

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Jerneja ZUPANČIČ

**MOLEKULARNA ANALIZA IN DETEKCIJA VRST
ČRNIH KVASOVK RODU *Hortaea***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Jerneja ZUPANČIČ

**MOLEKULARNA ANALIZA IN DETEKCIJA VRST ČRNIH
KVASOVK RODU *Hortaea***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**MOLECULAR ANALYSIS AND DETECTION OF BLACK YEAST
GENUS *Hortaea***

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija 2. stopnje Mikrobiologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v laboratoriju na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Polono Zalar in za recenzentko doc. dr. Tadejo Matos.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Članica: doc. dr. Polona Zalar
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Tadeja Matos
 Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Magistrsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo naloge na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Jerneja Zupančič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 579.24/.26+579.8:582.282.31:577.2.083(043)=163.6
KG črne kvasovke/*Hortaea wernecki*/morfologija/fiziologija/ekologija/
halotoleranca/filogenija/ITS/LSU/EF1 α /molekularne tehnike/
AV ZUPANČIČ, Jerneja, dipl. mikrobiol. (UN)
SA ZALAR, Polona (mentorica)/ MATOS, Tadeja (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI 2013
IN MOLEKULARNA ANALIZA IN DETEKCIJA VRST ČRNIH KVASOVK
RODU *Hortaea*
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)
OP XIII, 94 str., 14 pregl., 35 sl., 6 pril., 79 vir.
IJ sl
JI sl/en
Al Ekstremno halotolerantna črna kvasovka *Hortaea werneckii* je poznana kot povzročiteljica dermatomikoze imenovane *tinea nigra*, površinske okužbe dlani in podplatov ljudi. Mikoza se pojavlja predvsem v tropskih in subtropskih predelih. Kot saprofit je prisotna tudi v zmernem pasu, saj globalno naseljuje naravna izjemno slana okolja: slanice v solinah, slana jezera, morsko vodo in podobne habitate. Vrsto so prvič zasledili v Sečoveljskih solinah leta 1996. Z uporabo klasičnih gojitvenih tehnik so spremljali populacijsko dinamiko črnih kvasovk v izbranih bazenih tekom celotne sezone pridelave soli in jo detektirali pred, med in po sezoni pridobivanja soli. Od odkritja tega dejstva in pa ugotovljene pozitivne korelacije med pojavnostjo *H. werneckii* in naraščajočo koncentracijo soli, so opredelili slanico v solinah kot njen naravni habitat. Vrsta je postala pomemben modelni organizem za študij halotolerance pri evkariontih. *Hortaea werneckii* (*Teratosphaeriaceae*, *Capnodiales*, *Dothideomycetidae*, *Dothideomycetes*, *Pezizomycotina*, *Ascomycota*) je ena izmed trenutno opisanih treh vrst znotraj rodu *Hortaea*, ki vključuje še fitopatogeno glivo (*H. thailandica*) in vrsto, ki naseljuje ekstremno kislou okolje (*H. acidophila*). Raznolikost nukleotidnega zaporedja ITS rDNA znotraj vrste *H. werneckii* nakazuje obstoj kompleksa vrst. Izolate iz različnih ekstremnih okolij po svetu, ki so shranjeni v EX mikrobiološki zbirk, smo primerjali fenotipsko na nivoju halotolerance in morfologije ter genotipsko (ITS in LSU rDNA, translacijski elongacijski faktor (EF) 1 alfa). Rezultati so pokazali, da skoraj vsi preučevani sevi rastejo v razponu od 0 do 25 % NaCl, da so morfološko zelo raznoliki, kar se kaže tudi kot odgovor na različne koncentracije soli v okolju. Filogenetska analiza nukleotidnih zaporedij ITS, D1/D2 LSU rDNA regije ter dela gena EF nakazuje obstoj več različnih skupin, ki smo jih zaenkrat opredelili kot genotipa A in B; genotip A se deli še na dodatne skupine (A1, A2). V genotip A so se uvrstili sevi iz tropskih območij, vsebuje klinično skupino A1, skupina A2 pa je razširjena globalno v slanih okoljih, medtem ko se genotip B pojavlja v izjemno slanih okoljih izključno v zmernem pasu. Genotipa se v fenotipskih značilnostih ne razlikujeta, zato bodo za morebitno delitev vrste *H. werneckii* na dve ali celo več vrst potrebne še dodatne analize.

KEY WORDS DOCUMENTATION

Dn Du2
DC UDC 579.24/.26+579.8:582.282.31:577.2.083(043)=163.6
CX black yeasts/*Hortaea werneckii*/morphology/physiology/ecology/
halotolerance/phylogenetic analysis/ITS/LSU/EF1 α /molecular techniques/
AU ZUPANČIČ, Jerneja
AA ZALAR, Polona (supervisor)/ MATOS, Tadeja (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2013
TI MOLECULAR ANALYSIS AND DETECTION OF BLACK YEAST GENUS
Hortaea
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XIII, 94 p., 14 tab., 35 fig., 6 ann., 79 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* is originally known as the causative agent of *tinea nigra* – a superficial infection on the palms of the hands and the soles of the feet, occurring mainly in tropical and subtropical regions. As a saprobe it is also present in the temperate zone, inhabiting natural and semi-natural hypersaline environments worldwide: brines of salterns, saline lakes, sea water and similar habitats. The species was first detected in Sečovlje salterns in 1996. Using classical cultivation techniques, its population dynamics in saline water of selected ponds was followed throughout the entire season of salt production. Since it was found throughout the entire sampling time and because the positive correlation between its occurrence and increasing salinity was evident, saltern brine was defined as its natural habitat. The species has become an important model organism for the study of halotolerance in Eukarya. *Hortaea werneckii* (Teratosphaeriaceae, Capnodiales, Dothideomycetidae, Dothideomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota) is one of the currently described three species within the genus *Hortaea* which includes a phytopathogenic fungus (*H. thailandica*) and the type, which occupies an extremely acidic environment (*H. acidophila*). Due to the diversity in the nucleotide sequence of the ITS rDNA sequences within the species *H. werneckii* the existence of a species complex has been suggested. Isolates from different extreme environments around the world, stored in EX Culture Collection of Extremophilic Microorganisms, were compared on phenotypic (study of halotolerance and morphology) and genotypic level (sequences of ITS and LSU region and household genes – the translation elongation factor 1alpha). The results showed that almost all strains grow in the range of 0 to 25 % NaCl, that the extreme morphological diversity is a response to different salinities, and that the diversity among the elongation factor sequences is similar to ITS region, which both support the idea of the existence of several genotypes within the species *Hortaea werneckii*. Comparative phylogenetic analysis of nucleotide sequences of elongation factor 1alpha, ITS and LSU regions showed the existence of at least two separate genotypes within species *H. werneckii*.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
KAZALO PRILOG.....	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XIII
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN	1
1.2 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 ČRNE KVASOVKE	3
2.2 ROD <i>Hortaea</i>	4
2.2.1 <i>Hortaea thailandica</i>	4
2.2.2 <i>Hortaea acidophila</i>	5
2.3 <i>Hortaea werneckii</i>	6
2.3.1 Morfologija	6
2.3.2 Fiziologija	7
2.3.3 Ekologija	8
2.3.3.1 Dinamika pojavljanja črnih kvasovk v Sečoveljskih solinah	9
2.3.4 Patogeneza	10
2.3.5 Prilagoditve na slana okolja.....	12
2.3.5.1 Kompatibilni topljenci <i>H. werneckii</i>	12
2.3.5.2 Osmotska regulacija s kopičenjem znotrajceličnih ionov	13
2.3.5.3 Melanizacija celične stene <i>H. werneckii</i>	14
2.3.5.4 Razlike v izražanju genov kot odgovor na povečano osmolarnost	15
2.3.6 Molekularni markerji za identifikacijo gliv	16
2.3.7 Genom <i>H. werneckii</i>	17
2.4 KLASIČNA DETEKCIJA GLIV V VZORCIH VODE	18
2.5 MOLEKULARNA DETEKCIJA GLIV V VZORCIH OKOLJSKE CELOKUPNE DNA	18

2.5.1	Molekularni pristopi detekcije gliv	18
2.5.2	Vgnezdena PCR metoda.....	19
2.5.3	Kvantitativna metoda verižnega pomnoževanja s polimerazo (qPCR)	19
3	MATERIALI IN METODE.....	20
3.1	GOJIŠČA, RAZTOPINE, LABORATORIJSKA OPREMA IN REAGENTI	20
3.1.1	Gojišča.....	20
3.1.2	Raztopine	21
3.1.3	Komercialni kompleti	23
3.2	LABORATORIJSKE APARATURE IN KEMIKALIJE	24
3.2.1	Laboratorijske aparature.....	24
3.2.2	Kemikalije.....	24
3.3	METODE	26
3.3.1	Morfološka analiza glivnih izolatov črnih kvasovk vrste <i>H. werneckii</i>.....	26
3.3.1.1	Ugotavljanje zaviralnega učinka antibiotika na rast <i>H. werneckii</i>	29
3.3.1.2	Izolacija DNA <i>H. werneckii</i>	29
3.3.1.3	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	30
3.3.1.4	Določanje in obdelava nukleotidnega zaporedja	32
3.3.1.5	Metoda prstnega odtisa z začetnim nukleotidom M13	33
3.3.2	Detekcija črnih kvasovk vrste <i>H. werneckii</i> iz slanice Sečoveljskih solin s klasičnimi in molekularnimi pristopi	34
3.3.2.1	Vzorčenje.....	34
3.3.2.2	Spremljanje pojavnosti glive <i>H. werneckii</i> tekom sezone delovanja Sečoveljskih solin	36
3.3.2.3	Detekcija <i>H. werneckii</i> iz okoljskih celokupnih vzorcev DNA s specifičnimi začetnimi oligonuklotidi	38
3.3.2.4	Detekcija <i>H. werneckii</i> iz okoljskih celokupnih vzorcev DNA z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (RT-PCR)	39
3.3.2.5	Detekcija <i>H. werneckii</i> iz okoljskih celokupnih vzorcev DNA z vgnezdeno verižno reakcijo s polimerazo (angl. semi-nested PCR) ter gelsko elektroforezo z denaturacijskim gradientom (DGGE)	40
3.3.2.6	Gelska elektroforeza z denaturacijskim gradientom (DGGE).....	42
4	REZULTATI.....	43
4.1	MORFOLOŠKA ANALIZA IZOLATOV ČRNE KVASOVKE <i>H. werneckii</i>	43
4.1.1	Različni morfološki tipi <i>H. werneckii</i> na gojiščih z različnimi NaCl koncentracijami	43
4.1.1.1	Makromorfologija.....	46
4.1.1.2	Mikromorfologija	50
4.1.1.3	Analiziranje vpliva prisotnosti antibiotika kloramfenikol v gojišču	51
4.2	FILOGENETSKA ANALIZA IZOLATOV ČRNE KVASOVKE <i>H. werneckii</i>	52

4.2.1 Analiza PCR pomnožkov BT, RPB2, CAL, EF1α izbranih sevov <i>H. werneckii</i>	53
4.2.1.1 Filogenetsko drevo	56
4.2.1.2 Molekularna raznolikost <i>H. werneckii</i>	59
4.2.1.3 Metoda prstnega odtisa z oligonukleotidnim začetnikom M13	60
4.3 MOLEKULARNA ANALIZA IN DETEKCIJA ČRNIH KVASOVK VRSTE <i>H. werneckii</i> V VODNIH VZORCIH SEČOVELJSKIH SOLIN.....	61
4.3.1 Spremljanje pojavnosti glive <i>H. werneckii</i> tekom sezone delovanja Sečoveljskih solin.....	61
4.3.1.1 Detekcija celokupnega števila gliv ter črnih kvasovk vrste <i>H. werneckii</i> iz slanice Sečoveljskih solin s klasičnimi pristopi.....	61
4.3.1.2 Detekcija črnih kvasovk vrste <i>H. werneckii</i> iz slanic Sečoveljskih solin z molekularnimi pristopi.....	65
4.3.1.2.1 PCR tekom sezone s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za detekcijo <i>H. werneckii</i>	65
4.3.1.2.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (Real Time PCR).....	66
4.3.1.2.3 Rezultati vgneziane PCR metode pomnoževanja s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za detekcijo <i>H. werneckii</i>	66
4.3.1.2.4 Naleganje za <i>H. werneckii</i> specifičnega začetnega oligonukleotida Hor-F na regijo ITS genoma	68
4.3.1.2.5 Rezultati pomnoževanja vgneziane PCR reakcije za celokupno detekcijo gliv iz okoljskih vodnih vzorcev	69
4.3.1.2.6 DGGE profili okoljskih vzorcev DNA	69
5 RAZPRAVA	72
5.1 FENOTIPSKA ANALIZA GLIVNIH IZOLATOV ČRNIH KVASOVK VRSTE <i>H. werneckii</i>.....	72
5.2 DETEKCIJA ČRNIH KVASOVK VRSTE <i>H. werneckii</i> IZ SLANICE SEČOVELJSKIH SOLIN	78
6 SKLEPI.....	84
7 POVZETEK	86
8 VIRI.....	87
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam uporabljenih naprav in njihovi proizvajalci.....	24
Preglednica 2: Seznam uporabljenih kemikalij in njihovi proizvajalci.....	25
Preglednica 3: Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili za pomnoževanje različnih odsekov genoma <i>H. werneckii</i>	25
Preglednica 4: Vodna aktivnost (a_w) gojišč MEA z različnimi dodatki soli.	26
Preglednica 5: Izbrani sevi <i>H. werneckii</i> iz različnih habitatov in držav, hrani v mikrobeni zbirki EX	27
Preglednica 6: PCR mešanica za 1 vzorec (skupni volumen 35 µl).....	31
Preglednica 7: Programi za pomnoževanje različnih odsekov DNA <i>H. werneckii</i>	31
Preglednica 8: PCR program za metodo prstnega odtisa z začetnim nukleotidom M13. ...	33
Preglednica 9: Program za pomnoževanje gena HOR (Abliz in sod., 2003).	39
Preglednica 10: RT - PCR program za pomnoževanje regije ITS.....	39
Preglednica 11: RT - PCR program za pomnoževanje regije translacijskega elongacijskega faktorja 1α.....	40
Preglednica 12: PCR program za pomnoževanje regije ITS z začetnimi nukleotidi ITS 1F/ ITS4 ter ITS 1GC/ ITS2.	41
Preglednica 13: Uspešnost pomnoževanja različnih odsekov DNA.	53
Preglednica 14: Molekularna raznolikost <i>H. werneckii</i> (osnovna preglednica povzeta po Zalar in sod., 1999)	59

KAZALO SLIK

Slika 1: Svetovna razporeditev različnih izolatov <i>H. werneckii</i>	9
Slika 2: <i>Tinea nigra</i> , površinska mikoza (Mycology Adelaide, 2013).	11
Slika 3: Kompatibilni topljenci pri vrsti <i>H. werneckii</i> (Plemenitaš in sod., 2008).....	13
Slika 4: Model HOG signalne poti, ki je odgovor ekstremno halofilne <i>H. werneckii</i> na prilagoditev v izjemno slanem okolju (Plemenitaš in sod., 2008).....	15
Slika 5: Shematski prikaz splošne organizacije ribosomalnih genov pri glivah.	16
Slika 6: Vzorčeni bazeni tekom sezone pridelave soli 2012 (Google maps, 2013)	35
Slika 7: Vzorci vode četrtega vzorčenja in petega vzorčenja.....	37
Slika 8: Različna morfološka stanja in rast (mm) na gojišču MEA brez prisotne soli (NaCl).	43
Slika 9: Različna morfološka stanja in rast (mm) na gojišču MEA z 10 % dodatkom soli (NaCl).	44
Slika 10: Različna morfološka stanja in rast (mm) na gojišču MEA z 20 % soli (NaCl). ..	44
Slika 11: Različna morfološka stanja in rast (mm) na gojišču MEA z 25 % soli (NaCl). ..	45
Slika 12: Različna morfološka stanja in rast (mm) na gojišču MEA z 30 % soli (NaCl). ..	46
Slika 13: Različne makromorfološke oblike rasti glive <i>H. werneckii</i> na gojiščih z različno slanostjo.	47
Slika 14: Različne makromorfološke oblike kliničnih izolatov <i>H. werneckii</i> na gojiščih z različno slanostjo.	48
Slika 15: Različne makromorfološke oblike okoljskih izolatov <i>H. werneckii</i> na gojiščih z različno slanostjo.	49
Slika 16: Različne mikromorfološke oblike rasti <i>H. werneckii</i> na gojiščih z različno slanostjo.	50
Slika 17: Rast <i>H. werneckii</i> brez ter z dodatkom kloramfenikola.	51
Slika 18: Filogenetsko drevo izbranih sevov <i>H. werneckii</i> , izrisano z metodo najbližjega soseda na osnovi poravnanih nukleotidnih zaporedij ITS rDNA.	52
Slika 19: Pomnožene regije DNA za beta tubulin, elongacijski faktor 1- α , kalmodulin ter RPB II podenoto.	53

Slika 20: Filogenetsko drevo izbranih sevov <i>H. werneckii</i> na podlagi dela gena, ki kodira beta tubulin, izrisano z metodo najbližjega soseda na osnovi poravnanih nukleotidnih zaporedij.	54
Slika 21: Filogenetsko drevo izbranih sevov <i>H. werneckii</i> na podlagi dela gena, ki kodira RPB2, izrisano z metodo najbližjega soseda na osnovi poravnanih nukleotidnih zaporedij.	55
Slika 22: Filogenetsko drevo izbranih sevov <i>H. werneckii</i> na podlagi dela gena, ki kodira translacijski elongacijski faktor 1- α , izrisano z metodo najbližjega soseda na osnovi poravnanih nukleotidnih zaporedij.	55
Slika 23: Filogenetsko drevo izbora izolatov vrste <i>H. werneckii</i> (EX številke – laboratorijski izolati, hranjeni v zbirki ter zaporedij pridobljenih iz NCBI baze podatkov), izrisano na podlagi združenih zaporedij ITS, LSU in dela EF1 α gena regije z uporabo programske opreme PAUP. Drevo je koreninjeno z zaporedji vrste <i>Hortaea thailandica</i>	57
Slika 24: Filogenetsko drevo izbora izolatov vrste <i>H. werneckii</i> (EX številke – laboratorijski izolati, hranjeni v zbirki ter zaporedij pridobljenih iz NCBI baze podatkov), izrisano na podlagi združenih nukleotidnih zaporedij ITS, LSU in dela EF 1- α gena regije izrisano na osnovi algoritma največje verjetnosti (maximum likelihood) s programsko opremo the RaxML Blackbox na spletu. Drevo je koreninjeno z zaporedji vrste <i>Hortaea thailandica</i>	58
Slika 25: Znotraj vrstno razlikovanje izbranih sevov vrste <i>H. werneckii</i> z metodo prstnega odtisa z oligonukleotidnim začetnikom M13.	60
Slika 26: Celokupno glivno število zgoraj, ter število črnih kvasovk spodaj iz analizirane slanice Kristalizacijskega bazena tekom celotne sezone.	62
Slika 27: Celokupno glivno število zgoraj ter število črnih kvasovk spodaj iz analizirane slanice bazena Poslužnica tekom celotne sezone.	63
Slika 28: Celokupno glivno število zgoraj ter število črnih kvasovk spodaj iz analizirane slanice Pilotskega bazena 2/3 tekom celotne sezone.	64
Slika 29: PCR pomnožki tekom sezone s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi Hor-F in Hor-R za detekcijo <i>H. werneckii</i> iz vzorcev celukopne izolirane DNA.	65
Slika 30: Pomnoževanje okoljskih vzorcev DNA z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (RT - PCR).	66

Slika 31: Pomnoževanje okoljskih vzorcev z vgnezdeno PCR metodo in začetnimi nukleotidi Hor-F in Hor-R.....	67
Slika 32: Naleganje specifičnih začetnih oligonukleotidov Hor-F znotraj poravnane zaporedja nukleotidov regije ITS za detekcijo <i>H. werneckii</i> iz vzorcev celokupne DNA	68
Slika 33: Vgnezdena PCR reakcija okoljskih vzorcev celokupne DNA s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za detekcijo gliv.....	69
Slika 34: Filogenetsko drevo DGGE lis okoljskih vzorcev ter pozitivnih kontrol.....	70
Slika 35: Filogenetsko drevo DGGE lis okoljskih vzorcev izolirane DNA ter pozitivne kontrole <i>H. werneckii</i> EXF-225.....	71

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Kemijska analiza vzorčene vode iz Sečoveljskih solin
- Priloga B: Poročilo o kemijski analizi morske vode, ki vstopa v soline
- Priloga C: Poročilo o kemijski analizi slanice – matične vode
- Priloga D: Detekcija celokupnega števila gliv ter črnih kvasovk vrste *H. werneckii* iz slanice Sečoveljskih solin z metodo membranske filtracije
- Priloga E: Koncentracija celokupne DNA v okoljskih vzorcih
- Priloga F: DGGE profili celokupne glivne DNA po posameznih vzorčenjih ter načinih izolacije

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

18S	RNA, ki tvori majhno ribosomsko podenoto
28S	RNA, ki tvori veliko ribosomsko podenoto
angl.	Angleški izraz
APS	amonijev persulfat
BLAST	osnovno iskalno orodje lokalne poravnave (angl. Basic Local Alignment Search Tool)
bp	Bazni par
CBS	mikrobiološka zbirka gliv Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht
Ch	kloramfenikol
CTAB	cetiltrimetilamonijev bromid
CFU	enota, ki oblikuje kolonijo (angl. Colony Forming Unit)
DGGE	gelska elektroforeza z denaturacijskim gradientom (angl. Denaturant Gradient Gel Electrophoresis)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleotidi
EX	Mikrobiološka zbirka ekstremofilnih mikroorganizmov v okviru IC Mycosmo na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani
HCl	klorovodikova kislina
ITS	Regija notranjih distančnikov ribosomske DNA (angl. Internal transcribed spacer)
MEA	agar s sladnim ekstraktom (angl. Malt extract agar)
NaCl	natrijev klorid
NCBI	internetna baza podatkov (angl. National Center for Biotechnology Information)
rDNA	zapis DNA, ki kodira rRNA
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase chain reaction)
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. Real-Time Polymerase chain reaction)
RNA	ribonukleinska kislina
Rpm	obratov na minuto (angl. Rotations per minute)
TAE	pufer iz TRIS-a, ocetne kisline in EDTA (angl. TRIS-acetic acid-EDTA)
TEMED	tetrametiletilendiamin
TRIS	2-Amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
V	volt
X	krat (en)
ZDA	Združene države Amerike

1 UVOD

Izjemno halotolerantna črna kvasovka *Hortaea werneckii* naseljuje naravno slana okolja v svetovnem obsegu. Njene opise najdemo v povezavi s številnimi solinami, slanimi jezeri, morsko vodo in drugimi z morsko vodo povezanimi habitatimi. V Sečoveljskih solinah je bila njena prisotnost z uporabo klasičnih gojitvenih metod dokazana tekom celega leta, kar nakazuje, da so soline njena naravna ekološka niša. Vrsta predstavlja modelni organizem za proučevanje mehanizmov halotolerance pri evkariontih. *Hortaea werneckii* je znana tudi kot povzročiteljica mikoze kože, imenovane *tinea nigra*, opažene le v tropskih in subtropskih predelih (Gunde-Cimerman in sod., 2000). Skupina za biologijo mikroorganizmov je iz vzorcev puščave v Atakami (Čile) osamila prve seve vrste *H. werneckii* izven morskih okolij. Na osnovi ITS rDNA zaporedij so ugotovili, da je vrsta zelo variabilna, vendar filogenija na osnovi drugih gospodinjskih genov še ni bila proučevana. V zadnjih letih so v rod *Hortaea* uvrstili še dve dodatni vrsti, *H. acidophila* in *H. thailandica* (Abliz in sod., 2003).

1.1 NAMEN

Namen naloge je primerjati izbrane izolate vrste *H. werneckii* shranjene v zbirkì ekstremofilnih mikroorganizmov EX na nivoju ITS rDNA z zaporedji izolatov, shranjenih v svetovnih bazah in določiti nukleotidna zaporedja izbranih gospodinjskih genov na izboru sevov iz različnih okolij (beta tubulin, kalmodulin, translacijski elongacijski faktor 1-alfa, RNA polimeraza). Na osnovi teh rezultatov bomo izbrali en lokus, ki bo dovolj ohranjen in hkrati dovolj variabilen ter določiti izbrano nukleotidno zaporedje le-tega pri vseh analiziranih sevih ter izvesti filogenetsko analizo. Dodatno bomo poiskusili razviti metodo molekularne detekcije za vrsto *H. werneckii* iz okoljskih vodnih vzorcev Sečoveljskih solin.

1.2 HIPOTEZE

Postavili smo naslednje hipoteze:

Regija ITS genoma *H. werneckii* je preveč variabilna in je zato posledično neprimerena za določevanje vrst znotraj rodu *Hortaea*.

Izbira primernega DNA lokusa bo omogočila ločitev več vrst znotraj danes priznane vrste *H. werneckii*.

Klinični sevi in določeni okoljski sevi (npr. sevi iz puščave Atakame) najverjetneje ne pripadajo isti vrsti in se bodo na osnovi filogenetske analize primernega gena razporedili v posamezne, ločene skupine.

Z višanjem koncentracije soli v okolju se pojavnost patogenih sevov zmanjšuje.

V vzorcih vode iz solin bomo tekom sezone pridobivanja soli z molekularnimi metodami na osnovi izolacije celokupne DNA zasledili vrsto *Hortaea werneckii*; s povečano slanostjo v okolju v času sezone pridobivanja soli se populacija vrste *H. werneckii* povečuje.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ČRNE KVASOVKE

S tehničnim izrazom »črne kvasovke« opisujemo skupino gliv, ki so taksonomsko in filogenetsko precej heterogene, a imajo nekaj skupnih lastnosti, kot npr. melanizirana celična stena ter tvorba hčerinskih celic s polarnim ali lateralnim brstenjem (Sterflinger, 2006). Črne kvasovke so redka skupina evkariontskih ekstremofilov, ki so sposobne preživetja in rasti ob ekstremnih okoljskih pogojih. Glavne značilnosti njihove ekstremofilije so polimorfni življenjski krogi s spremenjanjem iz hidrofilnih v hidrofobne celice, ki imajo debele melanizirane celične stene, sposobnost oblikovanja v meristematske skupke, razmnoževanje tudi z endokonidiacijo, sposobnost adhezije na površine ter sinteza izvenceličnih polisaharidov (Butinar in sod., 2005c). Pojavljajo se na substratih z nizko vsebnostjo hrani in/ali z nizko vodno aktivnostjo, pri neoptimalnih temperaturah ter okoljih s povečanim UV sevanjem. Njihove prilagoditve na preživetje v ekstremnih pogojih jim omogočajo, da poseljujejo okolja, kjer drugi mikroorganizmi ne uspevajo. Meristematska rast je prilagoditev, značilna za preživetje pri skrajnostnih pogojih, ker zagotavlja optimalno razmerje med prostornino in površino struktur gline. Posebnost črnih kvasovk je tudi tvorba zunajceličnih polimerov – eksopolisaharidov (EPS), za katere domnevajo, da so splošno razširjen zaščitni sistem, ki obdaja hife, kvasne celice in konidije ter jih ščiti pred izsušitvijo in zmrzovanjem (Onofri in sod., 2007).

