe solinskega raka *Artemia* sp. in izbranih solinskih mikrobnih preprog. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti: 152 str.

Turk M., Mejanelle L., Šentjerc M., Grimalt J.O., Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A. 2004. Saltinduced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeast-like melanized fungi. *Extremophiles*, 8, 1: 53-61

White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: PCR protocols. Innis M. A. (ed.). San Diego, Academic Press: 315-322

Yang G.H., Jarvis B.B., Chung Y.J., Pestka J.J. 2000. Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK, p38 MAPK, and SAPK/JNK activation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 15, 164: 149-160

Zajc J., Zalar P., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2012. The mycobiota of the salterns. *Biology of Marine Fungi*, 53: 133-158

Zalar P., de Hoog G.S., Schroers H.J., Crous P.W., Groenewald J.Z., Gunde-Cimerman N. 2007. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Studies in Mycology*, 58: 157-183

Zalar P., de Hoog G.S., Schroers H.J., Frank J.M., Gunde-Cimerman N. 2005. Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (*Wallemiomycetes* and *Wallemiales*, cl. et ord. nov.). *Antonie van Leeuwenhoek*, 87, 4: 311-328

Zalar P., Gunde-Cimerman N. 2002. Taksonomija in identifikacija gliv. Ljubljana, Scripta Študentska založba: 11-13

ZAHVALA

Hvala vsem, ki so na kakršenkoli način pomembni v mojem življenju. Predvsem staršem, brez katerih me ne bi bilo. Pa mentorici profesorici dr. Nini Gunde-Cimerman, dr. Poloni Zalar in dr. Roku Tkavcu.