Debelina celične stene je neposredno povezana z visoko odpornostjo črnih kvasovk na okoljski stres. Celična stena vsebuje 1,8-dihidroksinaftalen (DHN) melanin, ki jih ščiti pred UV sevanjem, citotoksičnimi radikali, encimskimi napadi, visokimi temperaturami, sušo in pred visokimi koncentracijami težkih kovin. Veliko je znanih vrst, ki so se sposobne razmnoževati v skrajnostnih pogojih kot so skale v puščavah ali vdolbine marmorja, pri zelo visokih kot tudi pri zelo nizkih temperaturah (Hölker in sod., 2004).

Večina črnih kvasovk je sposobna tudi micelijske rasti in tvorbe konidijev iz fialid, na vretencih in na nediferenciranih konidiogenih celicah. Konidiji so lahko neseptirani ali septirani z do tremi prečnimi septami. Pri nekaterih rodovih lahko s fragmentacijo hif nastanejo tudi artrokonidiji. Zelo malo je vrst, ki nikoli ne izoblikuje hif (Sterflinger, 2006).

2.2 ROD *Hortaea*

Klasifikacija rodu *Hortaea*

Kraljestvo Glive

Deblo Ascomycota

Razred *Dothideomycetes*

Podrazred *Dothideomycetidae*

Red *Capnodiales*

Družina *Teratosphaeriaceae*

Rod *Hortaea* (Nishim. in Miyaji 1984)

Vrsta *Hortaea acidophila* Höker in sod., 2004

Hortaea thailandica Crous in K.D. Hyde, 2009

Hortaea werneckii (Horta) Nishimura in Miyaji, 1984

Rod *Hortaea* je bil opisan leta 1984 za vrsto *H. werneckii*. Zaradi posebne konidiogeneze, prepozname šele na ravni elektronske mikroskopije, je bila leta 1984 za vrsto narejena nova klasifikacija. Pred sedaj veljavno klasifikacijo vrste, *Hortaea werneckii* (Horta) Nishimura & Miyaji, postavljeno leta 1984, je bila vrsta sprva opisana kot *Cladosporium werneckii* Horta (1921), nato premeščena v rod *Exophiala*, kot *E. werneckii* (Horta) von Arx (1970) in vzporedno še v rod *Phaeoannellomyces*, kot *P. werneckii* (Horta) McGinnis & Schell (Abliz in sod., 2003; Cabanes in sod., 2012).

2.2.1 *Hortaea thailandica*

Vrsta je bila izolirana leta 2009 iz lezij listov rastline *Syzygium siamense* na Tajske in je umeščena kot rastlinski patogen. Micelij je temno rjave barve, gladek in septiran. Od vrste *H. werneckii* se loči po večjih konidijih, ki s starostjo postanejo temno rjavi in debelejši v konidiogeni regiji. Konidiji so elipsoidni, neseptirani, svetlo do srednje rjave barve in se s starostjo za razliko od vrste *H. werneckii* zadebelijo, podaljšajo in postanejo temno rjavi. Sporulacija kolonij je vidna na gojišču MEA. Glede filogenetske analize ITS regije

genoma sta si vrsti *H. thailandica* in *H. werneckii* sorodstveno bližji kot z *H. acidophila* (Crous in sod., 2009).

2.2.2 *Hortaea acidophila*

Vrsta je bila izolirana leta 2004 iz površine lignita kot edinega vira ogljika v suspenziji. Lignit ima zelo nizek pH ter visoko vsebnost alifatskih in aromatskih komponent. Izolati so imeli anelacijsko konidiogenezo, kar jih povezuje z rodovi črnih kvasovk *Exophiala* (Chaetothyriales) in *Hortaea* (Capnodiales). Glede na nukleotidna zaporedja SSU rDNA regij, sevi spadajo med askomicetni red Capnodiales, čeprav makromorfološko ne nakazujejo nobene podobnosti s pripadniki tega redu. Medsebojne genetske in fiziološke razlike med vrstami v redu Capnodiales in novim sevom *H. acidophila* so velike, saj vsi znani pripadniki redu kažejo toleranco na nizko vodno aktivnosti. Čeprav lahko sev uspešno raste pri nižjih pH vrednostih, ni halotoleranten. Analogije se kažejo na nivoju fiziologije, saj je sev sposoben razgradnje želatine ter rasti na različnih virih ogljika ter ne raste nad 30 °C (Hölker in sod., 2004).

Hölker in sodelavci domnevajo, da je ta sev hibrid dveh vrst črnih kvasovk. Ker trenutna taksonomska uvrstitev temelji na morfoloških značilnostih, spada sev v rod *Hortaea*. Zaradi velike razlike v nukleotidnem zaporedju ITS regije genoma seva *H. acidophila* od vrste *H. werneckii* ter zelo različne fiziologije predvidevajo, da ta sev ne spada v rod *Hortaea* (Hölker in sod., 2004).

2.3 *Hortaea werneckii*

Gliva *Hortaea werneckii* (Horta) Nishimura & Miyaji, 1984, spada med črne kvasovke. Živi v okoljih z zmanjšano vodno aktivnostjo, njena naravna ekološka niša so ekstremno slane vode naravno ali umetno nastalih solarnih solinah povsod po svetu. Poznana je kot kvarljivec slane hrane in povzročiteljica kožne mikoze *tinea nigra*. Slednja je znana kot površinska okužba človeških dlani in podplatov (Plemenitaš in sod., 2008; Zalar in sod., 1999). *H. werneckii* je najbolj ekstremno halotoleranten evkariontski organizem in zato služi kot modelni organizem za preučevanje ozmotolerance pri evkariontih (Abliz in sod., 2003).

2.3.1 Morfologija

Črna kvasovka *H. werneckii* je značilno polimorfna, kar je tudi vzrok, da se je njen poimenovanje v preteklosti tolkokrat spremenjalo (Zalar in sod., 1999). Kolonije so počasi rastoče, gladke in sluzaste, zračni micelj je olivno zelene do črne barve, gladek in septiran (Chen in sod., 2012). Reverz kolonij je olivno zelene do črne barve (Ng in sod., 2005). Hife so široke 6 µm, med staranjem kolonij postanejo gosto septirane, rjavo obarvane in imajo debelo celično steno. Na konidiogenih celicah, ki so nameščene interkalarno ali lateralno, so značilne 1–2 µm dolge anelacijske cone. Konidiji so sprva hialini, kasneje postanejo bledo olivne barve; običajno so elipsoidni; pogosto se preobrazijo v skupke hlamidospor, imenovane meristematski skupki (de Hoog in sod., 2000). Življenjski cikel *H. werneckii* obsega kvasno, filamentozno ter meristematsko obliko rasti, na obliko rasti pa vplivajo okoljski dejavniki (de Hoog in sod., 1992). Nekatere hife se lahko povežejo in tvorijo aggregate, nastanejo sklerociji (Ng in sod., 2005). Ko celice rastejo v skoraj nasičeni raztopini soli (30 % NaCl), se morfološko spremenijo, postanejo večje z debelejšo celično steno ter še vedno aktivno rastejo (Zalar in sod., 1999).

2.3.2 Fiziologija

Sevi vrste *H. werneckii* rastejo v razponu od 0 do 30 % NaCl v gojišču; slednja koncentracija je že skoraj saturacijska točka halita (Gunde-Cimerman in sod., 2000). Optimalna koncentracija NaCl za rast in razmnoževanje je od 5–10 %, bodisi v gojišču ali v okolju. Ob pogojih visoke slanosti se gliva morfološko spremeni, kar se večinoma odrazi v tvorbi velikih celic z debelo celično steno. Rast *H. werneckii* so primerjali na gojiščih z dodatkom ali brez soli. Opazili so, da je rast na gojišču brez soli v prvem tednu inkubacije hitrejša, po daljših časih inkubacije pa so večjo in intenzivnejšo rast ter tvorbo sluzi zaradi obilnega brstenja zaznali na gojišču z dodatkom soli. Torej je prisotnost soli eden od ključnih faktorjev rasti *H. werneckii* (Zalar in sod., 1999). Glive, ki naseljujejo izjemno slana okolja, imajo drugačne prilagoditve v primerjavi s halofilnimi prokarionti. Glivam sol ni nujno potrebna za njihovo rast, lahko pa rastejo pri celotnem razponu slanosti, od vode brez soli do nasičene slane raztopine. Glive, ki lahko rastejo v *in vitro* pogojih pri 3 M koncentracijah soli (a_w 0,85) in so jih redno izolirali iz različnih slanih okolij, kjer je bila koncentracija soli enaka ali višja od 1,7 M, so kategorizirane kot halofilne glive (Gunde-Cimerman in sod., 2005), medtem ko so sporadični izolati, ki lahko v *in vitro* pogojih rastejo pri 3 M koncentracijah NaCl kategorizirani kot halotolerantne glive (Gunde-Cimerman in sod., 2009).

H. werneckii lahko asimilira laktozo, nitrat in nitrit, zmožna je rasti v odsotnosti ali le pri majhnih koncentracijah L-lizina, kadaverina, kreatinina (de Hoog in sod., 1992). Vrsta ni sposobna razgradnje keratina, ima pa lipolitično aktivnost (Cabanes in sod., 2012). Zanjo je značilna tudi sinteza ureaze (Ng in sod., 2005).

Optimalna temperatura za rast *H. werneckii* je 25 °C, pri 37 °C ne raste (de Hoog in sod., 1992). Optimalno pH območje rasti glive je 6,0 (Chen in sod., 2012).

H. werneckii je obligatno aerobna vrsta. Z rastjo na glukozi kot edinem viru ogljika in energije je njen energetski metabolizem sestavljen iz glikolize in Krebsovega cikla (Abliz in sod., 2003).

2.3.3 Ekologija

Raziskave potencialne mikobiote evaporacijskih bazenov v Sečoveljskih solinah so pokazale, da je izjemno slana voda solinskih bazenov naravna ekološka niša *H. werneckii*. Vrsto so izolirali iz slane vode celotnega slanostnega območja solin (od koncentracije soli v morski vodi, 0,5 M do 5,1 M NaCl) s tremi prepoznavnimi vrhovih tekom sezone pridelave soli, ki kolerirajo z visokimi vrednostmi dušika v okolju. V mesecu avgustu pri 3 do 4,5 M koncentracijah NaCl v slanici, je *H. werneckii* predstavljala kar 90 % vseh izoliranih gliv, medtem ko se je pri koncentracijah pod 1,0 M NaCl pojavljala le sporadično (Gunde-Cimerman in sod., 2000). Isto vrsto so izolirali še iz osmih različnih solin na treh kontinentih, kar nakazuje na njeno globalno razširjenost, ne glede na geografsko širino (ob Sredozemskem morju v Španiji (Santa pola in Ebro River Delta) in Franciji (Camargue), vzdolž Atlantske obale na Portugalskem (Samuco) in v Namibiji (obala Skeleton), vzdolž obal v Dominikanski republiki (Monte Cristy) in v Portoriku (Fraternidad). Niso pa je izolirali iz oligotrofnih izjemno slanih voda, kot tudi ne iz vode atalasohalinih okolij (Mrtvo morje) in slanih jezer (Great Salt Lake) (Gunde-Cimerman in sod., 2005). Zaradi polimorfne življenjskega cikla lahko poleg slanice *H. werneckii* naseljuje tudi druge ekološke mikroniše v solinah, kot so lesene pregrade v evaporacijskih bazenih (Zalar in sod., 2005), biofilme na površini slanic, tla v izsušenih kristalizacijskih bazenih in solinske mikrobne preproge na dnu kristalizacijskih bazenov (Butinar in sod., 2005; Cantrell in sod., 2006).

Kot etiološki agens lahko kolonizira tudi človeške dlani in tako povzroča dermatomikozo imenovano *tinea nigra*. Izolirali so jo iz kliničnih vzorcev krvi ter abscesa vranice, vendar so domnevali, da gre za kontaminacije iz bolnišničnega zraka, saj gliva ni sposobna rasti pri 37 °C, ampak le pri sobni temperaturi (Ng in sod., 2005). Izolirali in identificirali so jo z okončin morskega prašička (Sharmin in sod., 2002), morske ribe in iz hišnega prahu pri bolniku s preobčutljivostjo (Abliz in sod., 2003). V Evropi so klinični izolati redki (Portugalska, Italija, Francija), pogosteji so v tropskem pasu (Mehika, Brazilija, Argentina, itd.). V Evropi so jo izolirali, kot že napisano, iz izjemno slanih solinskih voda (Gunde-Cimerman in sod., 2000), apnenca v stiku z morsko vodo (Sterflinger, 1998), iz

Sredozemske spužve, silikonske gume ter polietilenske plastike na potapljaški opremi iz Španije (Cabanes in sod., 2012). *H. werneckii* so izolirali tudi iz puščave Atacama v Čilu, nahajala se je na pajkovih mrežah in na stenah votline (Markuš, 2011), iz listov mangrove (Chen in sod., 2012), slanic slanih sirov (CBS 123850). Izolati iz morske vode so znani še z Japonske (Iwatsu in sod., 1988).



Slika 1: Svetovna razporeditev različnih izolatov *H. werneckii*.

Legenda: rdeče pike predstavljajo klinične izolate, zelene pike predstavljajo okoljske izolate.

2.3.3.1 Dinamika pojavljanja črnih kvasovk v Sečoveljskih solinah

Dominantna skupina gliv v solinskih vodah z visoko slanostjo so črne kvasovke ali meristematske askomicete iz redu Capnodiales (Gunde-Cimerman in sod., 2000). Izolirali so jih iz solinskih voda na treh različnih kontinentih, kar nakazuje njihovo globalno prisotnost v izjemno slanih solinskih vodah. V Sečoveljskih solinah se je število melaniziranih črnih kvasovk tekom sezone pridobivanja soli (od maja do septembra) trikrat drastično povečalo. Prva dva vrhova sta bila na samem začetku sezone pridobivanja soli, tretji vrh povečanja števila črnih kvasnih celic pa je bil proti koncu sezone produkcije soli. Gunde-Cimerman in sodelavci (2000) so pokazali, da do prvega povečanja števila melaniziranih črnih kvasovk pride zgodaj spomladti, ko so solinske bazene, ki so bili čez zimo suhi, ponovno napolni z vodo. Do pojava najverjetneje pride zaradi pokrivanja

bazenov s slanico, ki je bila med zimo shranjena v rezervoarjih. Do drugega porasta števila črnih kvasovk pride spomladi z vse daljšimi in toplejšimi dnevi samo v bazenih s slanostjo do 10 % NaCl. Tretji vrh povečanega števila črnih kvasovk pa so v vseh kristalizacijskih bazenih zaznali v glavni sezoni pridobivanja soli. Črne kvasovke so se pojavile, ko je voda v bazenu dosegla slanost 22–25 Beumejev, kar približno ustreza 22–25 % NaCl, oziroma vse do nasičene raztopine, ko precipitira halit.

Tekom sezone pridobivanja soli se je sestava glivne združbe gradientno spreminja. Spomladi ter na začetku same sezone so melanizirane gliche večinsko pripadale rodu *Cladosporium*, tekom same sezone pridobivanja soli ter naraščajočo koncentracijo halita v vodi so vrste rodu *Cladosporium* postopoma zamenjale druge vrste halofilnih črnih kvasovk, ki so bile na koncu sezone popolnoma dominantne v solinski vodi. *Hortaea werneckii* je bila dominantna vrsta preko celotne sezone pridobivanja soli, prisotna je bila v vodi tudi po končani sezoni. Rastla je v celotnem slanostnem razponu, od 0 do 30 % NaCl. Koncentracija soli, ki je bila optimalna za rast je bila od 10 do 17 % NaCl. Črno kvasovko *Phaethotheca triangularis* so najpogosteje izolirali iz mikrobnih biofilmov, ki so se tvorili na površini solinske vode in mikrobnih preprog. Primarni habitat *P. triangularis* so torej različne adhezivne površine, ki so pokrite s slanico, rastla je v slanostnem rangu od 0 do 24 % NaCl, optimalna koncentracija za rast je bila od 6 do 12 % NaCl. Črno kvasovko *Trimmatostroma salinum* so najpogosteje izolirali iz lesenih struktur, ki so bile potopljene v slanico, solinska voda je torej sekundarni habitat obeh vrst *P. triangularis* in *T. salinum*. *T. salinum* je rastla v slanostnem območju od 0 do 25 % NaCl. Črno kvasovko *Aureobasidium pullulans* so izolirali iz solinske vode slanosti do 8 % NaCl, pojavljala se je zgolj sporadično, čeprav je v *in vitro* pogojih rastla od 0 do 17 % soli v gojišču. Optimalno raste brez prisotnosti soli, zato je *A. pullulans* halotolerantna črna kvasovka. Gliche iz rodu *Cladosporium* so iz okoljskih vzorcev izolirali pri slanostih med 15 in 25 % NaCl (Butinar in sod., 2005c).

2.3.4 Patogeneza

Melanizirana črna kvasovka *H. werneckii* povzroča površinsko mikozo imenovano *tinea nigra*. Redka asimptomatska okužba je omejena predvsem na tropske in subtropske predele

sveta (predeli Južne Amerike, Azije, Indonezije), manj pogosto se pojavlja v Evropi in ZDA. Simptomi, ki se kažejo kot hiperkromični plaki, se najpogosteje se pojavljajo na dlaneh in podplatih, vendar se lahko pojavijo tudi na drugih predelih telesa (Bonifaz in sod., 2008).



Slika 2: *Tinea nigra*, površinska mikoza (Mycology Adelaide, 2013).

Gliva povzročiteljica je lipofilna, adhezira le zgornji del epidermisa (stratum corneum) in se ne razširja v globlje predele kože (Cabanes in sod., 2012). *Tinea nigra* se je dolga leta smatrala kot okužba in zato je *H. werneckii* uvrščena v skupino organizmov BSL2 (anlg. BioSafety Level 2). Kasnejše raziskave so pokazale, da je *tinea nigra* subklinična okužba, saj so kolonizirane le mrtve celice kože, odsotna je keratinoliza, adhezijo glivnih celic na dlaneh pa je moč pojasniti s hidrofobnim značajem kvasnih celic; potenje je vir presežka natrijevih ionov, kar halotolerantni glivi daje prednost pri naselitvi kože. Večina dokumentiranih bolnikov je izvirala iz podeželskih območij v tropskih, vlažnih predelih. Večina teh dokumentiranih bolnikov je živila v bližini morja, slanih močvirij ali rečnih estuarjev, kjer ni bilo prisotnih nobenih rizičnih dejavnikov za glivično okužbo. Hiperhidroza rok je bila prisotna pri bolniku, ki se je poklicno ukvarjal s solinarstvom. Dejavniki tveganja za okužbo so torej hiperhidroza ter bivanje v naravnem okolju povzročitelja, v slanih okoljih. Okužba ni odvisna od starosti in spola bolnika. Število diagnosticiranih primerov je majhno, ravno zaradi asimptomatske narave okužbe, gre bolj za kozmetični problem. Črno rjave makule na rokah postanejo vidne 15 do 30 dni po okužbi in so nepravilnih oblik, večinoma brez znakov vnetja. Za zdravljenje se uporablja keratinolitična sredstva (sečnina, salicilna kislina, Whitfield mazilo), izboljšanje se pokaže

že po 15 dneh. Obsežnejšo okužbo pa je potrebno zdraviti z antimikotiki (mikonazol, ketokonazol, bifonazol, terbinafin in ciklopiroks olamin) (Bonifaz in sod., 2008).

2.3.5 Prilagoditve na slana okolja

Ko so mikrobne celice izpostavljene visokim koncentracijam soli, pride do hiperosmotskega šoka ter hitrega osmotskega odgovora, ki se kaže v izgubi turgorja in volumna pri neprilagojenih celicah, medtem ko se pri na slanostni stres prilagojenih glivah kopičijo kompatibilni topljenci (Kogej in sod., 2005). Pri visokih slanostih v okolju halotolerantne in halofilne glice vzdržujejo pozitivni turgorski tlak s povečano tvorbo in kopičenjem glicerola in tudi drugih poliolov (eritritol, inositol, arabitol, ksilitol in manitol) ter mikosporinov (Kogej in sod., 2007; Plemenitaš in sod., 2008).

Ekstremni pogoji, ki definirajo naravno okolje *H. werneckii*, zahtevajo učinkovite celične mehanizme, da lahko celice kljubujejo visokim koncentracijam soli v okolju in toksičnim anorganskim ionom (Lenassi in sod., 2013). Vrsta ima različne načine prilagoditve na življenje v slanem okolju, tako na nivoju sestave in fluidnosti plazemske membrane (Turk in sod., 2004, Turk in sod., 2007), vzdrževanje nizke koncentracije ionov v citoplazmi in na nivoju sinteze kompatibilnih topljencev (Kogej in sod., 2005; Kogej in sod., 2007), kot tudi na nivoju melanizacije celične stene (Kogej in sod., 2002), različne genske ekspresije in signalizacije (Plemenitaš in sod., 2008).

2.3.5.1 Kompatibilni topljenci *H. werneckii*

Osmoadaptacija na slano okolje je pri *H. werneckii* osredotočena na glicerol, ki je najpomembnejši kompatibilni topljenec te črne kvasovke (Petrovič in sod., 2002). Ko celice rastejo v okolju z visoko slanostjo, poleg glicerola v manjših količinah kopičijo tudi mešanico drugih organskih komponent, poliole eritriol, arabitol in manitol ter mikosporine. Njihova količina je odvisna od slanosti okolja v katerem gliva živi ter od rastne faze glivne kulture: z višanjem slanosti v okolju se povečuje količina glicerola. Pri nizkih slanostih *H. werneckii* kopiči mešanico glicerola, eritritola, arabitola in manitola. Pri

najvišjih slanostih prevladujeta samo glicerol in eritritol v eksponentialni rastni fazi, v stacionarni fazi pa tudi mikosporin – glutaminol – glukozid (Kogej in sod., 2007).

A

	brez NaCl	0,86 M NaCl	1,71 M NaCl	2,91 M NaCl	3,42 M NaCl	4,28 M NaCl
Glicerol	0,244	1,259	2,294	2,458	2,823	2,941
Eritritol	0,026	0,104	0,314	0,309	0,252	0,275
Arabitol	0,315	0,165	0,043	0	0	0
Manitol	0,249	0,155	0,018	0	0	0
Mik-gln-glk	0,011	0,003	0,008	0,004	0,003	0,003

B

	brez NaCl	0,86 M NaCl	1,71 M NaCl	2,91 M NaCl	3,42 M NaCl	4,28 M NaCl
Glicerol	0,021	0,102	0,021	1,243	1,225	0,929
Eritritol	0,016	0,420	0,597	0,728	0,557	0,544
Arabitol	0,128	0,067	0,004	0	0	0
Manitol	0,443	0,087	0	0	0	0,37
Mik-gln-glk	0,060	0,159	0,146	0,036	0,024	0,019

Slika 3: Kompatibilni topljenci pri vrsti *H. werneckii* (Kogej in sod., 2007; Plemenitaš in sod., 2008)

Legenda: izmerjene znotrajcelične koncentracije poliolov in mikosporina – glutaminol-glukozid (myc-gln-glc) pri rasti na različnih slanostih; A logaritemska faza rasti, B stacionarna faza rasti. Vrednosti v mmol / g suhe teže.

2.3.5.2 Osmotska regulacija s kopiranjem znotrajceličnih ionov

Zunanji proteini plazemske membrane *H. werneckii* so kisli, zato so v preteklosti domnevali, da vrsta poleg glicerola kopiči visoke koncentracije kationov za adaptacijo na osmotski šok ob povišani slanosti okolja. *H. werneckii* natrijeve ione izključuje, čeprav raste v zelo slanem okolju. Zato predvidevajo, da ioni ne prispevajo k ozmoadaptaciji, pač pa da kompatibilni topljenci uravnovesijo ozmotsko neravnotežje (Kogej in sod., 2005).

Znotrajcelično kopiranje kalijevih K^+ in natrijevih Na^+ ionov je pri *H. werneckii* tudi pri zelo visokih slanostih v okolju (4,5 M NaCl) nizko, kar izključuje osmotsko prilagajanje na povišano slanost z uporabo znotrajceličnih ionov (Kogej in sod., 2007). Nizke koncentracije znotrajceličnih ionov kažejo na to, da ima *H. werneckii* uspešen mehanizem izločanja ionov, ki omogoča, da so te koncentracije tudi pri visokih slanostih nizke. Pri

prilagajanju celic na okolja z različno slanostjo imajo veliko vlogo različne ionske črpalke, ki se nahajajo v membrani, kot npr. ENA ATPaze (Gorjan in Plemenitaš, 2006).

2.3.5.3 Melanizacija celične stene *H. werneckii*

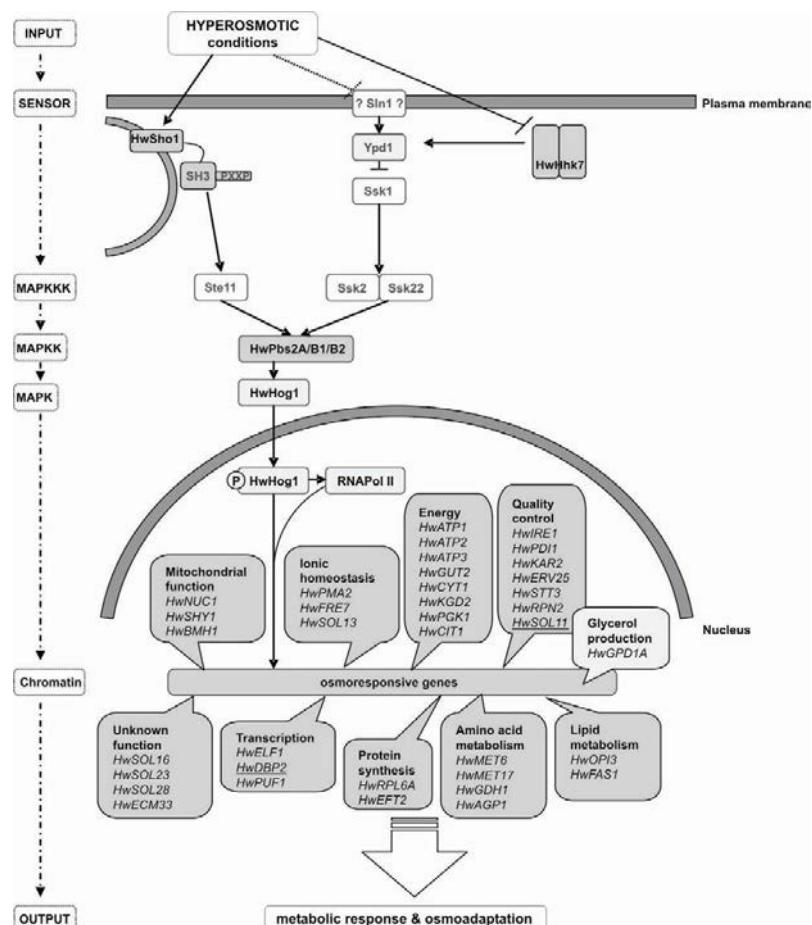
Melanini so skupina pigmentov (temno rjave do črne barve) z različno molekulsko maso, sestavljeni iz kompleksnih molekul, ki so negativno nabite in hidrofobne. So široko zastopani pri mikroorganizmih, rastlinah, živalih in ljudeh. Glive tvorijo melanine iz različnih prekurzorjev, 1,8-dihidroksinaftalen (DHN), iz tirozina preko 3,4-dihidroksifenilanin (DOPA) ter iz glutaminil-4-hidroksibenzena in katehola. Melanin ima pomembno vlogo pri preživetju gliv v ekstremnih okoljih saj omogoča odpornost gliv na sevanje iz okolja, celice zaščiti pred encimsko lizo, ekstremnimi temperaturami, oksidativnimi agensi in osmotskim stresom (Kejžar in sod., 2013). Melanin ščiti *H. werneckii* pred visokimi koncentracijami NaCl v njenem naravnem habitatru, izjemno slanih solinskih vodah (Kejžar in sod., 2013).

Prisotnost melanina v celični steni zmanjša izgube glicerola pri nizkih koncentracijah soli v okolju (Kejžar in sod., 2013). *H. werneckii* sintetizira DHN melanin v prisotnosti ali odsotnosti soli v okolju. Slanost okolja vpliva na sam proces melanizacije celic. Pri celicah, ki rastejo v okolju brez NaCl, so granule melanina urejene v tanko plast na zunanjih strani celične stene. Ko celice rastejo pri optimalni slanosti okolja, oblikujejo debelo plast melaninskih granul na zunanjih strani celične stene. Pri višjih koncentracijah soli so granule melanina večje in redke ter ne tvorijo kontinuirane plasti zunaj celične stene. Celice *H. werneckii* so torej gosto melanizirane pri nižjih in optimalnih slanostih, medtem ko je pri višjih slanostih melanizacija celic zmanjšana (Kogej in sod., 2007; Plemenitaš in sod., 2008). Ob prisotnosti inhibitorjev DHN sinteze melanina (triciklazol) v okolju je bila melanizacija celic prekinjena. Če so bile takšne celice izpostavljene povečani slanosti v okolju, so se povečale ter tvorile skupke.

Melanin ni imel zaščitne vloge pri izpostaviti celic *H. werneckii* oksidativnemu stresu, povzročenem z vodikovim peroksidom (H_2O_2), saj je dobro deloval znotrajcelični H_2O_2 degradacijski sistem (Kejžar in sod., 2013).

2.3.5.4 Razlike v izražanju genov kot odgovor na povečano osmolarnost

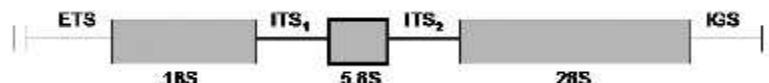
Črna kvasovka *H. werneckii* je dobro prilagojena na nihanja koncentracij NaCl v okolju. Različno izražanje genov pri celicah, ki so rastle pri različnih koncentracijah soli v gojišču, predstavlja transkripcijski odgovor prilagojenih celic na višje koncentracije soli. Odkrili so 95 osmoodgovornih genov, ki se različno izražajo v visokih slanostih, več kot polovica teh pa je bila odgovorna za osnovni in energetski metabolizem. Geni SOL predstavljajo transkripcijski odgovor, ki je edinstven za *H. werneckii*, saj teh genov niso odkrili pri drugih sorodnih organizmih. Geni, ki so odgovorni za regulacijo celičnega metabolizma v izjemno slanem okolju, so v celoti odvisni od MAP kinaze Hog1, kar kaže na to, da je signalna pot Hog1 ključna za regulacijo genov v slanih razmerah (Plemenitaš in sod., 2008).



Slika 4: Model HOG signalne poti, ki je odgovor ekstremno halofilne *H. werneckii* na prilagoditev v izjemno slanem okolju (Plemenitaš in sod., 2008).

2.3.6 Molekularni markerji za identifikacijo gliv

Genetske metode so zaradi visoke občutljivosti in specifičnosti zelo uporabne za identifikacijo mikroorganizmov (Abliz in sod., 2004). Gen 16S rRNA je tarčni gen za filogenetske študije bakterijskih in arhejskih izolatov, pri glivah pa je v uporabi za študij glivne taksonomije in raznolikosti več regij genoma, kot npr. majhna podenota (SSU) in velika podenota (LSU) rRNA genov, regija notranjih distančnikov (ITS), ki ločuje dva rRNA gena (Liu in sod., 2011). Glavna filogenetska razporeditev vrste *H. werneckii* temelji na nukleotidnih zaporedjih ITS rDNA regije in RAPD prstnih odtisih SSU rDNA in ITS rDNA regije (de Hoog in sod., 1999). ITS regija se nahaja med 18S in 28S rDNA regijama ribosomske DNA, vsebuje dva notranja distančnika (ITS₁ in ITS₂), ki ju ločuje 5.8S konzervativna regija (Abliz in sod., 2003). Domeni D1 / D2 velike podenote ribosomske DNA (LSU rRNA) veljata kot glavni molekularni marker za identifikacijo večine askomicetnih kvasovk, bazidiomicet ter medicinsko pomembnih zigomicet. Za identifikacijo in uvrstitev večine poznanih gliv se kot zanesljivejši marker uporablja regija LSU (Abliz in sod., 2004).



Slika 5: Shematski prikaz splošne organizacije ribosomalnih genov pri glivah (Diaz Munoz in sod., 2005).

Legenda: ETC regija zunanjih distančnikov; 18S (SSU) majhna podenota; ITS regija notranjih distančnikov; 28S (LSU) velika podenota; 5,8 S podenota.

Za identifikacijo vrste znotraj askomicet so v uporabi naslednji molekularni markerji: LSU, SSU TEF1, RPB1, RPB2 (Schoch in sod., 2009). Študije znotrajvrstne variabilnosti *H. werneckii* so de Cock in sodelavci (1994) naredili tudi z RFLP tehnikami mitohondrijske DNA (mtDNA), na podlagi katerih so videli variabilnost, pojav več ločenih skupin. Sama metoda RFLP je uporabna za razlikovanje znotrajvrstnih skupin gliv (de Cook, 1994). Pravtako so Zalar s sodelavci (1999) na podlagi RFLP tehnike jedrne DNA (rDNA) *H. werneckii* videli znotraj vrstne raznolikosti, obstoj treh različnih rDNA RFLP profilov. Primerjali so tudi nukleotidna zaporedja regije ITS izbranih sevov ter ugotovili, da je vrsta na podlagi regije ITS1 porazdeljena v štiri podskupine (Zalar in sod., 1999). De Hoog je s

sodelavci (1999) na osnovi regije 5.8S rDNA in regije ITS2 predstavil dve ločeni filogenetski podskupini znotraj vrste *H. werneckii* z zadostno podporo. Ugotovili so, da je taksonomski položaj vrste še vedno nejasen, saj povezave s telemorfnimi oblikami niso znane (de Hoog in sod., 1999). Ng, Cabanes in Chen s sodelavci so na podlagi filogenetskih analiz LSU in ITS regije genoma *H. werneckii* videli znotrajvrstne raznolikosti in znotraj vrste *H. werneckii* grupirali več različnih skupin (Ng in sod., 2005, Chen in sod., 2011, Cabanes in sod., 2012). Abliz in sodelavci (2003) so skonstruirali specifične začetne oligonuklotide Hor-F in Hor-R znotraj hipervariabilne regije ITS za detekcijo *H. werneckii* v vzorcih celokupne DNA (Abliz in sod., 2003).

Fag M13 je univerzalen marker / DNA sonda za detekcijo variabilnosti DNA različnih taksonomskih skupin (tako pri živalih, rastlinah kot tudi pri mikroorganizmih). Individualni specifični restrikcijski vzorci - DNA prstni odtis (angl. Fingerprinting), ki nastanejo pri tej reakciji, so uporabni za individualno identifikacijsko analizo somatske stabilnosti posameznih vrst. Determinirali so tudi, da so hipervariabilne regije organizmov locirane na kromosomih in ne na mitohondrijski DNA. (Ryskov in sod., 1988).

2.3.7 Genom *H. werneckii*

Lenassi in sodelavci (2013) so določili nukleotidno zaporedje celotnega genoma *H. werneckii*, seva EXF-225, katerega velikost znaša 51,6 Mb. Ostali znani genomi gliv reda Capnodiales variirajo v velikosti (od 21,88 do 74,12 Mb). Vsebnost GC baznih parov v genomu *H. werneckii* je relativno visoka in znaša 54 %, na kodirajočih regijah pa je ta odstotek še višji (56 %). Vsebnost ponovljivih zaporedij je kljub velikemu genomu nizka (1,02 %). Genom vsebuje veliko število genov, kar je rezultat evolucijsko nedavne celotne podvojitve celotnega genoma (ang. whole genome duplication WGD), s katerim je gliva pridobila skoraj dve identični kopiji vsakega protein-kodirajočega gena. Kar 90 % genov pri analiziranem sevu *H. werneckii* obstaja v vsaj dveh kopijah. Zaporedje genoma kaže številne funkcije, ki se skladajo z edinstvenim načinom življenja in halotoleranco vrste. Dve lastnosti še posebej izstopata, velika genetska redundanca, verjetno zaradi evolucijske genomske podvojitve in razširitev družin genov, ki kodirajo kovinske kationske transporterje (Lenassi in sod., 2013).

2.4 KLASIČNA DETEKCIJA GLIV V VZORCIH VODE

Izolacija gliv iz vodnih okolij s klasičnimi gojitvenimi metodami je v uporabi že vrsto let. Gre za metodo membranske filtracije z uporabo nitroceluloznih membranskih filtrov premera por 0,45 µm oz. 0,22 µm. Filtre so inkubirali na klasičnih gojiščih (MEA, MA, PDA, SGM) ter spremljali rast glivnih kolonij. Po izolaciji čiste kulture gliv iz mešane kulture so z različnimi metodami izolacije DNA (z mehansko lizo, z encimsko lizo) izolirali DNA ter glive rodovno in vrstno identificirali po pomnoževanju specifičnih odsekov s PCR metodo z uporabo univerzalnih začetnih nukleotidov (Cantrell in sod., 2006; Diaz Munoz in sod., 2005; Gunde-Cimerman in sod., 2000; Zalar in sod., 1999).

2.5 MOLEKULARNA DETEKCIJA GLIV V VZORCIH OKOLJSKE CELOKUPNE DNA

2.5.1 Molekularni pristopi detekcije gliv

Pri odkrivanju celokupne mikrobne raznolikosti v okoljskih vzorcih je najprimernejša uporaba molekularnih metod (Hou in sod., 2013). Razvili so širok nabor molekularnih pristopov k identifikaciji mikrobne diverzitete znotraj posameznih okolij. To je pomembno predvsem zato, ker so klasični pristopi izolacije omejeni na gojljive mikroorganizme, mnoge pa ni mogoče gojiti, a vendar so v okolju prisotni (Manter in sod., 2007).

Veliko tehnik identifikacije tako negojljivih kot gojljivih organizmov temelji na metodi verižne reakcije z polimerazo (PCR), s katero pomnožimo gene, ki jih želimo nadalje analizirati. Za to uporabimo naslednje metode: enoverižni konformacijski polimorfizem (SSCP), polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP), terminalni RFLP, gelsko elektroforezo s temperaturnim ali denaturacijskim gradientom (TGGE in DGGE), analizo pomnoženih rRNA intergenskih vmesnikov (ARISA) ter heterogenost dolžine PCR (LH-PCR). Prvi korak vsake od teh metod je analiza PCR produkta specifičnih genov za nadaljnjo detekcijo, ki pa je odvisen od specifičnosti in občutljivosti samih začetnih oligonukleotidov, na podlagi katerih lahko potem sklepamo o taksonomskeh in funkcionalnih skupinah znotraj okoljskih vzorcev (Manter in sod., 2007).

2.5.2 Vgnezdena PCR metoda

Strategija detekcije specifične vrste gliv iz vzorcev celokupne okoljske DNA z uporabo vgnezdenje (angl. nested) PCR metode in nadalje uporabo gelske elektroforeze z denaturacijskim gradientom (DGGE) kot metode prstnega odtisa gliv v vzorcu se je izkazala za zelo uspešno in uporabno za zaznavanje vrstne glivne diverzitete v mešanih okoljskih vzorcih (Hou in sod., 2013). Uporaba kompleta začetnih nukleotidov ITS1F in ITS4 za pomnoževanje celotne ITS regije gliv se je izkazala za zelo uspešno, saj imata začetna oligonukleotida visoko specifičnost za zaznavo tako askomicetnih, bazidiomicetnih in zigomicetnih gliv iz mešanih vzorcev (Manter in sod., 2007).

2.5.3 Kvantitativna metoda verižnega pomnoževanja s polimerazo (qPCR)

Do sedaj opisane metode so tipične za uporabo določanja raznolikosti posameznih vrst znotraj večjega vzorca prisotnih organizmov. Pri določanju celotne tarčne skupine znotraj večje populacije organizmov v okoljskem vzorcu, je posebej uporabna metoda kvantitatvenga PCR (qPCR), ki jo lahko uporabimo za določanje številčne prisotnosti specifične filogenetske skupine mikroorganizmov (gliv) v vzorcih. Prednost uporabe te metode pred klasično PCR metodo je v tem, da lahko s qPCR merimo natančno količino pomnožkov, ki jih detektiramo ter merimo nizke koncentracij DNA. Metoda meri fluorescenco reporterskih molekul (npr. Sybr green), medtem ko količina PCR produktov narašča med cikli pomnoževanja in omogoča primerjavo vzorcev med eksponentno fazo. Reporterska molekula Sybr green je pri mešanih vzorcih celokupne DNA najboljša izbira, ker je manj specifična kot so Taqman in ostale sekvenčno specifične sonde (Manter in sod., 2007).

3 MATERIALI IN METODE

V tem poglavju so navedeni materiali in metode, ki smo jih uporabili tekom našega eksperimentalnega dela.

3.1 GOJIŠČA, RAZTOPINE, LABORATORIJSKA OPREMA IN REAGENTI

3.1.1 Gojišča

Gojišča smo pripravili tako, da smo vse sestavine razen agarja raztopili v polovičnem volumnu destilirane vode. Nato smo dodali agar in dolili destilirano vodo do končnega volumna, enega litra. Po potrebi smo uravnivali pH gojišča s HCl ali NaOH. Gojišča smo sterilizirali v avtoklavu 15 min pri 121 °C, jih ohladili na 55 °C in aseptično razlili v sterilne plastične petrijevke s premerom 90 mm. Strjena gojišča smo do uporabe hranili v hladilniku (4 °C).

MEA (Malt Extract Agar) (Samson in sod., 2004) (po Blakeslee-ju)

Sladni ekstrakt	20 g
Pepton	1,0 g
Glukoza	20 g
Agar	20 g
Destilirana voda	do 1000 ml
pH 5,0 – 5,5	

MEA (Malt Extract Agar) + 10 / 20 / 25 / 30 % NaCl

Osnovnemu MEA gojišču smo dodali 100 / 200 / 250 / 300 g NaCl.

MEA (Malt Extract Agar) s kloramfenikolom (Ch):

Osnovnemu MEA gojišču smo pred avtoklaviranjem dodali 0,05 g antibiotika kloramfenikol (Ch).

3.1.2 Raztopine

CTAB pufer

Tris 2,42 g
 NaCl 8,2 g
 Na-EDTA 0,74 g
 CTAB 2,0 g
 Bidestilirana voda do 100 ml
 pH 7,5; uravnamo z 1M HCl

TE pufer

Tris 0,12 g
 Na-EDTA 0,04 g
 Bidestilirana voda do 100 ml
 pH 8,0; uravnamo z 1M HCl

Pufer 1x TAE

Tris baza 242,0 g
 Ocetna kislina 57,1 ml
 0,5 M EDTA (pH 8) 100 ml
 Destilirana voda do 1000 ml

50x TAE pufer smo 50x redčili z destilirano vodo in dobili 1x TAE pufer, ki smo ga uporabili.

5x nanašalni pufer

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

Nanašalni gel

Agaroza 0,4 g

1x TAE pufer 40 ml

Fiziološka raztopina

NaCl 9 g

Destilirana voda do 1000 ml

0 % DGGE raztopina

20 ml 40 % Akrilamid reagent

2 ml 50x TAE

Destilirana voda do 100 ml

80 % DGGE raztopina

20 ml 40 % Akrilamid reagent

2 ml 50x TAE

33,6 g Urea

32 ml Formamid

Destilirana voda do 100 ml

10 % APS (amonijev persulfat)

1 g APS

Destilirana voda do 10 ml

3.1.3 Komercialni kompleti

Ultra Clean™ Water DNA Isolation Kit, 14800-25-NF; MoBio, ZDA

Ultra Clean™ Water DNA Isolation Kit, 14880-25-NF; MoBio, ZDA

PowerWater® Sterivex™ DNA Isolation Kit (For isolation of genomic DNA from Sterivex™ filter units Millipore, 14600-50-NF; MoBio, ZDA

PowerWater® DNA Isolation Kit (For isolation of genomic DNA from membrane filtered water samples), 14900-50-NF; MoBio, ZDA

Power Biofilm™ DNA Isolation Kit (For isolation of genomic DNA from biofilm including microbial mats), 24000-50; MoBio, ZDA

Power SYBR Green PCR Master Mix, Life Technologies, ZDA

3.2 LABORATORIJSKE APARATURE IN KEMIKALIJE

3.2.1 Laboratorijske aparature

V preglednici 1 so navedene laboratorijske aparature, ki smo jih uporabili pri našem delu.

Preglednica 1: Seznam uporabljenih naprav in njihovi proizvajalci.

Naprava	Proizvajalec
Avtoklav A-63C	Kambič, Slovenija
Bunsenov gorilnik	TLOS, Zagreb, Hrvatska
Centrifuga	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Vakuumska črpalka	ASF Thomas ,Nemčija
Črpalka Pharmacia LKB Pump P-1	Pharmacia
Digestorij Variolab Molibien W90	Waldner, Wangen, Nemčija
Digitalna kamera DP12	Olympus, Tokio, Japonska
DGGE elektroforezni sistem BioRad D Code TM System	BioRad, ZDA
Električni transformator za elektroforezo Consort E143	Sigma-Aldrich, St, Luis, MO, ZDA
Elektroforezna banjica BioRad SubCell GT	BioRad, ZDA
Filtri Millex s premerom por 0, 45 µm	Millipore Corporate Headquarters, ZDA
Filtri Stervex TM	Millipore Corporate Headquarters, ZDA
Filtrirni sistem	Millipore Corporate Headquarters, ZDA
Homogenizator MM301	Retsch, Nemčija
Laminarij IBK 1V2	Iskra, Slovenija
Krožni mešalnik (The Belly dancer)	Stovall Life Science, ZDA
Magnetno mešalo Rotamix 550MMH	Tehnica, Železniki, Slovenija
Mikroskop Olympus BX51	Olympus, Tokio, Japonska
Mikrovalovna pečica	Gorenje, Slovenija
Nanodrop 1000 Spectrophotometer	Thermo scientific, ZDA
PCR sistem	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
pH meter Metrom 713	Železniki, Slovenija
Rastna komora	Kambič, Slovenija
Step one + Real Time PCR System	AB Applied Biosystems, ZDA
Stereomikroskop Steri SV11 z virom svetlobe KL1500 LCD	Zeiss, Oberkochen, Nemčija
Tehnica ET-1111	Tehnica, Železniki, Slovenija
Termoblok	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Transiluminator	Syngene G Box
Vodna kopel	Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska
Vrtinčasto mešalo (vortex)	Železniki, Slovenija
Vortex adapter Cat. #13000-V1-15	MoBio, ZDA

3.2.2 Kemikalije

V preglednici 2 so navedene kemikalije, v preglednici 3 pa začetni nukleotidi za pomnoževanje specifičnih odsekov DNA, ki smo jih uporabili pri našem delu.

Preglednica 2: Seznam uporabljenih kemikalij in njihovi proizvajalci.

Kemikalija	Proizvajalec
Agar-agar	Fluka
NaCl	Carlo Erba, Italija
Pepton	Merck, Darmstadt, Nemčija
Malt Extract	Biolife, Milano, Italija
Glukoza (D-glukoza)	Kemika, Zagreb
TEMMED	Sigma Aldrich, Nemčija
Formamid	Merck, Darmstadt, Nemčija
Urea	Merck, Darmstadt, Nemčija
Akrilamid reagent (40% raztopina)	BioRad / Sigma Chemical C., St. Luis, Mo., ZDA
Amonijev per-sulfat	Sigma Aldrich, Nemčija
Agaroza (Agarose for Routine)	Sigma Aldrich, Nemčija
Sybr safe	In Vitro gen
dNTP	Applied Biosystems, California, ZDA
Etanol 96%	Chemo d.d., Ljubljana, Slovenija
10x PCR pufer brez MgCl ₂	Fermentas. Life Sciences, Litva
Lestvica: "100bp DNA Ladder Plus"	Fermentas. Life Sciences, Litva
Lestvica: "1 kbp DNA Ladder Plus"	Fermentas. Life Sciences, Litva
RNA-ze	Fermentas. Life Sciences, Litva
Taq polimeraza (5U/μl)	Fermentas. Life Sciences, Litva
Master Mix	Fermentas. Life Sciences, Litva
Master Mix Real Time PCR	Fermentas. Life Sciences, Litva
CTAB	Sigma Aldrich, Nemčija
Na-EDTA	Kemika, Zagreb
HCl	Kemika, Zagreb
Kloroform	Kemika, Zagreb
Bromtimol modro	Sigma Aldrich, Nemčija
Kloramfenikol	Sigma Aldrich, Nemčija
Tris baza	Sigma Aldrich, Nemčija

Preglednica 3: Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili za pomnoževanje različnih odsekov genoma *H. werneckii*.

Legenda: Iz založne koncentracije smo pripravili raztopino s koncentracijo 10 pM in jo do uporabe hranili pri – 20 °C.

Ime	Zaporedje 5'→3'	Avtor
ITS4	TCCTCCGCTTATGATATGC	White in sod. (1990)
ITS5	GAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White in sod. (1990)
ITS1F	CTGGGTCAATTAGAGGAAGTAA	Gardes in Bruns (1993)
ITS2	GCTCGTTCTCATCGATGC	White in sod. (1990)
D1/D2-NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	Boekhout in Kurtzman (1996)
D1/D2-NL4	GGTCCGTGTTCAAGACGG	Boekhout in Kurtzman (1996)
EF1-983F	GCYCCYGGHCA CGTGAYTTYAT	Rehner (2001)
EF1-2218R	TGACACCRACRGCRACRGTYTG	Rehner (2001)
EF1-728 F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	Carbone in Kohn (1999)
EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCTTACC	Carbone in Kohn (1999)
fRPB2 – 5F	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	Liu in sod. (1999)
fRPB2 – 7cR	CCCATRGCTGYTTRCCCAT	Liu in sod. (1999)
T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	O'Donnell in Cigelnik (1997)
T22	TCTGGATGTTGGGAATCC	O'Donnell in Cigelnik (1997)

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 3: Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili za pomnoževanje različnih odsekov genoma *H. werneckii*.

Ime	Zaporedje 5'→3'	Avtor
BT2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTC	Glass in Donaldson (1995)
BT2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTGGC	Glass in Donaldson, (1995)
CAL 228 F	GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC	Carbone in Kohn (1999)
CAL 737 R	CATCTTCTGGCCATCATGG	Carbone in Kohn (1999)
HOR-F	TGGACACCTTCATAACTCTTG	Abliz in sod. (2003)
HOR-R	TCACAACGCTTAGAGACGG	Abliz in sod. (2003)
M13 F	GTAAAACGACGGCCAGT	Andrighetto in sod. (2000)

3.3 METODE

3.3.1 Morfološka analiza glivnih izolatov črnih kvasovk vrste *H. werneckii*

Želeli smo preveriti makromorfološko variabilnost kolonij *H. werneckii* izolatov iz različnih okolij ter različnih geografskih lokacij na gojiščih z dodanimi različnimi koncentracijami soli. Pripravili smo gojišča MEA z različnimi količinami dodane soli NaCl ter izmerili njihovo vodno aktivnost (a_w).

Preglednica 4: Vodna aktivnost (a_w) gojišč MEA z različnimi dodatki soli.

Gojišče	a_w vrednost
MEA + 10 % NaCl	0,935
MEA + 20 % NaCl	0,849
MEA + 25 % NaCl	0,802
MEA + 30 % NaCl	0,756

Iz zbirke ekstremofilnih mikroorganizmov EX smo izbrali 32 sevov *H. werneckii* osamljenih iz različnih naravnih habitatov. Sevi so trajno shranjeni in vključeni v zbirko EX, ki je del Mreže infrastrukturnih centrov Univerze v Ljubljani (MRICUL) in deluje v okviru IC Mycosmo na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Trajno shranjene izbrane seve smo nacepili iz globoko zamrznjenih izolatov (-80 °C) na gojišča MEA ter jih inkubirali pri 25 °C 7 dni.

Preglednica 5: Izbrani sevi *H. werneckii* iz različnih habitatov in držav, hranjeni v mikrobeni zbirki EX.

EXF	Habitat (oznaka seva v drugi zbirki)	Država izolacije, mesto
9	Solinska voda	Španija, Salinas de la Trinitat
12	Solinska voda	Španija, Salinas Santa Pola
20	Solinska voda	Španija, Salinas Santa Pola
64	Solinska voda	Španija, Salinas de la Trinitat
96	Solinska voda	Španija, Salinas de la Trinitat
120	Solinska voda	Španija, Salinas Santa Pola
132	Solinska voda	Španija, Salinas Santa Pola
151	Človek, <i>tinea nigra</i> (CBS 107.67)	Portugalska
152	Solinska voda	Slovenija, Sečoveljske soline
154	Solinska voda	Slovenija, Sečoveljske soline
156	Okužba očesa ribe Kantar (<i>Spondyliosoma cantharus</i>)	Neznano
157	Ledvica, žaba	Brazilija
161	List drevesa	Senegal
166	Morska voda	Grčija
171	Keratomikoza (CBS 111.31)	Brazilija
177	Človek, <i>tinea nigra</i> (CBS 105.76)	Francija
241	Solinska voda	Slovenija, Sečoveljske soline
247	Solinska voda	Slovenija, Sečoveljske soline
269	Solinska voda	Španija, Salinas Santa Pola
489	Solinska voda	Španija, Salinas de la Trinitat
537	Solinska voda	Slovenija, Sečoveljske soline
554	Solinska voda	Slovenija, Sečoveljske soline
562	Obala, tla	Namibija
631	Solinska voda	Španija, Salinas Santa Pola
647	Agarna vaba	Španija, Salinas Santa Pola
2516	Solinska voda	Portoriko
2682	Človek, Trihomikoza nigra (CBS 126.35)	Italija
2683	Riba <i>Osteoglossum bicirrhosum</i> (CBS 117.90)	Brazilija
2684	Morska voda (CBS 100455)	Slovenija
2685	Solinska voda (CBS 100456)	Slovenija, Sečoveljske soline
2686	Plaža, pesek (CBS 373.92)	Španija, La Palma
2687	Zrak (CBS 410.51)	Japonska
2688	Drevo <i>Casuarina equisetifolia</i> (CBS 255.96)	Španija, Kanarski otoki
2689	List drevesa (CBS 706.76)	Senegal
2783	Solinska voda	Slovenija, Sečoveljske soline

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 5: Izbrani sevi *H. werneckii* iz različnih habitatov in držav, hranjeni v mikrobnii zbirki EX.

EXF	Habitat (oznaka seva v drugi zbirki)	Država izolacije, mesto
2787	Solinska voda	Slovenija, Sečoveljske soline
3506	Solinska voda	Portoriko
3846	Solarne soline	Portoriko
4625	Rdeča korala (<i>Corallium rubrum</i>)	Hrvaška, Ugljan
4642	Solinska voda	Slovenija, Sečoveljske soline
4661	Neznano (CBS 122.32)	Neznano
4662	Solinska voda	Slovenija, Sečoveljske soline
4667	Solinska voda	Slovenija, Sečoveljske soline
4717	Solinska voda	Slovenija, Sečoveljske soline
6651	Pajkova mreža z algo <i>Dunaliella</i>	Čile, Atakama
6652	Pajkova mreža z algo <i>Dunaliella</i>	Čile, Atakama
6653	Pajkova mreža z algo <i>Dunaliella</i>	Čile, Atakama
6654	Pajkova mreža brez alge <i>Dunaliella</i>	Čile, Atakama
6655	Pajkova mreža brez alge <i>Dunaliella</i>	Čile, Atakama
6656	Skala v jami	Čile, Atakama
6657	Skala v jami	Čile, Atakama
6658	Pajkova mreža brez alge <i>Dunaliella</i>	Čile, Atakama
6663	Pajkova mreža z algo <i>Dunaliella</i>	Čile, Atakama
6664	Pajkova mreža z algo <i>Dunaliella</i>	Čile, Atakama
6665	Pajkova mreža z algo <i>Dunaliella</i>	Čile, Atakama
6666	Pajkova mreža z algo <i>Dunaliella</i>	Čile, Atakama
6667	Pajkova mreža z algo <i>Dunaliella</i>	Čile, Atakama
6668	Pajkova mreža z algo <i>Dunaliella</i>	Čile, Atakama
6669	Pajkova mreža z algo <i>Dunaliella</i>	Čile, Atakama
7620	Voda iz rezervoarja	Slovenija, Sečoveljske soline
7637	Voda iz rezervoarja	Slovenija, Sečoveljske soline
7638	Voda iz rezervoarja	Slovenija, Sečoveljske soline

Aktivno rastočo kulturo *H. werneckii* smo resuspendirali v 500 µl fiziološke raztopine. Nato smo s cepilno zanko enopotezno nanesli suspenzijo seva na gojišča (MEA, MEA + 10 % NaCl, MEA + 20 % NaCl, MEA + 25 % NaCl, MEA + 30 % NaCl) ter jih inkubirali v rastni komori pri temperaturi 25 °C 6 tednov (MEA, MEA + 10 % NaCl, MEA + 20 % NaCl), 9 tednov (MEA + 25 % NaCl) ter 15 tednov (MEA + 30 % NaCl). Rast smo

spremljali enkrat tedensko z merjenjem premera kolonij (v milimetrih). Tedensko smo spremljali tudi pojavnost različnih oblik morfologij gliv (kvasna, filamentozna, kvasno-filamentozna oblika, pojav eksudatov, meristematskih skupkov in sektorjev). Po ustrezni časovni inkubaciji smo iz zraslih kolonij pripravili mikroskopske preparate ter proučevali mikromorfologijo.

3.3.1.1 Ugotavljanje zaviralnega učinka antibiotika na rast *H. werneckii*

Izbranim sevom *H. werneckii* smo odvzeli po 1 glivno kolonijo in jo resuspendirali v 500 µl fiziološke raztopine. S cepilno zanko smo nacepili glivne kolonije na gojišča MEA ter MEA z dodatkom antibiotika kloramfenikol (Ch) ter inkubirali 4 tedne v rastni komori pri 25 °C. Rast in spreminjanje kolonij smo spremljali vsak teden ter jih fotografirali.

3.3.1.2 Izolacija DNA *H. werneckii*

Iz izbranih sevov *H. werneckii*, gojenih na gojišču MEA, smo izolirali DNA z metodo mehanske lize celic in CTAB pufrom.

V sterilno mikrocentrifugirko smo dodali sterilizirano kovinsko kroglico ter zmes celita in silikagela ter mikrocentrifugirke ponovno sterilizirali. Nato smo odpipetirali 500 µl CTAB pufra ter s sterilno mikrobiološko zanko prenesli micelij glice. Micelij smo strli s pomočjo homogenizatorja, 1 minuto s frekvenco 30 tresljajev na sekundo. Homogenat smo inkubirali v termobloku pri 65 °C 30 minut. Nato smo v mikrocentrifugirko s homogenatom v digestoriju dodali 500 µl kloroforma (precipitacija proteinov in celičnih ostankov). Zmes smo mešali 1–2 sekundi na vrtinčastem mešalniku in jo nato centrifugirali 5 minut pri 14.000 obratih na minuto (16.873 g). Supernatant smo odpipetirali v svežo mikrocentrifugirko in ponovno dodali 500 µl kloroforma, premešali na vibracijskem mešalniku 1–2 sekundi ter centrifugirali pri enakih pogojih. Supernatant smo odpipetirali v svežo mikrocentrifugirko in dodali dvakratni volumen ledenega 96 % etanola. Mikrocentrifugirko smo pazljivo premešali in inkubirali na -20 °C čez noč (precipitacija DNA). Naslednji dan smo vzorec centrifugirali 5 minut pri 14.000 obratih na minuto

(16.873 g) in odstranili ves supernatant. Pelet smo sprali s 500 µl ledenega 70 % etanola in centrifugirali pri enakih pogojih. Nato smo previdno odstranili ves supernatant in pelet posušili na zraku. Pelet smo resuspendirali v 50 µl TE pufra in inkubirali 5–30 minut v vodni kopeli pri temperaturi 30 °C. Tako pripravljeno DNA smo shranili do uporabe v zamrzovalniku na -20 °C.

3.3.1.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Izbranim sevom smo pomnožili regijo notranjih distančnikov 1 in 2 (ITS 1 in ITS 2) vključno s 5,8S rDNA (ITS rDNA), za kar smo uporabili oligonukleotidna začetnika ITS4 in ITS5 (White in sod., 1990). Glede na razlike v ITS nukleotidnih zaporedij *H. werneckii* iz baze podatkov EX ter NCBI, smo izbrali 8 testnih sevov iz različnih okolij, ki smo jim pomnoževali različne odseke DNA. Izbrali smo seve EXF-4661, -157, -4642, -631, -4717, -554, -2686 ter -3846. Pomnoževali smo veliko podenoto rRNA genov (LSU), za kar smo uporabili oligonukleotina začetnika NL1 in NL4 (Boekhout in Kurtzman, 1996). Pomnoževali smo gena TEF1 (translacijski elongacijski faktor 1 α), za reakcijo smo uporabili oligonukleotidna začetnika EF1-983F in EF1-2218R (S. Rehner, 2001) ter EF1-728 F in EF1-986 R (Carbone in Kohn, 1999). Pomnoževali smo gen za drugo veliko podenoto RNA polimeraze (RPB II), za reakcijo smo uporabili oligonuklotidna začetnika fRPB2-5F in fRPB2-7cR (Liu in sod., 1999). Pomnoževali smo gen za kalmodulin (CAL), pri tem smo uporabili oligonuklotidna začetnika CAL 228 F in CAL 737 R (Carbone in Kohn, 1999). Pomnoževali smo gen za beta tubulin, za reakcijo smo uporabili oligonuklotidna začetnika T1 in T22 (O'Donnell in Cigelnik, 1997) ter BT2a in BT2b (Glass in Donaldson, 1995). Vse reakcije PCR smo izvajali v mikrocentrifugirkah (0,2 ml). V 34 µl mešanice reagentov za PCR smo dodali 1 µl vzorčne DNA. Za negativno kontrolo smo namesto vzorca DNA odpipetirali bidestilirano vodo. Zaporedja vseh uporabljenih začetnih nukleotidov so navedena v Preglednici 3. V Preglednici 6 je podrobno navedena sestava PCR mešanic, v Preglednici 7 pa so navedeni programi za pomnoževanje različnih odsekov DNA, ki smo jih uporabili pri našem delu.

Preglednica 6: PCR mešanica za 1 vzorec (skupni volumen 35 µl)

Reagent	Volumen
10x Taq pufer	3,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,10 µl
dNTP (AB) (10 mM)	0,70 µl
Oligonukleotidni začetnik 1 (10 pmol/µl)	1,40 µl
Oligonukleotidni začetnik 2 (10 pmol/µl)	1,40 µl
Taq polimeraza	0,18 µl
DNA	1,0 µl
Bidendilirana voda	24,72 µl

Preglednica 7: Programi za pomnoževanje različnih odsekov DNA *H. werneckii*

1. del	Program pomnoževanja		
	ITS	LSU	TEF-1α Touchdown PCR
Začetna denaturacija	95 °C, 2 min	95 °C, 2 min	94 °C, 2 min
Št. ciklov	30 x	30 x	9 x → 30 x
Denaturacija	95 °C, 45 s	95 °C, 45 s	94 °C, 30 s
Vezava začetnih oligonukleotidov	54 °C, 30 s	54 °C, 30 s	66 °C*, 15 s
Elongacija	72 °C, 120 s	72 °C, 120 s	72 °C, 45 s
Končna elongacija	72 °C, 4 min	72 °C, 4 min	72 °C, 10 min

* Začetna temperatura je 66 °C v prvem ciklu, naslednjih 9 ciklov je potrebno zmanjšati temperaturo za 1 °C / cikel, da dosežemo končno temperaturo taljenja (Tm) 56 °C.

2.del	Program pomnoževanja		
	Stopnja pomnoževanja	RPB2	CAL
Začetna denaturacija	95 °C, 1 min	95 °C, 8 min	94 °C, 2 min
Št. ciklov	40 x	35 x	35 x
Denaturacija	95 °C, 45 s	95 °C, 15 s	94 °C, 35 s
Vezava začetnih oligonukleotidov	52 °C, 40 s	55 °C, 20 s	58 °C, 50 s
Elongacija	72 °C, 120 s	72 °C, 60 s	72 °C, 120 s
Končna elongacija	72 °C, 10 min	72 °C, 5 min	72 °C, 6 min

Prisotnost in dolžino fragmentov, ki smo jih pomnožili pri verižni reakciji s polimerazo smo preverili z gelsko elektroforezo. Pripravili smo 1 % gel z agarozo v 1x TAE pufru. Za barvanje pomnoženih fragmentov smo v še tekoč, rahlo ohlajen gel dodali 1 µl barvila SYBR Safe na 10 µl gela. Elektroforeza je potekala v 1x TAE pufru. V prvo luknjico gela smo nanesli 2 µl DNA lestvice (100 bp), v ostale pa vzorce, zmešane s 5x nanašalnim pufom; v zadnjo vdolbinico smo odpipetirali negativno kontrolo. Elektroforeza je tekla 30 minut, prvih 5 minut pod napetostjo 80 V, nato smo napetost povečali na 100 V. Po končani elektroforezi smo gel fotografirali na transiluminatorju in obdelali z računalniškim programom UVI.

3.3.1.4 Določanje in obdelava nukleotidnega zaporedja

Nukleotidna zaporedja pomnoženega dela DNA so določili v podjetju Macrogen (Amsterdam, Nizozemska) z DNA sekvenatorjem 3730xl, ki temelji na Sangerjevi metodi in kapilarni elektroforezi.

Nukleotidna zaporedja smo obdelali in poravnali s pomočjo računalniškega programa Clustal X v 2.0 (Larkin in sod., 2007) ter v bazi podatkov GeneBank (NCBI, 2013a) s spletnim programom BLAST (NCBI, 2013b) poiskali najsorodnejša zaporedja.

Nato smo s pomočjo računalniškega programa MEGA5 (Tamura in sod., 2011) nukleotidna zaporedja ročno poravnali in izdelali filogenetska drevesa, za kar smo uporabili metodo združevanja najbližjega soseda (Neighbor joining method), metodo parsimonije in metodo največje verjetnosti (angl. Maximum likelihood analysis). Pri metodi združevanja najbližjih sosedov smo uporabili statistično metodo s korakom 1000 (bootstrap 1000); uporabili smo algoritem Kimura-2 Filogenetska drevesa smo izdelali tudi s pomočjo programa PAUP, 4. verzija (David Swofford, Massachusetts) in s programsko opremo the RaxML Blackbox na spletu (Stamatakis in sod., 2008).

3.3.1.5 Metoda prstnega odtisa z začetnim nukleotidom M13

Izbrane seve *H. werneckii* smo preizkusili še z metodo prstnega odtisa z oligonukleotidnim začetnikom M13. Volumen mešanice za en vzorec je bil 24 µL, mešanica pa je vsebovala: 14,55 µL bidestilirane vode, 0,25 µL 25 mM MgCl₂, 2,5 µL 10x polimeraznega pufra, 2,5 µL 10mM dNTP (GeneAmp, Warrington, ZDA), 4 µL 5 pmol / µL M13 in 0,2 µL 5 U / µL polimeraze Dream Taq (Fermentas, Kanada). Mešanici smo dodali še 1 µl DNA vzorca. Pri negativni kontroli smo namesto DNA dodali vodo. Za DNA prstni odtis smo uporabili PCR program prikazan v Preglednici 8.

Preglednica 8: PCR program za metodo prstnega odtisa z začetnim nukleotidom M13.

Stopnja pomnoževanja	Temperatura in čas posameznega cikla	Število ciklov
Začetna denaturacija	94 °C, 5 min	
Denaturacija	94 °C, 1 min	
Vezava začetnih oligonukleotidov	50 °C, 1 min	
Podaljševanje verige DNA	72 °C, 2 min	
Končno podaljševanje verige DNA	72 °C, 6 min	40

Z gelsko elektroforezo smo preverili prisotnost in dolžino fragmentov. Pripravili smo 1 % gel z agarozo v 1x TAE pufru. Za barvanje pomnoženih fragmentov smo v še tekoč, rahlo ohlajen gel dodali barvilo SYBR Safe (1 µl barvila na 10 µl agaroznega gela). Elektroforeza je potekala v 1x TAE pufru. V prvo luknjico gela smo nanesli 2 µl 1 kb lestvice Gene ruller (Fermentas), v ostale pa vzorce, zmešane s 5x nanašalnim pufrom; v zadnjo vdolbinico smo odpipetirali negativno kontrolo. Elektroforeza je tekla 3 ure in 30 minut pod napetostjo 70 V. Po končani elektroforezi smo gel fotografirali na transiluminatorju in obdelali z računalniškim programom UVI.

3.3.2 Detekcija črnih kvasovk vrste *H. werneckii* iz slanice Sečoveljskih solin s klasičnimi in molekularnimi pristopi

3.3.2.1 Vzorčenje

Vzorčenje solinske vode je potekalo v Sečoveljskih solinah od aprila do oktobra 2012. Glede na samo sezono pobiranja soli smo vzorčili pred glavno sezono (april, maj, junij), med sezono (julij, avgust) ter po sezoni (oktober). Vzorčili smo 3 različne tipe bazenov (Slika 6). (A) Kristalizacijski bazen Sever 10 je klasični kristalizacijski bazen za pridobivanje soli. (B) Bazen imenovan Poslužnica Sever 2 predstavlja rezervoar slanice za kristalizacijske bazene na južni strani. (C) Pilotski bazen 2/3 je namenjen pridobivanju kopalne soli, na njem ne poteka aktivna pridelava soli za prehrano.

Prvo vzorčenje na Sečoveljskih solinah je potekalo v času pred sezono, in sicer 6. 4. 2012. Vzorčili smo le dva tipa bazenov in sicer bazen Poslužnico (B) in Pilotski bazen 2/3 (C), saj kristalizacijski bazen Sever 10 (A) še ni bil ustrezeno pripravljen za novo sezono in vzorčenje ni bilo smiselno. Pri vseh nadaljnjih vzorčenjih smo vzorčili vodo iz vseh treh bazenov. Vzorčili smo še 20. 4. 2012, prav tako pred sezono pridobivanja soli, tretje vzorčenje smo izvedli 7. 6. 2012, takrat je že potekala aktivna priprava bazenov na glavno sezono. Četrto (28. 6. 2012) in peto (13. 8. 2012) vzorčenje smo izvedli med samo glavno sezono pridobivanja soli, šesto vzorčenje (5. 10. 2012) pa je potekalo po koncu sezone.

Pri vsakem vzorčenju smo odvzeli po 2 reprezentativna vzorca vode iz vsakega bazena ter ga do analize inkubirali pri 4 °C. Prvi vzorec vode smo uporabili za analize kemijske sestave vode, drugi vzorec vode pa smo uporabili za mikrobiološke analize.



Slika 6: Vzorčeni bazeni tekom sezone pridelave soli 2012 (Google maps, 2013).

Legenda:

A - Kristalizacijski bazen Sever 10 (identifikacijska št. bazena 152 001 011; GPS koordinate: 33 390 515 E, 5038346 N).

B - Poslužnica Sever 2 (identifikacijska št. bazena 142 000 200; GPS koordinate 33 390 809 E, 5038197 N).

C - Pilotski bazen 2/3 (identifikacijska št. bazena 151 000 120; GPS koordinate 33 390 607 E, 5038029 N).

Kemijske analize vode vzorčenih slanic so opravili v akreditiranem tehnološkem laboratoriju podjetja Soline pridelava soli, d.o.o. V slanicah so določevali vrednosti pH, prevodnost, slanost in gostoto ter koncentracije magnezijevih, kalcijevih, kloridnih in sulfatnih ionov. Pri analizah kemijskih parametrov so uporabili različne metode, navedene v nadaljevanju. Rezultati kemijskega vzorčenja vode so prikazani v prilogi A.

Vzorce pH vrednosti so določali z interno metodo AM 52.13, pri tem so uporabili pH meter Mettler Toledo. Prevodnost v vodi so določili z interno metodo AM 52.12, slanost slanice pa z interno metodo AM 52.02. Gostoto so izmerili po interni metodi AM 52.17, pri tem so uporabili Gay-Lucasov Piknometer Reischauer (25 ml), umerjen s certifikatom TLOS. Koncentracijo ionov v vodi so določili po mednarodnih ISO metodah za natrijev klorid v industrijski rabi. Koncentracijo sulfidnih ionov v vodi so določili po mednarodnem ISO standardu št. 2480 (Ref. Št. ISO 2480-1972 E) za določanje vsebnosti sulfata z gravimetrično metodo. Koncentracijo kloridnih ionov so določili po mednarodnem ISO standardu št. 2481 (Ref. Št. ISO 2481-1973 E), vendar pri metodi niso

uporabili živo srebrovega nitrata ampak srebrov nitrat (proizvajalec Merck). Metoda je modificirana in se uporablja kot interna metoda AM 50.01. Koncentracijo magnezijevih in kalcijevih ionov v slanici so določili z EDTA metodo po mednarodnem ISO standardu št. 2482 (Ref. Št. ISO 2482-1973 E).

3.3.2.2 Spremljanje pojavnosti glive *H. werneckii* tekom sezone delovanja Sečoveljskih solin

Mikrobiološke analize vode smo opravili na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov. Vzorce vode smo analizirali s klasičnimi tehnikami izolacije gliv iz vzorcev vode ter z molekularnimi tehnikami z namenom detekcije črne kvasovke vrste *H. werneckii* v solinski vodi.

V laboratoriju smo vzorce vode filtrirali (uporabili smo nitrocelulozne filtre Millipore s premerom por 0,45 µm). Za klasično metodo izolacije gliv smo prefiltrirali 50 ml vzorca slanice ter filtre položili na gojišča MEA + 10 % NaCl, MEA + 20 % NaCl, MEA + 25 % NaCl, vse filtracije smo opravili v dveh ponovitvah, ter plošče inkubirali 6 – 8 tednov pri 25 °C v rastni komori. Porasle kolonije smo prešteli po prvem, drugem, tretjem in četrtem tednu inkubacije ter izračunali povprečno število kolonijskih enot (CFU) na 50 mililitrov vzorčene vode. Vzorce vode smo vzporedno poleg klasične metode kultivacije filter na ploščah obdelali tudi z molekularnimi tehnikami, in sicer s kompleti za izolacijo celokupne genomske DNA iz vodnih vzorcev. Izbrali smo več različnih metod izolacije celokupne DNA. Vodne vzorce smo vsakič obdelali tako kot je priporočil proizvajalec komercialnega kompleta, vodni volumni, ki smo jih uspeli prefiltrirati, so se tekom sezone spreminjači zaradi kemijsko spremenjene narave vode v solinah.

Pri detekciji celokupne genomske DNA iz vodnih vzorcev smo uporabili več komercialno pripravljenih kompletov; izolirani celokupni DNA smo izmerili koncentracijo, absorbanco pri 260 nm in 230 nm s pomočjo aparature Nanodrop. Koncentracije izolirane celokupne DNA iz okoljskih vzorcev so prikazane v preglednici Priloge 4.

Celice iz vzorcev vode smo skoncentrirali bodisi s filtracijo ali s centrifugiranjem. Slanico smo filtrirali preko Millipore filter s premerom por 0,45 µm. Količina prefiltriranega

vzorca se je med letom spremajala zaradi vse gostejše vode, in sicer od 500 ml do 10 ml. Vedno smo poskušali prefiltrirati največjo možno količino vzorčene vode. Vsak vzorec smo pripravili v treh ponovitvah.

Tako pripravljeni prefiltrirani vzorce na filter papirju smo uporabili za nadaljnjo preiskavo.

Celokupno genomsko DNA iz vode prvih treh vzorčenj smo izolirali s pomočjo Ultra Clean™ Water DNA izolacijskega kompleta (MoBio, ZDA) po navodilih proizvajalca. Pri tretjem vzorčenju smo izolirali DNA iz vodnih vzorcev tudi s pomočjo PowerWater® Sterivex™ DNA izolacijskega kompleta (MoBio, ZDA) s filtri Sterivex (Millipore, ZDA) po navodilih proizvajalca. Iz vodnih vzorcev četrtega vzorčenja smo izolirali genomsko DNA s pomočjo PowerWater® DNA izolacijskega kompleta (MoBio, ZDA) po navodilih proizvajalca. Imeli smo kar nekaj težav z metodo membranske filtracije, saj se je voda v solinah že zgoščevala in nismo mogli več filtrirati večjih volumnov (od 50 do 150 ml vzorčene vode).



Slika 7: Vzorci vode četrtega vzorčenja in petega vzorčenja.

Legenda: Vzorci solinske vode Sečoveljskih solin četrtega vzorčenja (levo) in vzorci solinske vode petega vzorčenja (desno). Vzorec A je voda iz kristalizacijskega bazena Sever 10, vzorec B je voda iz bazena Poslužnica, vzorec C je voda iz Pilotskega bazena 2/3.

V avgustu, ko je bila slanica najgostejša, smo vodne vzorce obdelali na več načinov. (i) Filtracija od 10 do 40 ml. Izolacijo DNA smo izvedli na 2 načina: (1) uporaba kita Ultra Clean™ Water DNA izolacijski komplet (MoBio, ZDA) po navodilih proizvajalca z dodatnim korakom 10 minutnega segrevanja vzorcev na 65 °C pred samim postopkom mehanskega razbijanja ter kemične lize celic z detergenti. (2) PowerWater® DNA izolacijski komplet (MoBio, ZDA) po navodilih proizvajalca. (ii) Centrifugiranje vodnega

vzorca – po 45 ml v 50 ml ultracentrifugirkah 1 uro pri 18.000 g. Dobili smo dve faz, vodno fazo in v njej raztopljene ione, ter usedlino/pelet; izolacijo DNA smo izvedli na več načinov: (1) supernatant smo odstranili, pelet pa obdelali s klasično metodo izolacije glivne DNA z mehansko lizo in CTAB pufom opisanim v 3.3.1.2., (2) supernatant smo odstranili, pelet pa očistili tako, da smo ga odpipetirali v novo mikrocentrifugirko, dodali 1 ml fiziološke raztopine (0,9 % NaCl), pelet resuspendirali ter zopet centrifugirali 10 min pri 14.000 rpm. To smo ponovili 5x. Iz tako očiščenega peleta smo izolirali DNA z več metodami. (2.1) Klasična mehanska liza celic s CTAB pufom po protokolu, ki je opisan v 3.3.1.2., (2.2) Power Biofilm™ DNA izolacijski komplet (MoBio, ZDA), (2.3) Ultra Clean™ Water DNA izolacijski komplet (MoBio, ZDA), (2.4) PowerWater® DNA izolacijski komplet (MoBio, ZDA), vse po navodilih proizvajalca. Pri zadnjem, šestem vzorčenju smo vzorec najprej skoncentrirali z metodo membranske filtracije nato pa celokupno genomsko DNA izolirali s PowerWater® DNA izolacijskim kompletom (MoBio, ZDA) po navodilih proizvajalca. Vse izolirane DNA iz okoljskih vzorcev smo shranili v zamrzovalnik na -80 °C do uporabe.

3.3.2.3 Detekcija *H. werneckii* iz okoljskih celokupnih vzorcev DNA s specifičnimi začetnimi oligonuklotidi

Iz izoliranih okoljskih vzorcev DNA (opisano v poglavju 3.3.2.2) smo z vrstno specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki Hor-F in Hor-R (Abliz in sod., 2003) poiskusili detektirati vrsto *H. werneckii*. PCR mešanico za 1 vzorec (skupni volumen 35 µl) reakcije smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirko dodali 3,5 µl 10x Dream Taq pufra, 2,1 µl 25 mM MgCl₂ ionov, 0,7 µl 10 mM dNTP (AB), 1,4 µl 10 pmol / µl oligonukleotidnega začetnika Hor-F, 1,4 µl 10 pmol / µl oligonukleotidnega začetnika Hor-R, dodali smo še 0,18 µl Taq polimeraze, 24,72 µl bidestirane vode ter 1 µl ustrezne neredčene DNA vzorca. V negativno kontrolo smo mešanici dodali 1 µl bidestilirane vode. PCR mešanico smo inkubirali pri pogojih navedenih v Preglednici 9.

Preglednica 9: Program za pomnoževanje gena HOR (Abliz in sod., 2003).

Stopnja pomnoževanja	Temperatura in čas posameznega cikla	Število ciklov
Začetna denaturacija	95 °C, 2 min	
Denaturacija	95 °C, 45 s	
Vezava začetnih oligonukleotidov	54 °C, 30 s	
Podaljševanje verige DNA	72 °C, 120 s	
Končno podaljševanje verige DNA	72 °C, 4 min	30

3.3.2.4 Detekcija *H. werneckii* iz okoljskih celokupnih vzorcev DNA z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (RT-PCR)

Vzorce celokupne okoljske DNA smo detektirali s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi ITS 1F in ITS4. Pripravili smo RT-PCR mešanico z uporabo Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies, ZDA). Dodali smo 8 µl komercialno pripravljene mešanice, 0,5 µl oligonukleotidnega začetnika ITS 1F v koncentraciji 6 µmol / µl, 0,5 µl oligonukleotidnega začetnika ITS 4, prav tako v koncentraciji 6 µmol / µl, ter 1 µl DNA iz vzorca, celoten volumen mešanice je znašal 10 µl. Pri negativni kontroli smo namesto vzorca dodali 1 µl bidestilirane vode. Pozitivno kontrolo je predstavljala DNA seva EXF-225. Reakcije so potekale v StepOnePlus Real-Time PCR System po programu prikazanem v Preglednici 10. Rezultate smo analizirali v programu StepOne v2.2.2 z uporabo metode standardne krivulje.

Preglednica 10: RT PCR program za pomnoževanje regije ITS.

Stopnja pomnoževanja	Temperatura in čas posameznega cikla	Število ciklov
Začetna denaturacija	94 °C, 2 min	
Denaturacija	94 °C, 30 s	
Vezava začetnih oligonukleotidov	58 °C , 30 s	
Podaljševanje verige DNA	72 °C, 60 s	
Končno podaljševanje verige DNA	72 °C , 7 min	35

Želeli smo preveriti prisotnost inhibitorjev v okoljskih vzorcih, zato smo okoljskim vzorcem v eni ponovitvi dodali pozitivno kontrolo. Glivno DNA v celokupni izolirani DNA smo detektirali z za glive specifičnima začetnima oligonukleotidoma za translacijski elongacijski faktor 1α EF-983 F in EF-2218 R. RT-PCR mešanico smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 8 µl komercialno pripravljenega Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies, ZDA), dodali smo 0,5 µl oligonukleotidnega začetnika EF-983 F v koncentraciji 6 µmol / µl ter 0,5 µl oligonukleotidnega začetnika EF-2218 R, prav tako v koncentraciji 6 µmol / µl in 1 µl DNA iz vzorca. Pozitivno kontrolo je zopet predstavljala DNA seva EXF-225. Pri negativni kontroli smo namesto vzorca dodali 1 µl bidestilirane vode. Reakcije so potekale v StepOnePlus Real-Time PCR System po programu, prikazanem v Preglednici 11. Rezultate smo analizirali v programu StepOne v2.2.2 z uporabo metode standardne krivulje.

Preglednica 11: RT – PCR program za pomnoževanje regije translacijskega elongacijskega faktorja 1α.

Stopnja pomnoževanja	Temperatura in čas posameznega cikla	Število ciklov
Začetna denaturacija	95 °C, 10 min	
Denaturacija	95 °C, 15 s	
Vezava začetnih oligonukleotidov	55 °C, 30 s	
Podaljševanje verige DNA	72 °C, 15 s	
	95 °C, 15 s	
Disociacijska krivulja	60 °C, 60 s	
	95 °C, 15 s	

3.3.2.5 Detekcija *H. werneckii* iz okoljskih celokupnih vzorcev DNA z vgnezdeno verižno reakcijo s polimerazo (angl. semi-nested PCR) ter gelsko elektroforezo z denaturacijskim gradientom (DGGE)

H. werneckii smo iz celokupnih okoljskih vzorcev DNA detektirali tudi z vgnezdeno verižno reakcijo s polimerazo (angl. semi-nested PCR). Izvedli smo dve zaporedni PCR reakciji, in pomnožke DNA, pridobljene pri prvi reakciji uporabili za PCR reakcijo, ki je sledila. Najprej smo s prvim PCR pomnoževali celoten odsek ITS regije (oligonukleotidna začetnika ITS 1F ter ITS 4) (zaporedja navedena v tabeli 3). Z drugo PCR reakcijo smo pomnoževali le del regije ITS znotraj večjega odseka ITS regije (ki smo jo pomnožili v

prvi reakciji), pri tem smo uporabili oligonukleotidne začetnike ITS 1 GC ter ITS 2. Obe 35 µl PCR reakciji smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 17,5 µl komercialno pripravljenega Master Mix (Fermentas), dodali 0,5 µl 10 pmol / µl koncentriranih obeh oligonukleotidnih začetnikov ter nato še 15,5 µl bidestilirane vode. Poleg okoljskih vzorcev smo k analizi dodali tudi pozitivne kontrole. Reakcijo pomnoževanja smo izvedli po protokolu navedenem v Preglednici 12.

Preglednica 12: PCR program za pomnoževanje regije ITS z začetnimi nukleotidi ITS 1F/ ITS4 ter ITS 1GC/ ITS2.

ITS 1F/ ITS4

Stopnja pomnoževanja	Temperatura in čas posameznega cikla	Število ciklov
Začetna denaturacija	94 °C , 2 min	
Denaturacija	94 °C , 30 s	
Vezava začetnih oligonukleotidov	58 °C , 30 s	
Podaljševanje verige DNA	72 °C , 60 s	
Končno podaljševanje verige DNA	72 °C , 7 min	

ITS 1GC/ ITS2

Stopnja pomnoževanja	Temperatura in čas posameznega cikla	Število ciklov
Začetna denaturacija	94 °C, 4 min	
Denaturacija	94 °C, 45 s	
Vezava začetnih oligonukleotidov	55 °C, 75 s	
Podaljševanje verige DNA	72 °C, 60 s	
Končno podaljševanje verige DNA	72 °C, 5 min	

Z gelsko elektroforezo na 1 % agaroznem gelu (dodano barvilo za DNA Sabrsafe – 0,01 %) v 1x TAE pufru smo preverili prisotnost in dolžino pomnožkov. Elektroforeza je potekala v 1x TAE pufru. V prvo luknjico gela smo nanesli 2 µl 100 kb lestvice Gene Ruller (Fermentas), v ostale pa vzorce, zmešane s 5x nanašalnim pufrom; v zadnjo vdolbinico smo odpipetirali negativno kontrolo. Elektroforeza je potekala 30 min, prvih 5 min pod napetostjo 80 V, nato smo napetost povečali na 100 V. Po končani elektroforezi smo gel fotografirali na transiluminatorju in obdelali z računalniškim programom UVI.

PCR pomnožke drugega – nested PCR smo uporabili v analizi DGGE, gelski elektroforezi z denaturacijskmi gradientom.

3.3.2.6 Gelska elektroforeza z denaturacijskim gradientom (DGGE)

Gelsko elektroforezo z denaturacijskim gradientom smo pripravili tako, da smo v za to pripravljeni in očiščen nosilec najprej nanesli začetni čepni gel (angl. plug gel). Čepni gel smo pripravili iz 3 ml 80 % DGGE raztopine, 3 µl TEMMED ter 30 µl 10 % APS. Po preteku 15 min se je čepni gel strdil. Nadaljevali smo s pripravo glavnega gradientnega gela (angl. main gel), le-ta je sestavljen iz dveh gelov z različnim deležem akrilamida. 60 % gel smo pripravili z 9 ml 80 % DGGE raztopine, 3 ml z 0 % DGGE raztopine, 60 µl v 10 % APS in 6 µl TEMMED. 20 % gel smo pripravili z 3 ml 80 % DGGE raztopine, 9 ml 0% DGGE raztopine, 60 µl v 10 % APS in 6 µl TEMMED. Oba gela smo gradientno nanesli s črpalko Pharmacia na nosilec, v katerem je bil strjen čepni gel. Površino glavnega gela smo zalili z butanolom za obtežitev. Po 45 minutah se je glavni gel strdil, s filter papirji smo odstranili butanol ter pripravili še sklopitveni gel (angl. stacker gel) iz 3 ml 0 % DGGE raztopine, 3 µl TEMMED in 30 µl 10 % APS. Sklopitveni gel smo nanesli na glavni gel v nosilcu, pred tem pa smo v nosilec vstavili še ustrezni glavniček z jamicami za nanašanje vzorcev. Ko se je sklopitveni gel po 15 minutah strdil, smo glavniček odstranili, jamice za nanašanje vzorcev smo sprali z 1x TAE pufrom ter nanesli lestvico in vzorce. Za ločevanje pomnožkov smo uporabili sistem D GENE™ (BioRad, ZDA). V DGGE elektroforezni sistem RioBad D Code™ System smo zato pripravili 10 litrov 1x TAE pufra ter segreli na 60 °C. DGGE elektroforeza je potekala prvih 10 minut pri 15 V, nato 16 ur (960 minut) pri 65 V. Celoten gel smo nato pobarvali s Sybr safe barvilom, tako da smo v banjico z gelom dodali 100 ml 1x TAE pufra z 10 µl Sybr safe barvila in na krožnem mešalniku Belly dancer inkubirali 30 minut. Po končanem barvanju smo gel sprali z destilirano vodo in slikali na transiluminatorju.

Slike DGGE gelov smo obdelali s programom Bio Numerics 6.0, Gel Compar II.

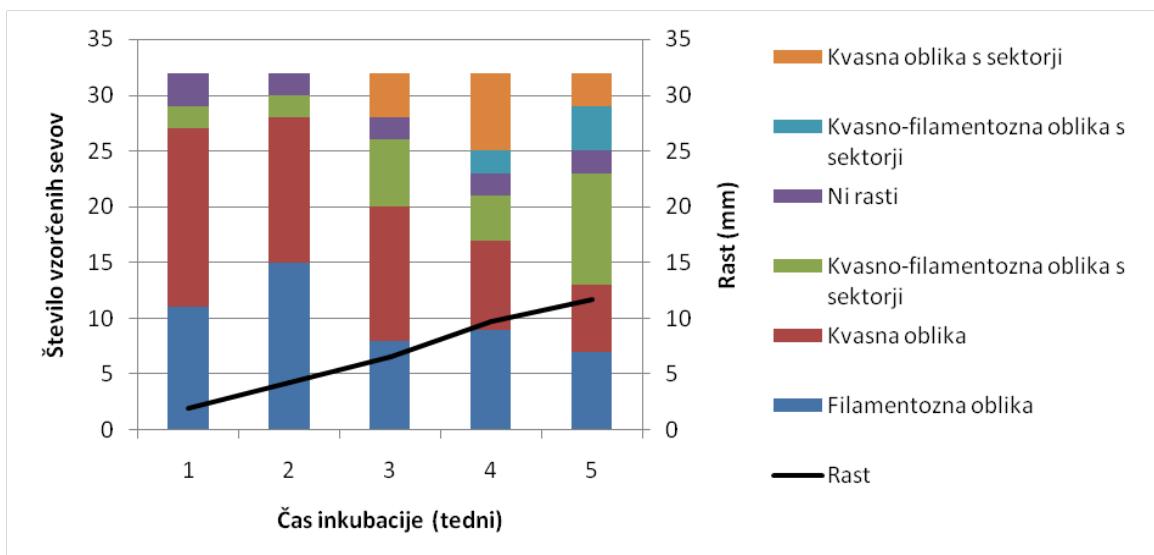
4 REZULTATI

4.1 MORFOLOŠKA ANALIZA IZOLATOV ČRNE KVASOVKE *Hortaea werneckii*

4.1.1 Različni morfološki tipi *H. werneckii* na gojiščih z različnimi NaCl koncentracijami

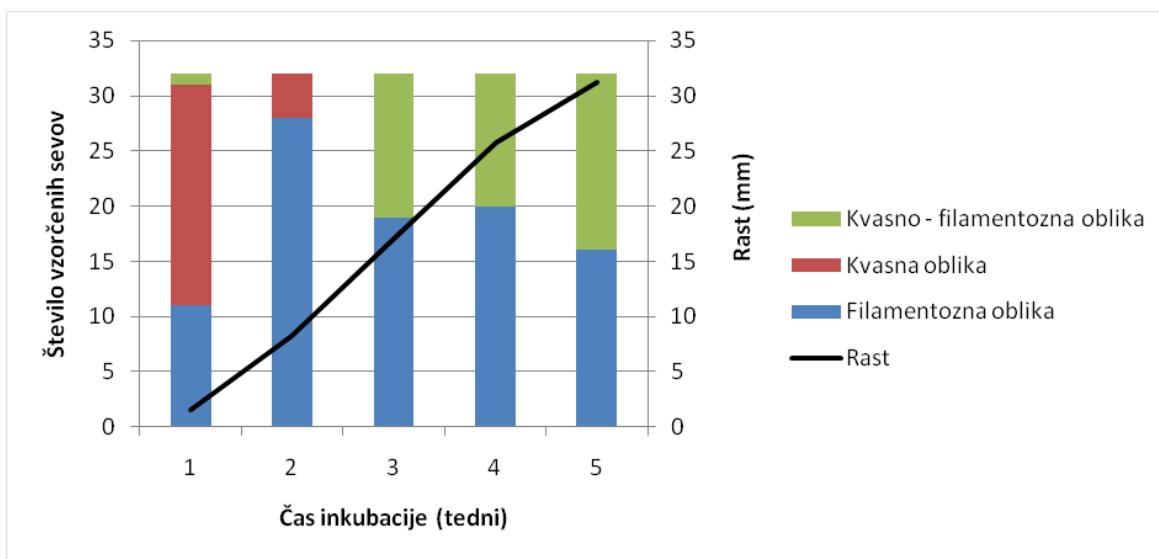
32 sevov, osamljenih iz različnih okolji, smo gojili na gojiščih, ki so se razlikovala po vsebnostmi soli. Na slikah 8 - 12 so prikazane različne oblike rasti *H. werneckii* na posameznem gojišču.

Na Sliki 8 je prikazana rast na gojišču MEA brez dodane soli, kjer so rastli vsi analizirani sevi (32) razen dveh. Eden od teh dveh je bil osamljen iz solinske vode Sečoveljskih solin ter drugi iz drevesa *Casuarina equisetifolia* iz Kanarskih otokov. Na začetku inkubacije je večina sevov rastla v kvasni obliki, druga najpogostejsa oblika rasti je bila filamentozna. Morfologija se je tekom daljše inkubacije spremenjala, kvasovke so izraščale v obliki hif, zato je sledilo povečanje kvasno-filamentozne oblike rasti. V kombinaciji s kvasno obliko so bili prisotni tudi posamezni sektorji s filamentozno rastjo. Rast ter velikost posameznih kolonij se je počasi večala.



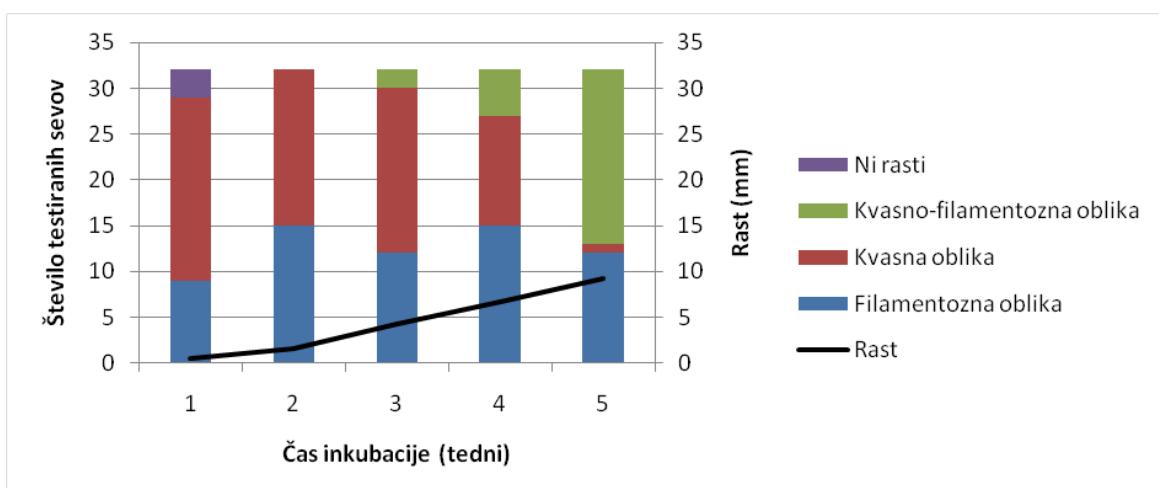
Slika 8: Različna morfološka stanja in rast (mm) na gojišču MEA brez dodane soli (NaCl).

Slika 9 prikazuje rast *H. wernerckii* na gojišču MEA z dodanim NaCl v končni koncentraciji 10 %, kjer so rastli vsi analizirani sevi. V prvem tednu je večina sevov rastla v kvasni oblik. Kasneje je bila rast večinoma filamentozna in kvasno-filamentozna. Kvasne oblike nismo več zaznali. Kolonije so bile izrazito velike.



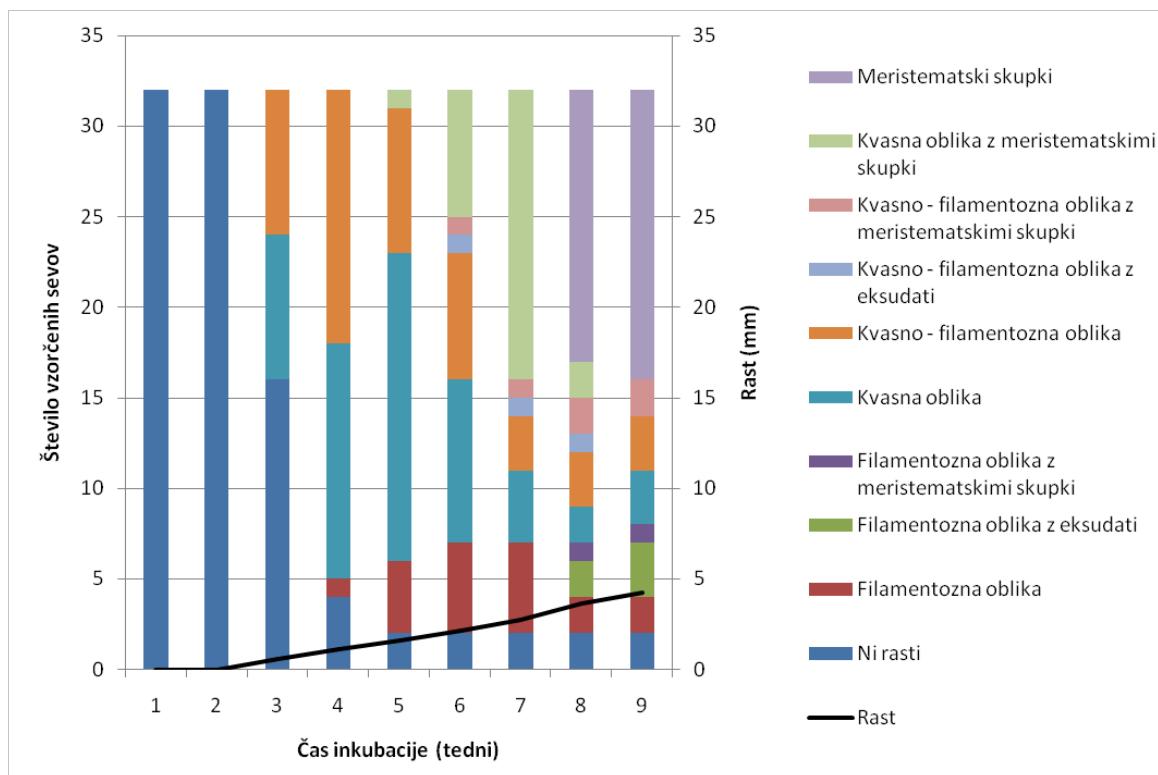
Slika 9: Različna morfološka stanja in rast (mm) na gojišču MEA z 10 % dodatkom soli (NaCl).

Na Sliki 10 je prikazana rast na gojišču MEA z 20 % NaCl. V prvem tednu je prevladovala kvasna oblika rasti, ki se je tekom inkubacije zmanjšala na račun povečanja kvasno-filamentozne oblike. Filamentozna rast ni bila tako intenzivna. Pri treh od 32 analiziranih sevov v prvem tednu inkubacije ni bilo rasti, dva od teh sevov sta klinična izolata, en sev pa je solinski. Rast in velikost kolonij je bila manjša kot na gojišču MEA brez soli.



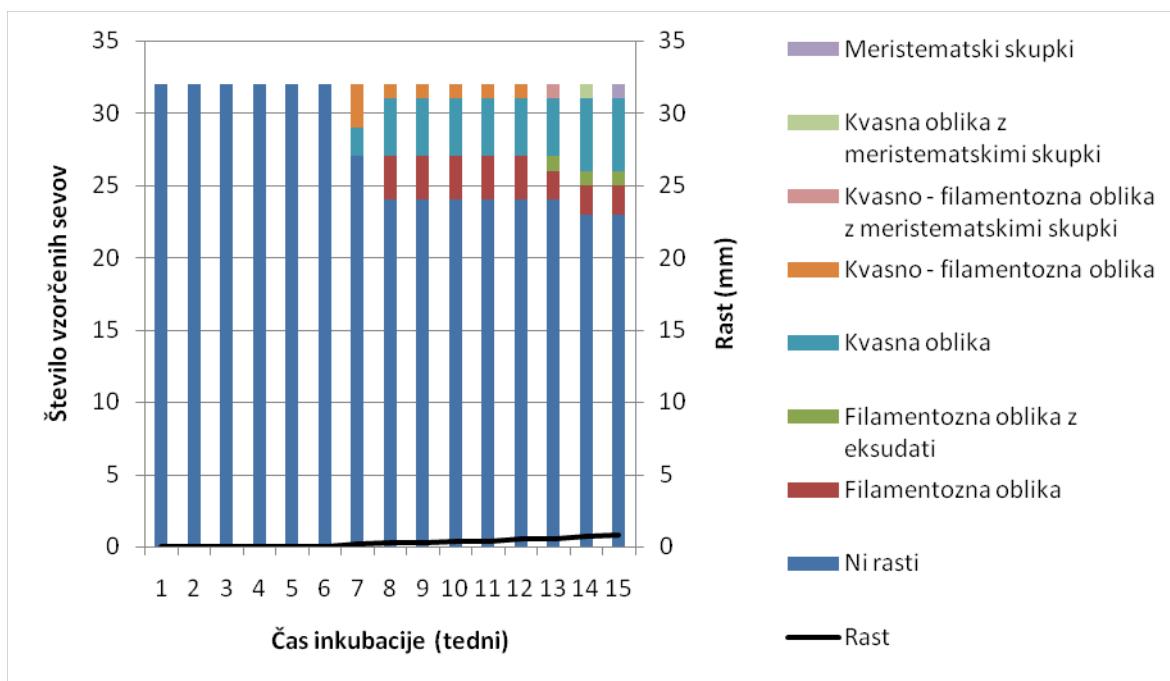
Slika 10: Različna morfološka stanja in rast (mm) na gojišču MEA z 20 % soli (NaCl).

Na Sliki 11 je prikazana rast analiziranih sevov na gojišču MEA z 25 % dodatkom NaCl. Zaznali smo dvotedenski izostanek rasti pri vseh analiziranih sevih. V tretjem tednu le še polovica sevov ni rastla na izbranem gojišču, ostali sevi pa so rastli v kvasni oziroma v kvasno-filamentozni oblikni. Do petega tedna inkubacije so večinoma zrastli vsi sevi, razen štirih od 32 testiranih; dva od teh sevov pri tej koncentraciji nista več rastla (sev, osameljn iz zraka na Japonskem ter sev iz solinske vode Portorika). Kot je razvidno iz Slike 11, so se iz začetne prevladajoče kvasne ter kvasno-filamentozne oblike razvile zelo raznolike kolonije, s prevlado kvasno-meristematske oz. kasneje razvite večinsko meristematske oblike. Filamentozno je rastlo le nekaj sevov; na kolonijah le-teh so se po 8 tednih inkubacije izločali eksudati.



Slika 11: Različna morfološka stanja in rast (mm) na gojišču MEA z 25 % soli (NaCl).

Na Sliki 12 je prikazana rast in makromorfologija na gojišču MEA z 30 % dodane NaCl. Rast je bila prisotna pri 9 analiziranih sevih (28 % rast na tem gojišču), in sicer v vidnih kolonijah šele po 7 tednih inkubacije. Iz začetne prevlade kvasno-filamentozne oblike so v kasnejših tednih inkubacije rastle kvasovke, iz katerih so se razvili tudi meristematski skupki. Filamentozna oblika rasti je bila prisotna pri polovici porastlih sevov, kjer smo zaznali tudi izločanje eksudatov. Velikost zraslih kolonij je v povprečju po 15 tednih inkubacije znašala od 2 do 3 cm. Na 30 % NaCl ni rasel noben kliničen izolat.



Slika 12: Različna morfološka stanja in rast (mm) na gojišču MEA z 30 % soli (NaCl).

4.1.1.1 Makromorfologija

Na sliki 13 so prikazane različne morfološke oblike *H. werneckii* na gojiščih z različno slanostjo. Na sliki 14 so prikazane različne morfološke oblike kliničnih sevov *H. werneckii* na gojiščih z različno slanostjo. Na sliki 15 so prikazane različne morfološke oblike okoljskih izolatov *H. werneckii* na gojiščih z različno slanostjo.



Slika 13: Različne makromorfološke oblike rasti glive *H. werneckii* na gojiščih z različno slanostjo.

Legenda: **1:** EXF-64; **2:** EXF-64; **3:** EXF-120; **4:** EXF-631; **5:** EXF-2683; **6:** EXF-4661; **7:** EXF-247; **8:** EXF-120; **9:** EXF-4661; **10:** EXF-247; **11:** EXF-151; **12:** EXF-631; **13:** EXF-120; **14:** EXF-4661; **15:** EXF-2688; **16:** EXF-247; **17:** EXF-7637; **18:** EXF-161; **19:** EXF-4717; **20:** EXF-4667; **21:** EXF-554; **22:** EXF-269; **23:** EXF-225; **24:** EXF-156; **25:** EXF-2683; **26:** EXF-268; **27:** EXF-3506; **28:** EXF-647. Slike 1, 3, 6, 7, 11 rast na MEA; slike 2, 4, 5, 8, 9, 10 in 23 rast na MEA + 10 % NaCl; slike 12, 13, 14, 16 rast na MEA + 20 % NaCl; slike 15, 17, 18, 19, 25 na MEA + 25 % NaCl; slike 20, 21, 22, 24, 26, 27, 28 na MEA + 30 % NaCl.



Slika 14: Različne makromorfološke oblike kliničnih izolatov *H. werneckii* na gojiščih z različno slanostjo.

Legenda: slika 1-5 tipski sev EXF-157, osamljen iz ledvice žabe iz Brazilije; slika 6-10 sev EXF-4661, CBS 122.32; slika 11-15 sev EXF-151, osamljen iz človeka, Portugalska. **1:** EXF-157, MEA; **2:** -157, MEA + 10 % NaCl; **3:** -157, MEA + 20 % NaCl; **4:** -157, MEA + 25 % NaCl; **5:** -157, MEA + 25 % NaCl. **6:** EXF-4661, MEA; **7:** -4661, MEA + 10 % NaCl; **8:** -4661, MEA + 20 % NaCl; **9:** -4661, MEA + 25 % NaCl; **10:** -4661, MEA + 25 % NaCl. **11:** EXF-151, MEA + 25 % NaCl; **12:** -151, MEA; **13:** -151, MEA + 10 % NaCl; **14:** -151, MEA + 20 % NaCl; **15:** -151, MEA + 25% NaCl.

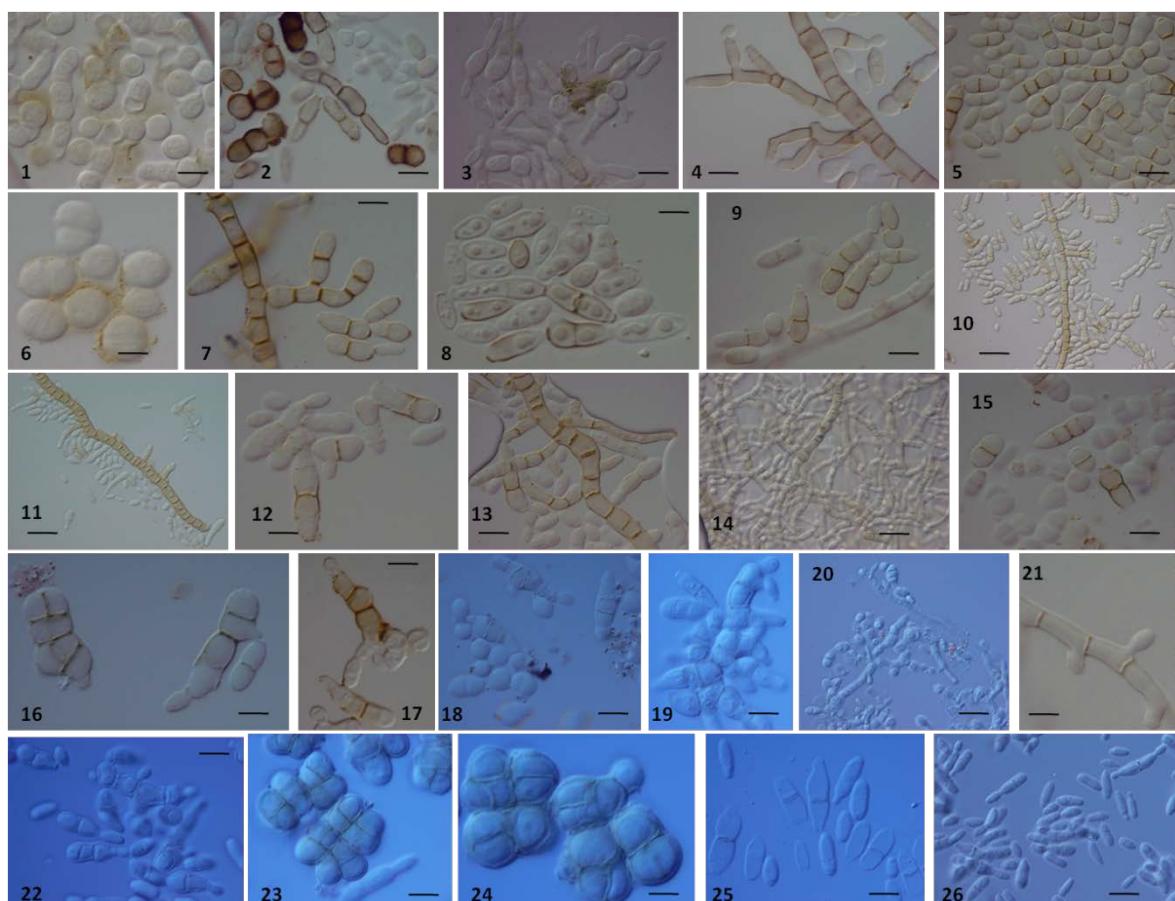


Slika 15: Različne makromorfološke oblike okoljskih izolatov *H. werneckii* na gojiščih z različno slanostjo.

Legenda: slika 1-5: EXF-120, osamljen iz slanice Sečoveljskih solin, Slovenija; slika 6-11: EXF-2683, osamljen iz ribe *Osteoglossum bicirrhosum*, Brazilija; slika 12-16: EXF-4717, osamljen iz slanice Sečoveljskih solin, Slovenija; slika 17-21: EXF-247, osamljen iz slanice Sečoveljskih solin, Slovenija; slika 22-27: EXF-647, osamljen iz agarne vabe v solinah, Španija; slika 28-32: EXF-161, osamljen iz lista drevesa, Senegal; slika 33-35: EXF-3846, osamljen iz solin, Portoriko; slika 36-40: EXF-631, osamljen iz slanice solin Santa Pola, Španija. Slika 1, 6, 12, 17, 22, 28, 33 in 36: rast na gojišču MEA; slika 2, 7, 13, 18, 23, 29, 34, in 37: rast na MEA + 10 % NaCl; slika 3, 8, 14, 19, 26, 30, 35 in 38 rast na MEA + 20 % NaCl; slika 4, 9, 19, 15, 16, 20, 24, 27, 31, 32, 39, in 40: rast na MEA + 25 % NaCl; slika 5, 11, 21 in 25: rast na MEA + 30 % NaCl.

4.1.1.2 Mikromorfologija

Na sliki 16 so prikazane mikromorfološke oblike *H. werneckii* na gojiščih z različno slanostjo. Na gojišču MEA brez soli prevladuje kvasna rast. Z višanjem koncentracije NaCl v gojišču pa se pojavljajo kvasne, kvasno-filamentozne, filamentozne ter meristematske oblike rasti.

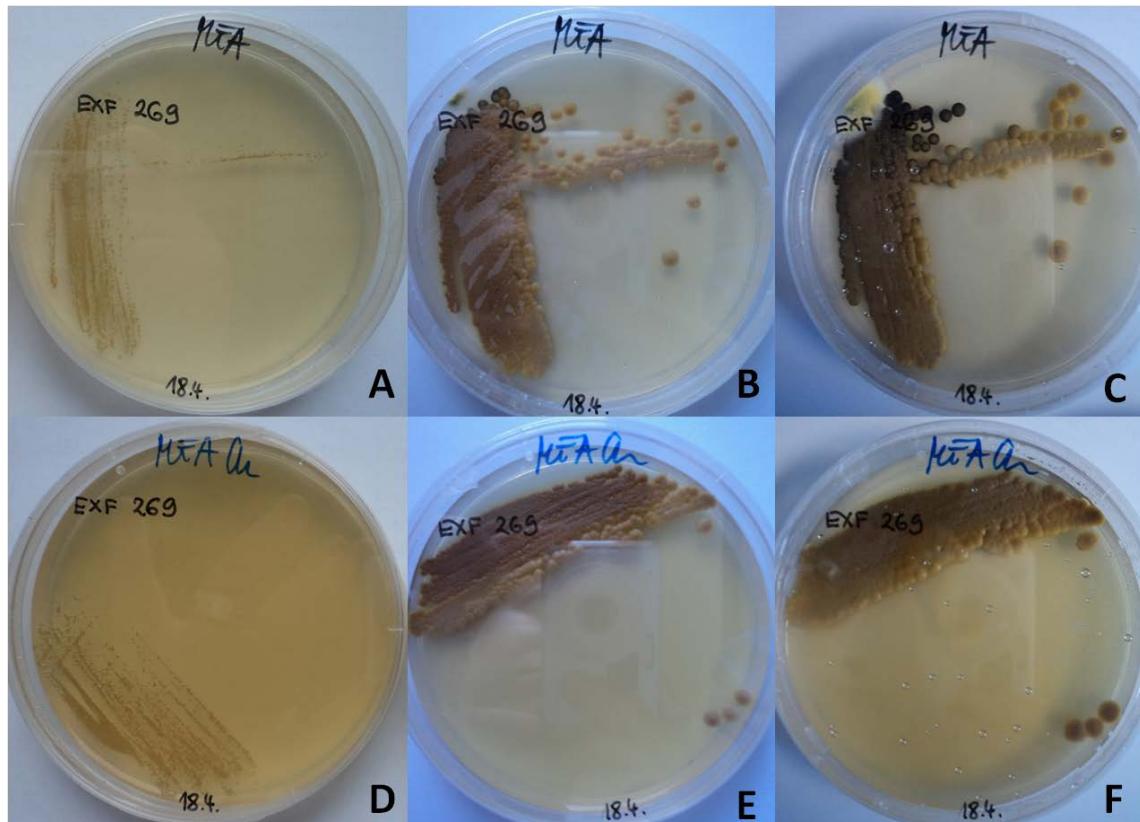


Slika 16: Različne mikromorfološke oblike rasti *H. werneckii* na gojiščih z različno slanostjo.

Legenda: Slike 1-3: na gojišču MEA; slike 4-10: na gojišču MEA + 10 % NaCl; slike 11-17: na gojišču MEA + 20 % NaCl; slike 18-26: na gojišču MEA + 30 % NaCl. 1: EXF-4661; 2: EXF-152; 3: EXF-4662; 4: EXF-247; 5: EXF-247; 6: EXF-151; 7: EXF-247; 8: EXF-152; 9: EXF-152; 10: EXF-4662; 11: EXF-647; 12: EXF-647; 13: EXF-647; 14: EXF-4661; 15: EXF-152; 16: EXF-4662; 17: EXF-4662; 18: EXF-157; 19: EXF-554; 20: EXF-647; 21: EXF-4662; 22: EXF-4667; 23: EXF-4667; 24: EXF-156; 25: EXF-247; 26: EXF-554; Vse slike so posnete pri 1000x povečavi, razen slik 10, 11, 14, 20 in 26, ki so posnete pod 400x povečavo. 1000x povečava: merilo prikazuje 10 µm; 400x povečava: merilo prikazuje 20 µm.

4.1.1.3 Analiziranje vpliva prisotnosti antibiotika kloramfenikol v gojišču

Antibiotik kloramfenikol v koncentraciji 0,05 g /l ne zavira rasti *H. werneckii* (slika 15).

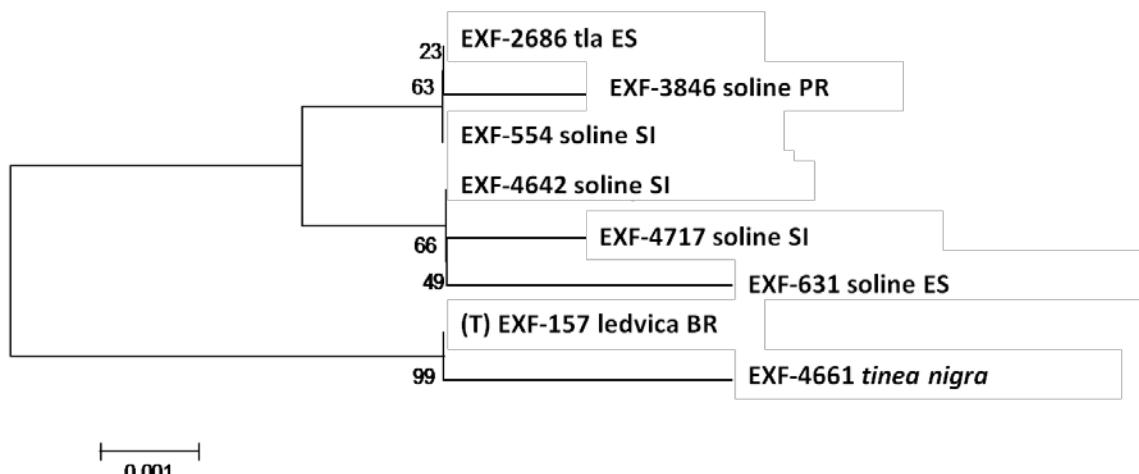


Slika 17: Rast *H. werneckii* brez ter z dodatkom kloramfenikola.

Legenda: Sev EXF-269 na gojišču MEA brez (od A - C) ter z dodatkom antibiotika kloramfenikol (Cm) (od D- F). Po prvem tednu (A, D), treh tedenih (B, E) ter štirih tednih rasti (C, F) v rastni komori na 25 °C.

4.2 FILOGENETSKA ANALIZA IZOLATOV ČRNE KVASOVKE *Hortaea werneckii*

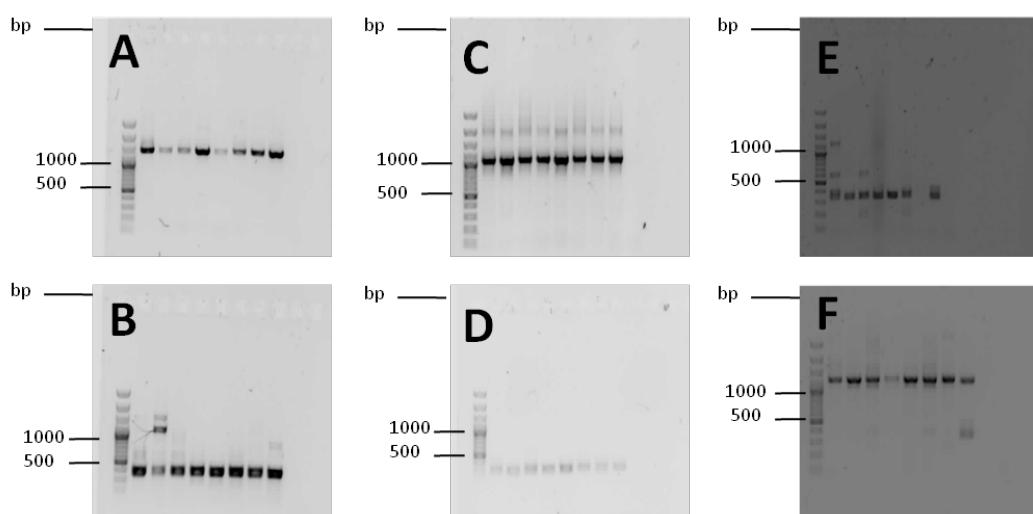
Za analizo primerenega molekularnega markerja za določitev znotrajvrstne variabilnosti smo na podlagi ITS regije genoma izbrali 8 testnih sevov *H. werneckii* osamljenih iz različnih habitatov in geografskih lokacij. Ti so se glede na ITS regijo grupirali v dve različni skupini znotraj vrste *H. werneckii* (slika 8).



Slika 18: Filogenetsko drevo izbranih sevov *H. werneckii*, izrisano z metodo najbližnjega soseda na osnovi poravnanih nukleotidnih zaporedij ITS rDNA.

4.2.1 Analiza PCR pomnožkov BT, RPB2, CAL, EF1- α izbranih sevov *H. werneckii*

Za analizo primernega molekularnega markerja za določitev znotrajvrstne variabilnosti smo izbranim 8 sevom *H. werneckii* osamljenih iz različnih habitatov in geografskih lokacij pomnoževali različne gospodinjske gene: gen za beta tubulin, gen za translacijski elongacijski faktor 1- α , gen za kalmodulin, gen za RPB II podenoto (programi pomnoževanja so predstavljeni v preglednici 7). Rezultati pomnoževanja so prikazani na sliki 19. Uspešnost pomnoževanja je prikazana v preglednici 13.



Slika 19: Pomnožene regije DNA za beta tubulin, elongacijski faktor 1- α , kalmodulin ter RPB II podenoto.

Legenda: **A** gen za beta tubulin z oligonukleotidnimi začetniki T1 in T22; **B** gen za beta tubulin z oligonukleotidnimi začetniki BT2a in BT2b; **C** gen za elongacijski faktor 1- α z oligonukleotidnimi začetniki 983 F in 2218 R; **D** gen za elongacijski faktor 1- α z oligonukleotidnimi začetniki 728 F in 986 R; **E** gen za kalmodulin z oligonukleotidnimi začetniki 228 F in 737 R; **F** gen za RPB 2 z oligonukleotidnimi začetniki fRPB2 – 7cR; uporabili smo DNA lestvico 100 bp.

Preglednica 13: Uspešnost pomnoževanja različnih odsekov DNA.

	Velikost (bp)	pomnožka	Uspešnost pomnoževanja (%)	Nespecifični produkti (%)	Uspešnost sekvenciranja (%)
B-TUB; T1 in T22	1250	100	100	12,5	56,25
B-TUB; BT2a in BT2b	350	100	100	50	62,5
EF 1- α ; 983F in 2218R	1100	100	100	100	87,5
EF 1- α ; 728F in 986R	250	100	100	0	87,5
CAL; 228 F in 737 R	350	87,5	87,5	42,9	25

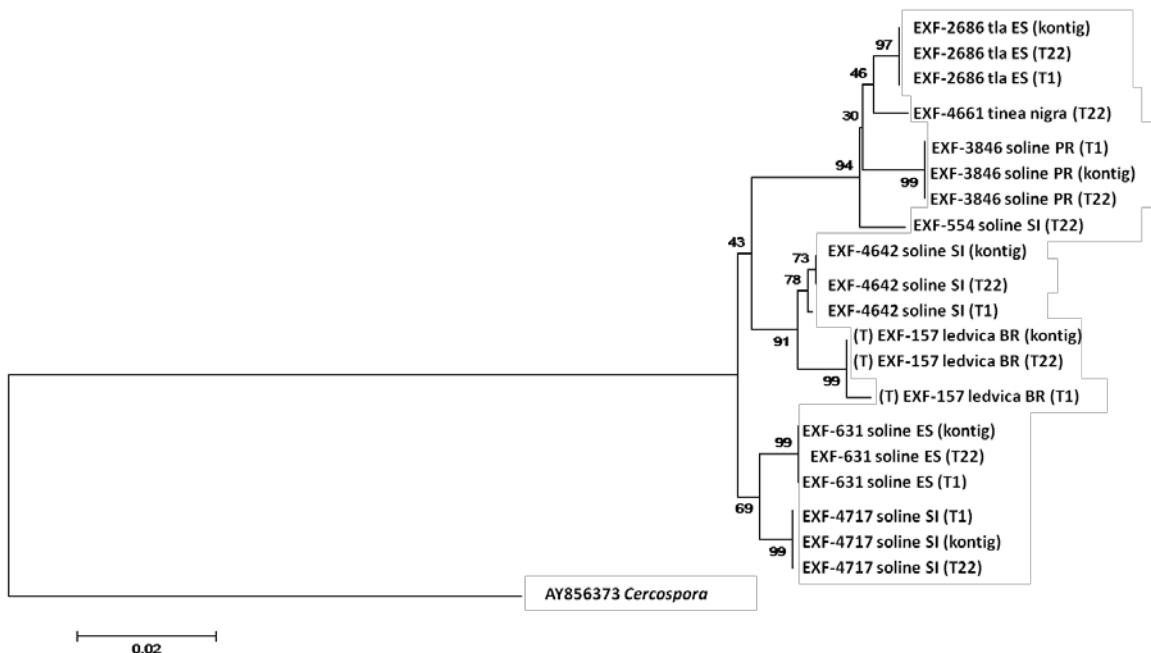
RPB2; fRPB2-5F in -7cR 1150

100

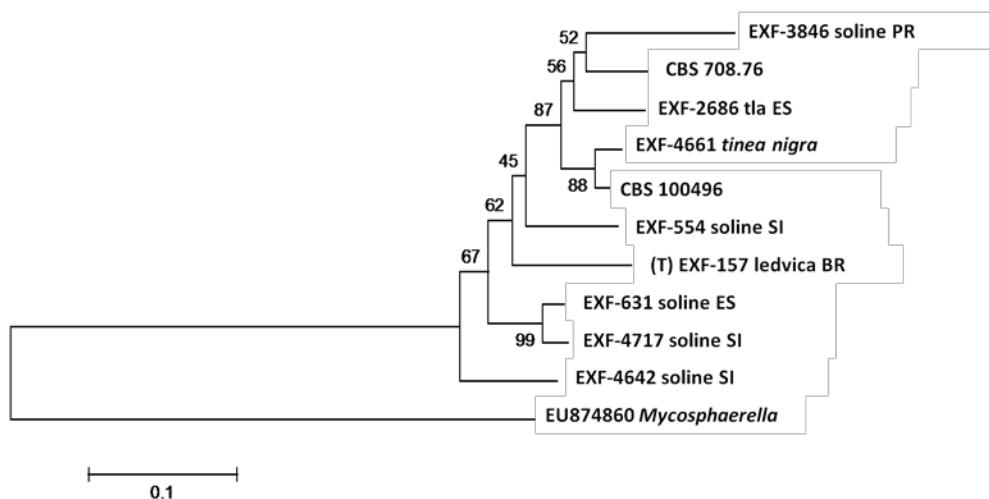
25

50

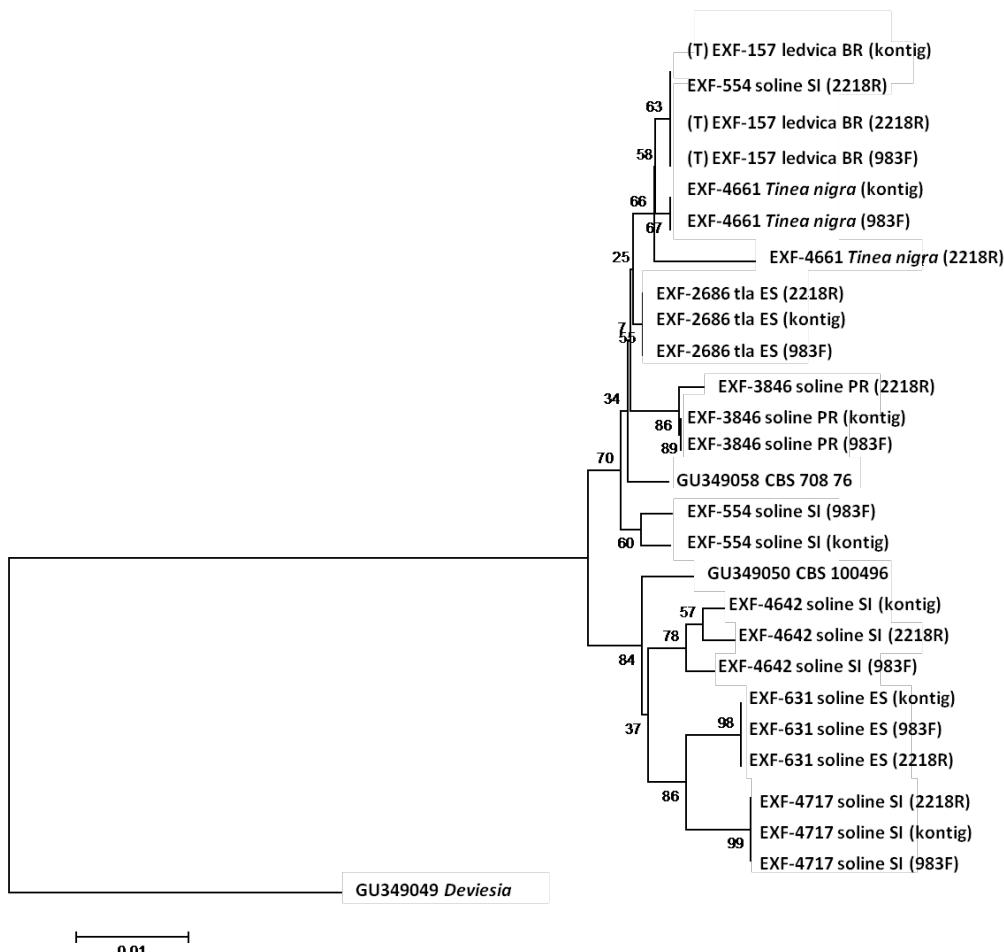
Regijam pomnoženih gospodinjskih genov smo določili nukleotidna zaporedja ter na podlagi urejenih in poravnanih nukleotidnih zaporedij izrisali filogenetska drevesa za vsak pomnožen gospodinjski gen posebej. Na sliki 20 je prikazano filogenetsko drevo na podlagi gena, ki kodira beta tubulin, na sliki 21 je prikazano filogenetsko drevo na podlagi gena, ki kodira RPB2, na sliki 22 je prikazano filogenetsko drevo na podlagi gena, ki kodira translacijski elongacijski faktor 1- α . Pri vseh izrisanih drevesih vidimo, da se izbrani sevi grupirajo v dve različni skupini znotraj vrste *H. werneckii*.



Slika 20: Filogenetsko drevo izbranih sevov *H. werneckii* na podlagi dela gena, ki kodira beta tubulin, izrisano z metodo najbližjega soseda na osnovi poravnanih nukleotidnih zaporedij.



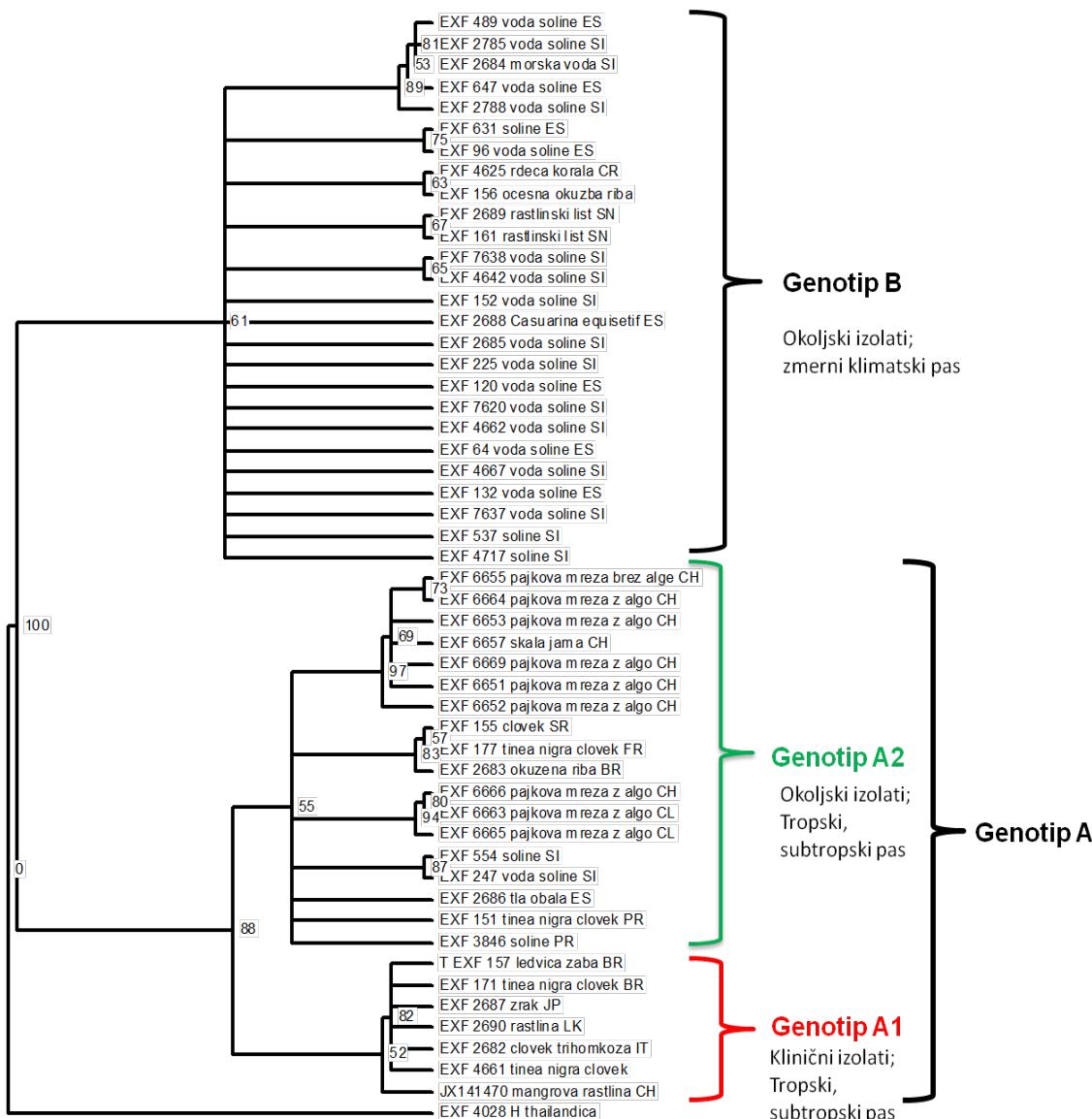
Slika 21: Filogenetsko drevo izbranih sevov *H. werneckii* na podlagi dela gena, ki kodira RPB2, izrisano z metodo najbližjega soseda na osnovi poravnanih nukleotidnih zaporedij.



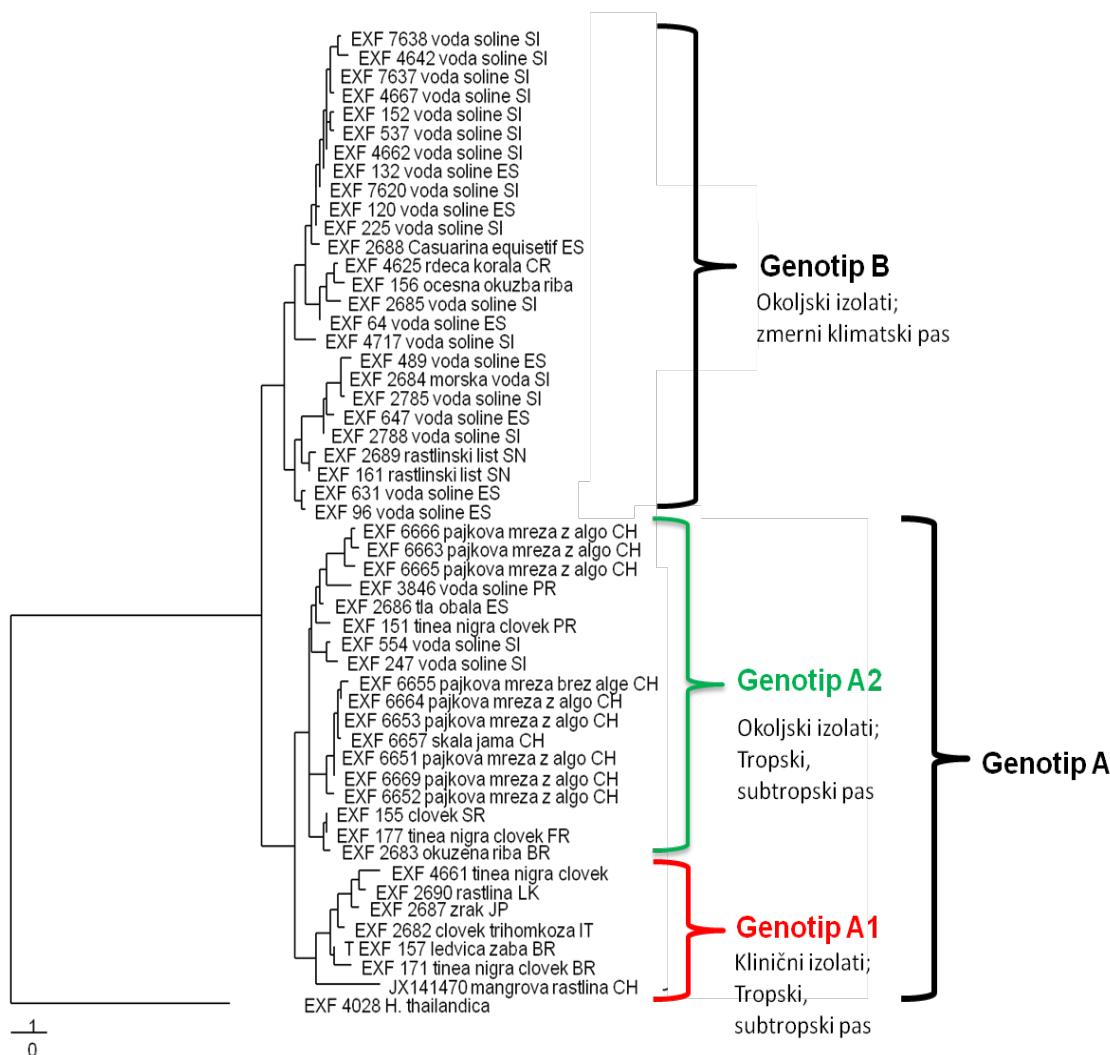
Slika 22: Filogenetsko drevo izbranih sevov *H. werneckii* na podlagi dela gena, ki kodira translacijski elongacijski faktor 1- α , izrisano z metodo najbližjega soseda na osnovi poravnanih nukleotidnih zaporedij.

4.2.1.1 Filogenetsko drevo

Filogenetsko drevo predstavljeno na osnovi ITS, LSU in dela gena za EF-1 α rDNA nukleotidnih zaporedij na sliki 23 ter sliki 24 potrjuje obstoj dveh različnih genotipov znotraj vrste *H. werneckii*. Izolati, ki sestavlja genotip A so značilno osamljeni iz tropskih in subtropskih okolji. Genotip A je sestavljen iz dveh podskupin, v genotipu A1 se grupirajo klinični izolati, v genotipu A2 pa se grupirajo okoljski izolati. V genotip B spadajo značilno okoljski izolati iz zmernega klimatskega pasu (prevladujejo izolati iz solinskih voda).



Slika 23: Filogenetsko drevo izbora izolatov vrste *H. werneckii* (EX številke – laboratorijski izolati, hranjeni v zbirkri ter zaporedij pridobljenih iz NCBI baze podatkov), izrisano na podlagi združenih zaporedij ITS, LSU in dela EF1 α gena regije z uporabo programske opreme PAUP. Drevo je koreninjeno z zaporedji vrste *Hortaea thailandica*.



Slika 24: Filogenetsko drevo izbora izolatov vrste *H. werneckii* (EX številke – laboratorijski izolati, hrаниci v zbirki ter zaporedij pridobljenih iz NCBI baze podatkov), izrisano na podlagi združenih nukleotidnih zaporedij ITS, LSU in dela EF1 α gena regije izrisano na osnovi algoritma največje verjetnosti (maximum likelihood) s programsko opremo the RaxML Blackbox na spletu. Drevo je koreninjeno z zaporedji vrste *Hortaea thailandica*.

4.2.1.2 Molekularna raznolikost *H. werneckii*

V Preglednici 14 so predstavljeni rezultati primerjave različnih molekularnih metod, s katerimi so v preteklosti skušali determinirati raznolikost znotraj vrste *H. werneckii*. Zadnji stolpec nakazuje rezultate naše filogenetske analize. Razporeditev rDNA RFLP skupin (Zalar in sod., 1999) sovpada s skupinami genotipov. Skupina 1 rDNA RFLP analize spada v genotip A1, skupina 2 rDNA RFLP spada v genotip A2, skupina 3 rDNA RFLP pripada genotipu B. Ostale metode so za določitev skupin znotraj vrste preveč heterogene.

Preglednica 14: Molekularna raznolikost *H. werneckii* (Zalar in sod., 1999)

CBS	EXF	Kariotip ¹	RAPD ²	mtDNA RFLP ³	rDNA RFLP ⁴	ITS1 ⁴	ITS ⁵	Genotip
122.32	4661	1	1	1	1	1	1	A1
115.90	157	2	1	1	1	2	1	A1
111.31	171	3	2	2	1	2	1	A1
359.66	155	4	3	3	2	3	2	A2
107.67	151	5	4	4	ND	3	3	A2
705.76	177	ND	4	4	2	3	ND	A2
117.90	2683	ND	4	4	ND	3	2	A2
373.92	2686	ND	5	ND	ND	3	3	A2
116.90	156	6	6	6	3	4	3	B
100455	4625	ND	ND	ND	3	4	4	B
706.76	161	ND	6	7	3	4	ND	B

Legenda: Z enakimi številkami so označene enake skupine po posamezni metodi; ND (ni analizirano)

1: podatki povzeti po Boekhout in sod., 1993

2: podatki povzeti po Uijthof in sod., 1994

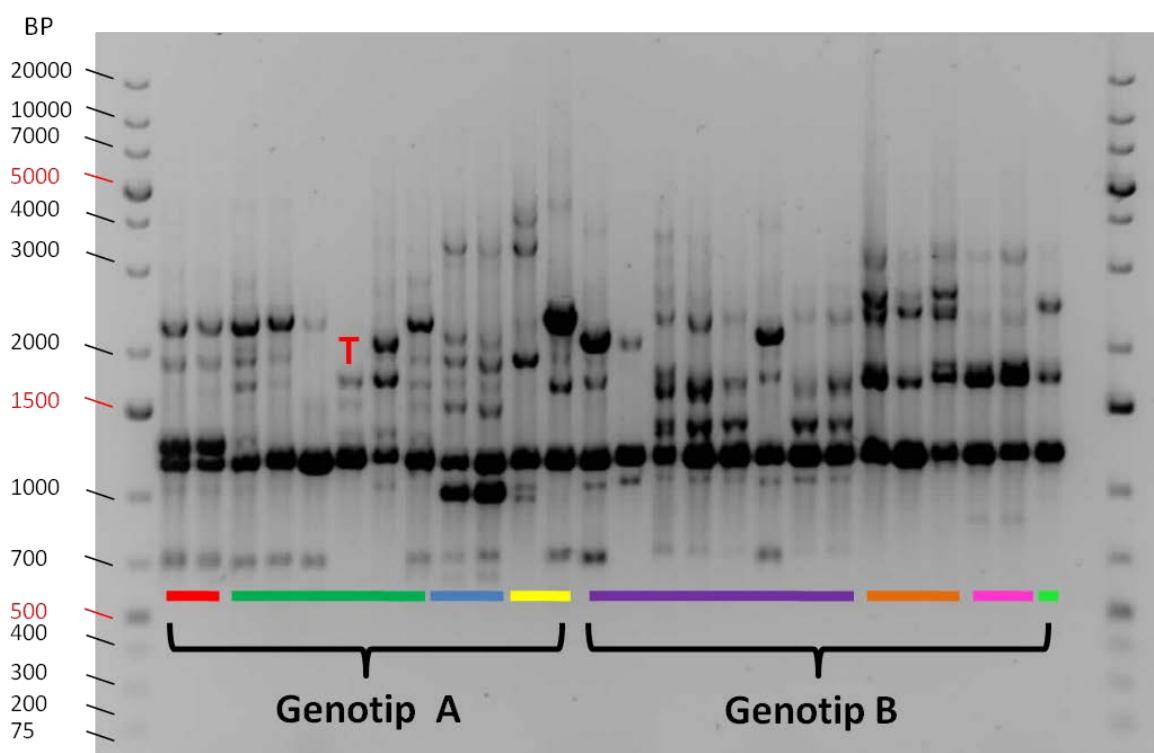
3: podatki povzeti po de Cock, 1994

4: podatki povzeti po Zalar in sod., 1999

5: podatki povzeti po Cabanes in sod., 2012

4.2.1.3 Metoda prstnega odtisa z oligonukleotidnim začetnikom M13

Na sliki 25 so prikazane znotrajvrstne razlike, ki smo jih pridobili z metodo prstnega odtisa z oligonukleotidnim začetnikom M13 med dvema genotipoma, ki sta se izoblikovala na podlagi filogenetskega drevesa (slika 23 in slika 24). Zopet se pojavit dve večji skupini, razlike so vidne v velikosti samih pomnožkov. Skupina okoljskih izolatov zmernega pasu (genotip B) ima značilne pomnožke pri velikosti 1700 in 1000 baznih parov, ki jih genotip A v večini primerov nima. Genotip A (okoljski in klinični izolati tropskega in subtropskega pasu) ima značilne pomnožke na velikosti 700 baznih parov, ki pa jih genotip B nima.



Slika 25: Znotraj vrstno razlikovanje izbranih sevov vrste *H. werneckii* z metodo prstnega odtisa z oligonukleotidnim začetnikom M13.

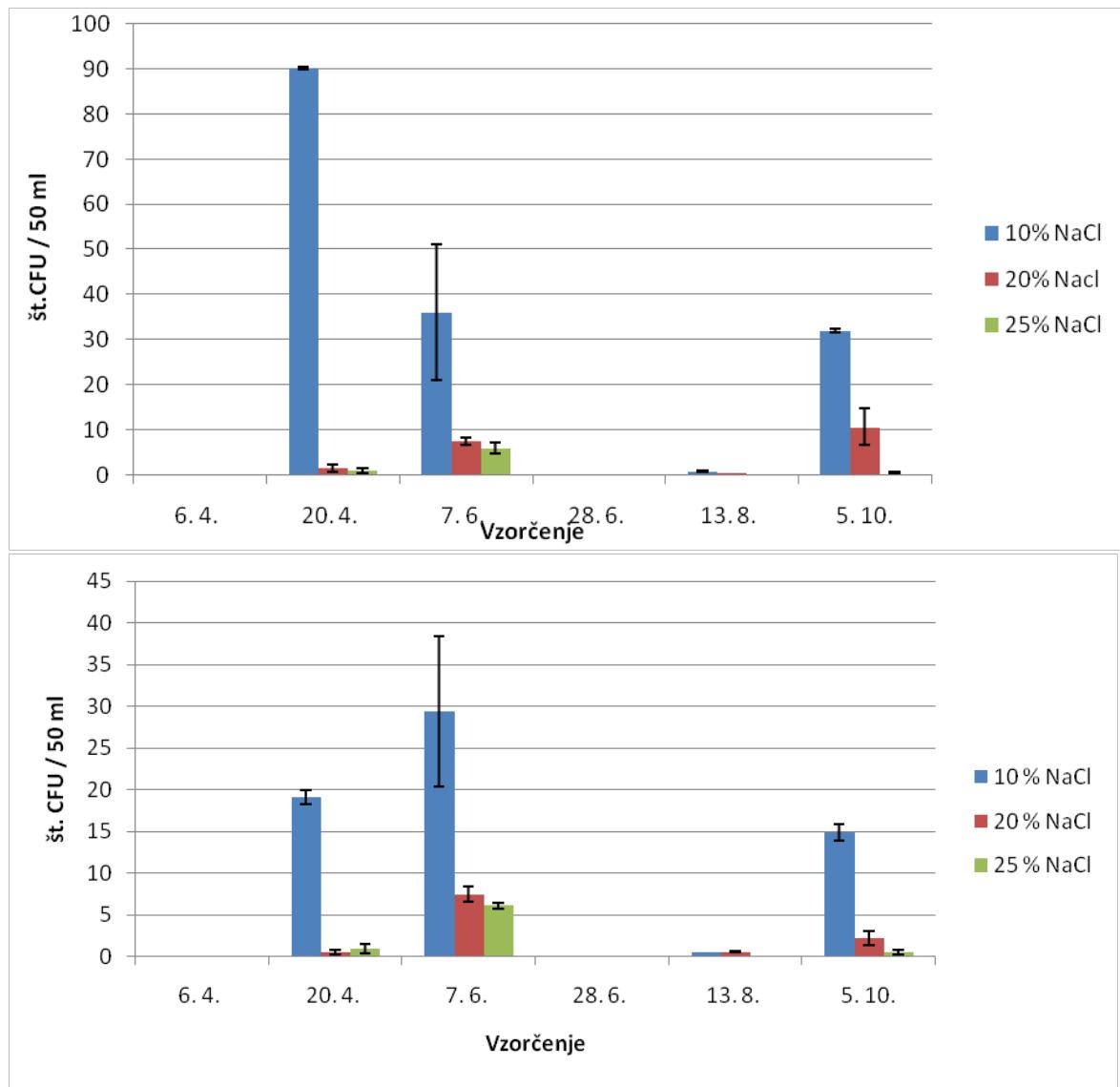
Legenda: genotip A predstavlja okoljske in klinične izolate iz tropskega in subtropskega pasu; genotip B predstavlja okoljske izolate zmernega klimatskega pasu. Sevi, označeni z rdečo, zeleno, modro in rumeno predstavljajo genotip A; sevi, označeni z vijolično, oranžno, roza in zeleno pa spadajo v genotip B. Z rdečo barvo sta označena seva, izolirana iz puščave Atacama, z zeleno so označeni sevi, ki so bili izolirani iz bolnikov z okužbo kože *tinea nigra*, z modro sta označena seva, ki so jih izolirali iz človeka ter ribe, rumeno so označeni sevi iz tal ter vode iz solin. Genotip B predstavlja vijolična in oranžna barva, kjer so vsi sevi izolirani iz solinske vode, z roza barvo sta označena seva, izolirana iz rastlin, z zeleno barvo pa je zopet označen sev, izoliran iz solinske vode. Z oznako T je označen tipski sev EXF-157. Uporabili smo 1 kb DNA lestvico.

4.3 MOLEKULARNA ANALIZA IN DETEKCIJA ČRNIH KVASOVK VRSTE *H. werneckii* V VODNIH VZORCIH SEČOVELJSKIH SOLIN

4.3.1 Spremljanje pojavnosti glive *H. werneckii* tekom sezone delovanja Sečoveljskih solin

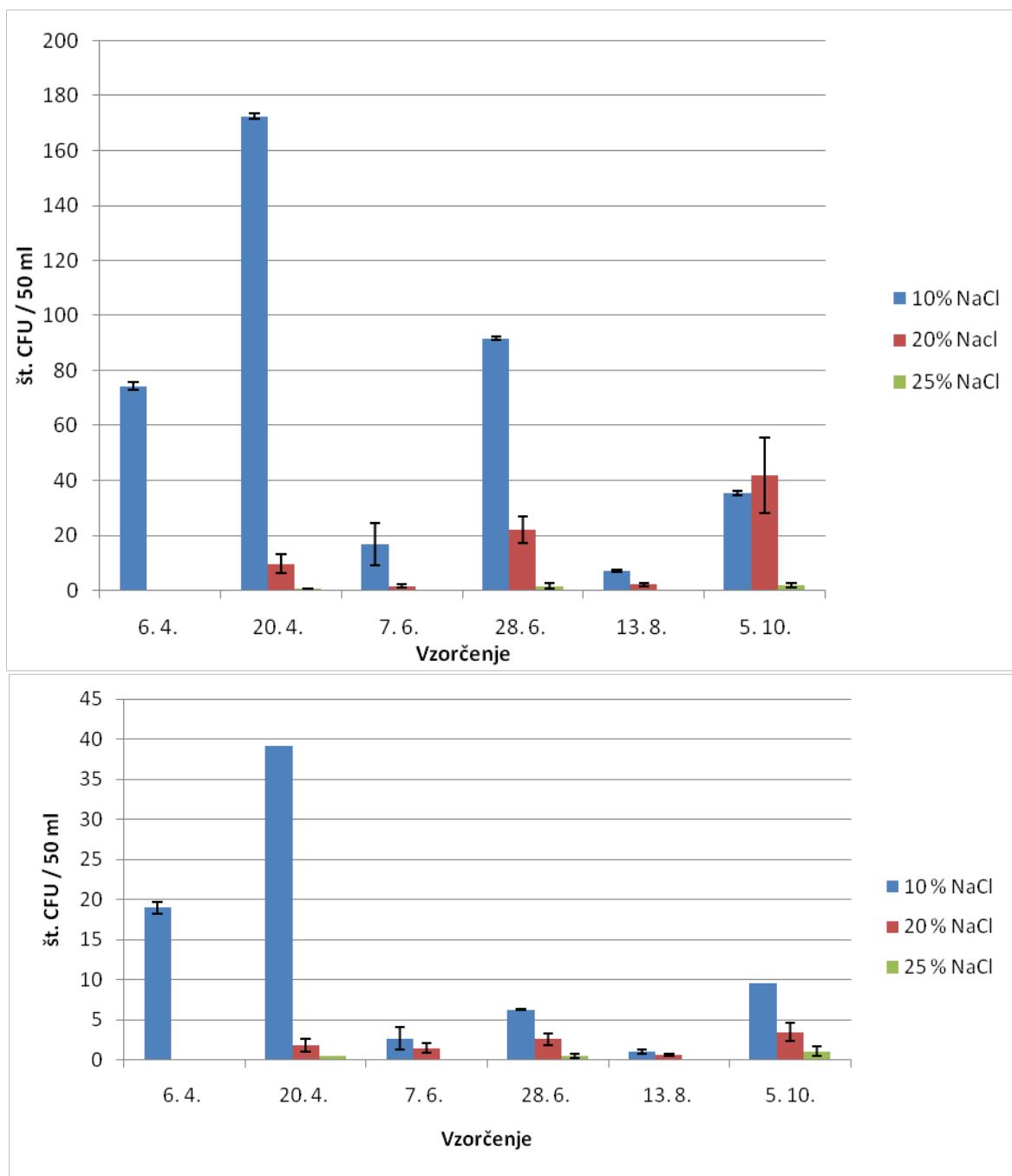
4.3.1.1 Detekcija celokupnega števila gliv ter črnih kvasovk vrste *H. werneckii* iz slanice Sečoveljskih solin s klasičnimi pristopi

Na sliki 26, sliki 27 in sliki 28 so predstavljeni rezultati detekcije celokupnega števila gliv in števila črnih kvasovk znotraj posameznih vzorčenih bazenov. Celokupno število gliv je bilo na začetku sezone največje, med glavno sezono se je število močno zmanjšalo, po sami sezoni pridobivanja soli pa je celokupno število gliv zopet naraslo. Število gliv je bilo celotno vzorčno sezono najmanjše v Kristalizacijskem bazenu, največje pa v Pilotskem bazenu 2/3 (predkristalizacijski tip bazena). Število črnih kvasovk je bilo največje na začetku vzorčenja, med samo sezono so bile še vedno prisotne, sicer v manjšem številu kot na začetku sezone, njihovo število je zopet naraslo po koncu same sezone. Med glavno sezono in po sami sezoni je med pojavnimi črnimi kvasovkami predvladovala vrsta *H. werneckii*. Največje število črnih kvasovk je bilo v Pilotskem bazenu skozi celotno vzorčno sezono, najmanjše pa v Kristalizacijskem bazenu.



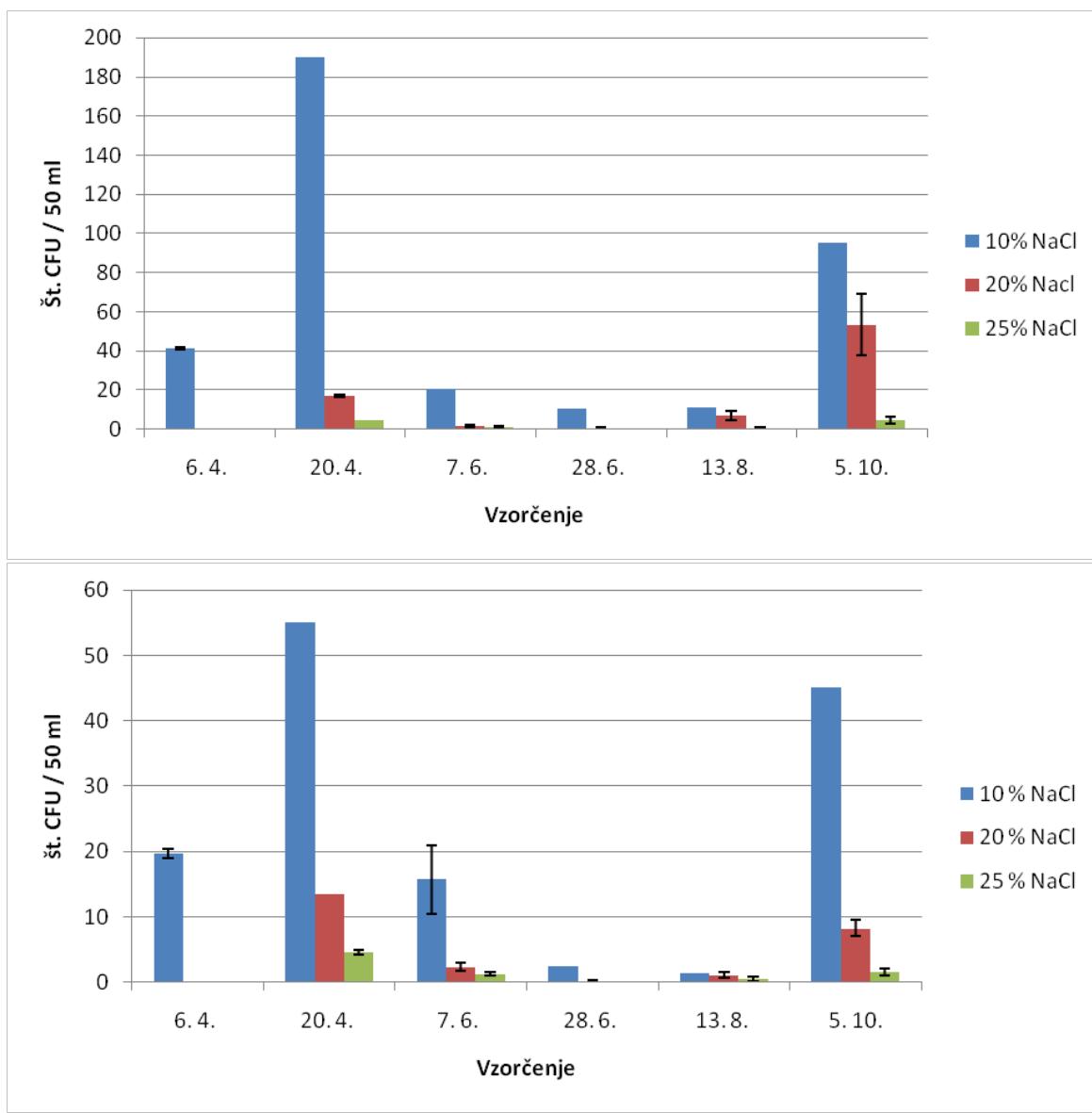
Slika 26: Celokupno glivno število zgoraj, ter število črnih kvasovk spodaj iz analizirane slanice kristalizacijskega bazena tekom celotne sezone.

Legenda: Število CFU predstavlja število kolonij v 50 ml vode po 4 tednih inkubacije pri 25 °C na ploščah MEA + 10 % NaCl, MEA + 20 % NaCl, MEA + 25 % NaCl.



Slika 27: Celokupno glivno število zgoraj ter število črnih kvasovk spodaj iz analizirane slanice bazena Poslužnica tekom celotne sezone.

Legenda: Število CFU predstavlja število kolonij v 50 ml vode po 4 tednih inkubacije pri 25 °C na ploščah MEA + 10 % NaCl, MEA + 20 % NaCl, MEA + 25 % NaCl.



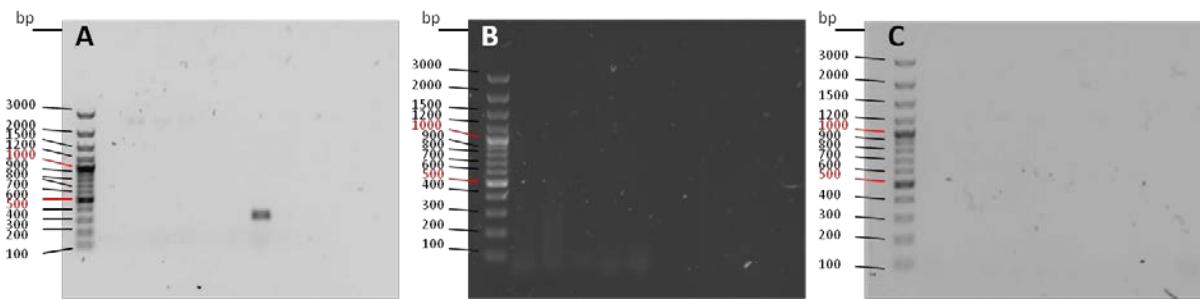
Slika 28: Celokupno glivno število zgoraj ter število črnih kvasovk spodaj iz analizirane slanice Pilotskega bazena 2/3 tekom celotne sezone.

Legenda: Število CFU predstavlja število kolonij v 50 ml vode po 4 tednih inkubacije pri 25 °C na ploščah MEA + 10 % NaCl, MEA + 20 % NaCl, MEA + 25 % NaCl.

4.3.1.2 Detekcija črnih kvasovk vrste *H. werneckii* iz slanic Sečoveljskih solin z molekularnimi pristopi

4.3.1.2.1 PCR tekom sezone s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za detekcijo *H. werneckii*

Na sliki 29 so prikazani rezulati pomnoževanja vzorcev okolske DNA iz Sečoveljskih solin s specifičnimi nukleotidnimi začetniki Hor-F in Hor-R. Pomnoževanje vzorcev ni bilo uspešno, uspešno je bilo samo pomnoževanje pozitivne kontrole.

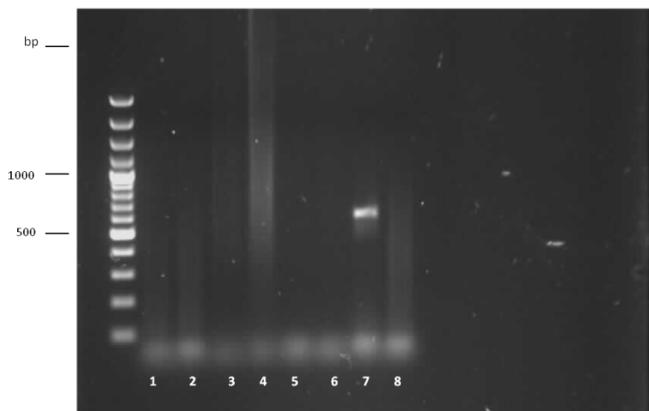


Slika 29: PCR pomnožki tekom sezone s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi Hor-F in Hor-R za detekcijo *H. werneckii* iz vzorcev celukopne izolirane DNA.

Legenda: DNA smo pridobili z različnimi komercialnimi kompleti. A začetek sezone (1. vzorčenje, Ultra clean™ izolacijski komplet), pozitivna kontrola EXF-225; B sredina sezone (3. vzorčenje, izolacijski komplet PowerWater® Sterivex™ izolacijski komplet); C glavna sezona (5. vzorčenje, PowerWater® izolacijski komplet).

4.3.1.2.2 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (Real Time PCR)

Pomnoževanje vzorcev okoljske DNA iz Sečoveljskih solin z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času ni bilo uspešno. Uspešno je bilo samo pomnoževanje pozitivne kontrole (slika 30).

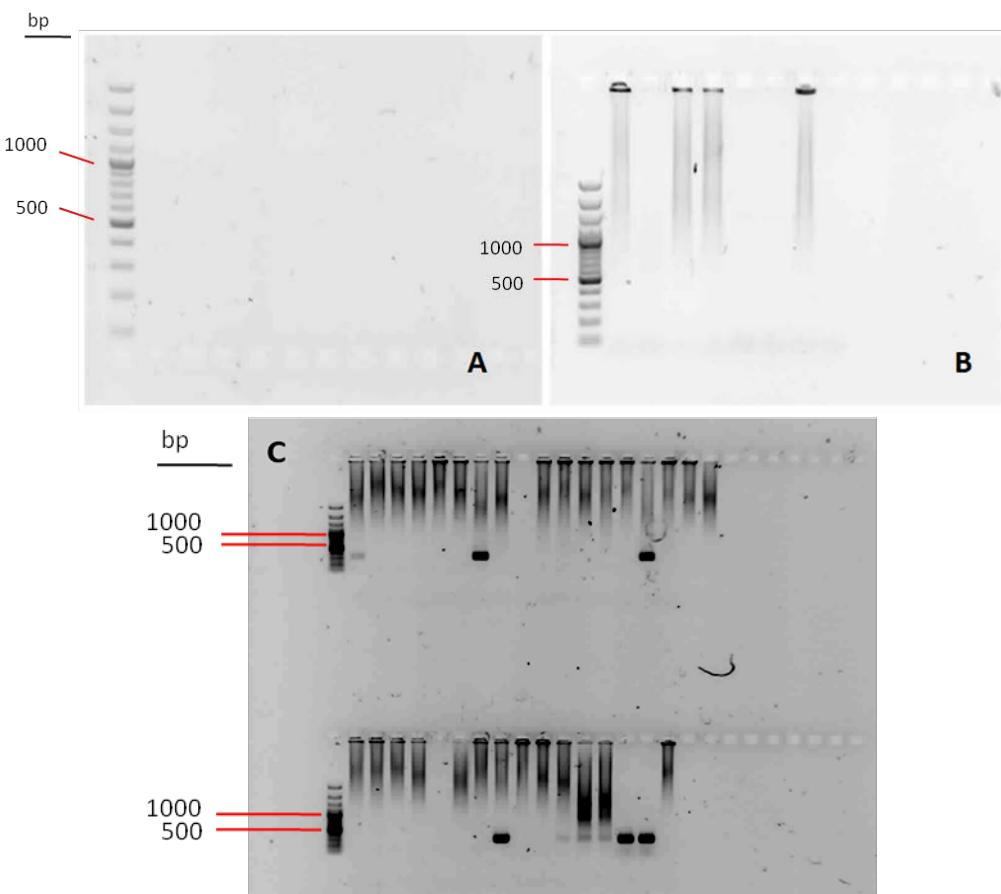


Slika 30: Pomnoževanje okoljskih vzorcev DNA z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (RT-PCR).

Legenda: Pomnoževanje okoljskih vzorcev DNA, ki smo jih pridobili pri petem vzorčenju (avgust, PowerWater® izolacijski komplet); uporabili smo začetne nukleotide za pomnoževanje translacijskega elongacijskega faktorja 1- α . Na poziciji 7 je pozitivna kontrola, na poziciji 8 je negativna kontrola.

4.3.1.2.3 Rezultati vgnezdenje PCR metode pomnoževanja s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za detekcijo *H. werneckii*

Pomnoževanje okoljskih vzorcev z vgnezdeno metodo PCR in nukleotidnimi začetniki Hor-F in Hor-R ni bilo uspešno, če smo reakcijsko mešanico pripravili sami (slika 31 A, slika 31 B). Pomnoževanje je bilo uspešno, če smo uporabili komercialno pripravljeno reakcijsko mešanico (slika 31 C).

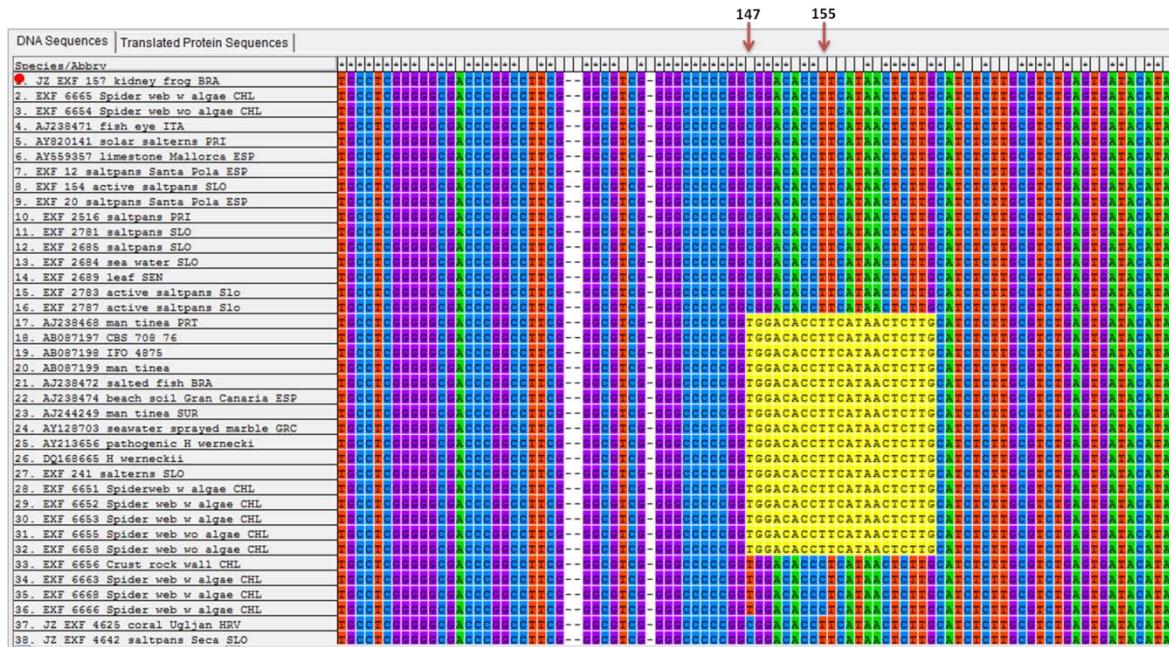


Slika 31: Pomnoževanje okoljskih vzorcev z vgnezdeno PCR metodo in začetnimi nukleotidi Hor-F in Hor-R.

Legenda: **A** Prvi PCR, pomnoževanje celokupne izolirane DNA z glivnimi specifičnim začetnimi oligonukleotidi ITS 1F in ITS 4; **B** Drugi (nested) PCR z matrično DNA iz prvega PCR (A) pomnoževanja s specifičnimi začetnimi oligonuklotidi Hor-F in Hor-R za identifikacijo *H. werneckii* iz okoljskih vzorcev. Oba postopka PCR smo izvedli z reakcijsko mešanicó (angl. Master Mix), ki smo ga pripravili sami; **C** prvi PCR, pomnoževanje celokupne izolirane DNA z glivnimi specifičnim začetnimi oligonukleotidi ITS 1F in ITS 4; Drugi (nested) PCR z matrično DNA iz prvega PCR pomnoževanja s specifičnimi oligonuklotidi Hor F in Hor R za identifikacijo *H. werneckii* iz okoljskih vzorcev. Oba postopka PCR smo izvedli s komercialno pripravljenou reakcijsku mešanicou (Master Mix od proizvajalca Fermentas).

4.3.1.2.4 Naleganje za *H. werneckii* specifičnega začetnega oligonukleotida Hor-F na regijo ITS genoma

Na Sliki 32 je predstavljeno naleganje specifičnega začetnega nukleotida Hor-F na poravnana nukleotidna zaporedja ITS regije. Samo naleganje ni ustrezno. Začetni nukleotid Hor-F nalega na mesto 147 znotraj nukleotidnega zaporedja regije ITS, kjer je nukleotidna baza timin. Sevi, ki imajo na mestu 147 nukleotidno bazo citozin, so iz analize tako izključeni. Problematično je tudi mesto 155, saj oligonuklotidi pokrijejo mesto, če je prisoten timin, če pa je prisoten citozin, pa zaporedja ne prepoznajo več. Začetni oligonukleotid nalega le na seve, osamljene iz bolnikov in specifičnih okolij (puščava Atacama, sediment v Bengalskem zalivu, ...), torej tistih, ki imajo na mesti 147 timin, medtem ko večino solinskih sevov izpusti. Pravtako začetni nukleotid ne nalega na tipski sev *H. werneckii* EXF-157.

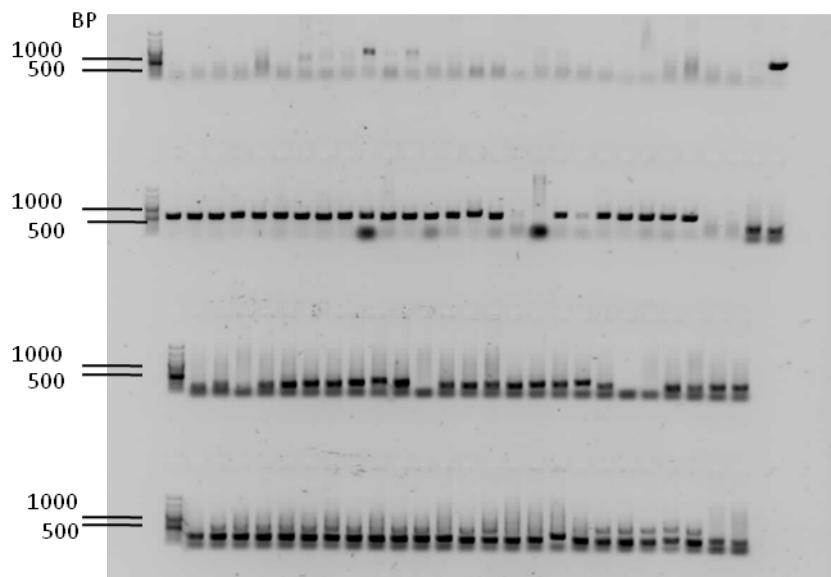


Slika 32: Naleganje specifičnih začetnih oligonukleotidov Hor-F znotraj poravnane zaporedije nukleotidov regije ITS za detekcijo *H. werneckii* iz vzorcev celokupne DNA.

Legenda: regija naleganja specifičnih začetnih oligonukleotidov Hor-F je označena z rumeno barvo; rdeča pika označuje tipski sev EXF-157.

4.3.1.2.5 Rezultati pomnoževanja vgnezdenje PCR reakcije za celokupno detekcijo gliv iz okoljskih vodnih vzorcev

Pomnoževanje okoljske glivne DNA z metodo vgnezde PCR reakcije je bilo uspešno, ustreznii pomnožki so se pojavili po drugi PCR reakciji (slika 33).

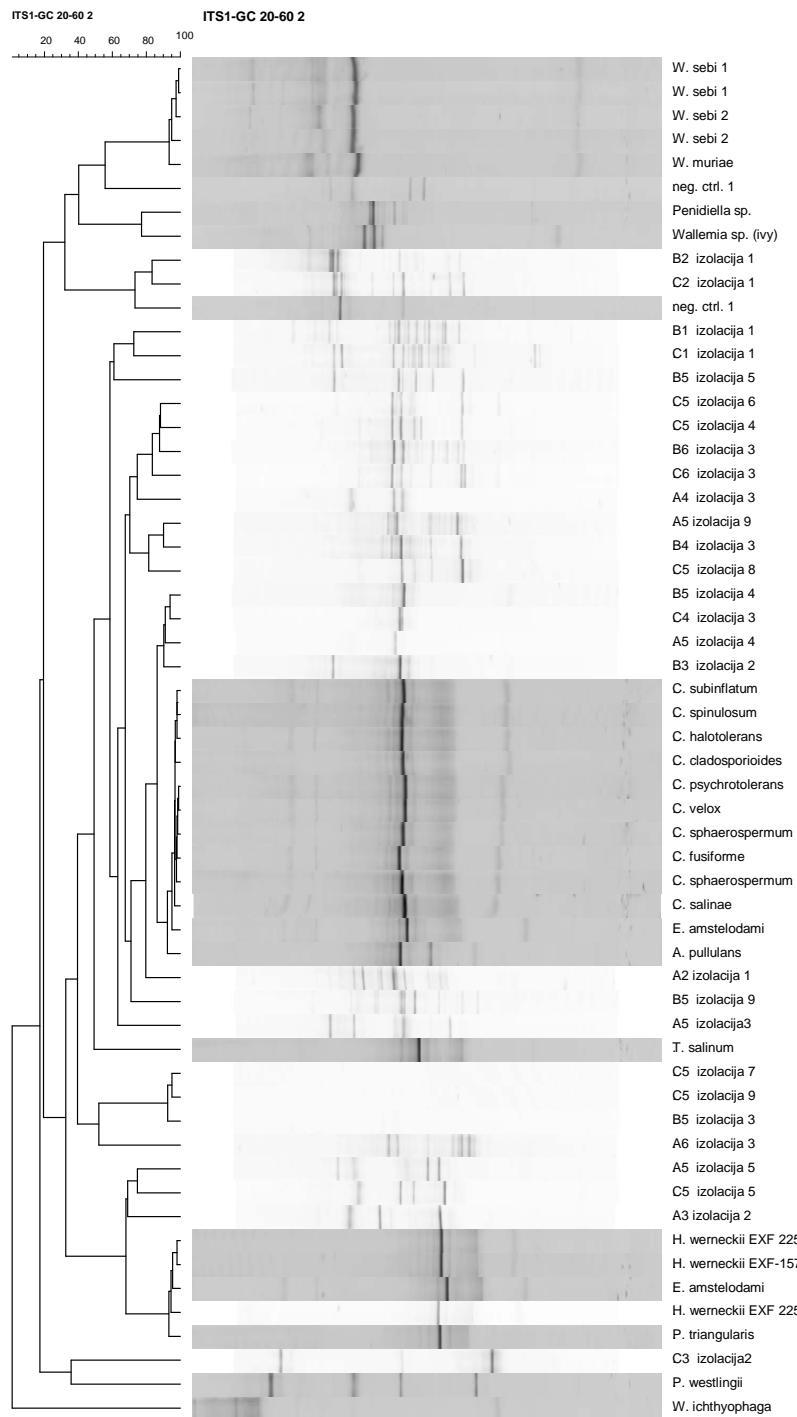


Slika 33: Vgnezdena PCR reakcija okoljskih vzorcev celokupne DNA s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za detekcijo gliv.

Legenda: prva reakcija z specifičnimi začetnimi oligonukletidi ITS1F in ITS4 (prva vrstica vzorčkov) nato pa druga reakcija PCR z matrico prvega PCR in specifičnimi začetnimi oligonukleotidi ITS 1GC ter ITS 2 (druga, tretja in četrta vrstica na 1 % agaroznem gelu v 1x TAE pufru).

4.3.1.2.6 DGGE profili okoljskih vzorcev DNA

Rezultati analize lis, ki smo jih pridobili z gelsko elektroforezo z denaturacijskim gradientom in obdelali s programom BioNumerics so predstavljeni na sliki 34 in sliki 35. Z izrazom izolacija je označen način pridobitve celokupne DNA iz okoljskih vzorcev. Vrsto *H. werneckii* smo zaznali v vseh vzorčenih tipih bazenov.



Slika 34: Filogenetsko drevo DGGE lis okoljskih vzorcev ter pozitivnih kontrol.

Legenda:

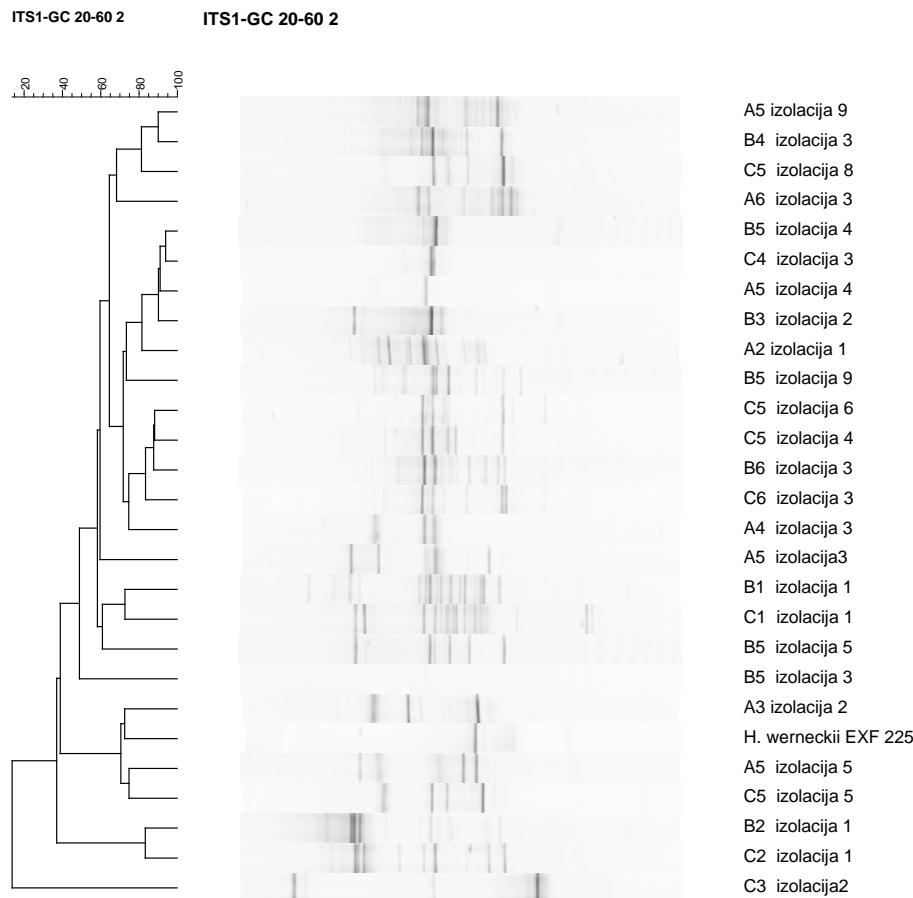
Ustreza

legendi

pod

sliko

35.



Slika 35: Filogenetsko drevo DGGE lis okoljskih vzorcev izolirane DNA ter pozitivne kontrole *H. werneckii* EXF-225.

Legenda: pomnožki, pridobljeni z nested PCR reakcijo (kompleti začetnih oligonuklotidov ITS 1F in ITS 4 ter ITS 1GC ter ITS 2), razviti z DGGE analizo ter analizirani s programom BioNumerics. Z izrazom izolacija je označen način pridobitve celokupne DNA iz okoljskih vzorcev. Izolacija 1: izolacija s kompletem Ultra Clean™ Water DNA Isolation Kit; izolacija 2: izolacija s kompletem PowerWater® Sterivex™ DNA Isolation Kit; izolacija 3: izolacija s kompletem PowerWater® DNA Isolation Kit; izolacija 4: izolacija s kompletem Ultra Clean™ Water DNA Isolation Kit ter dodatnim korakom segrevanja pri 65 °C; izolacija 5: izolacija s centrifugiranjem vodnega vzorca v prvem koraku in pridobivanju peleta, nato pa tretiranje pridobljenjega peleta s kompletem Ultra Clean™ Water DNA Isolation Kit ter dodatnim korakom segrevanja pri 65 °C; izolacija 6: izolacija s centrifugiranjem vodnega vzorca v prvem koraku in pridobivanju peleta, čiščenje peleta z 0,9 % fiziološko raztopino ter nato izolacija DNA s klasično metodo mehanske lite in tretiranja s CTAB pufrom; izolacija 7: izolacija s centrifugiranjem vodnega vzorca v prvem koraku in pridobivanju peleta ter izolacija DNA s klasično metodo mehanske lite in tretiranja s CTAB pufrom; izolacija 8: izolacija DNA s kompletem Power Biofilm™ DNA Isolation Kit; izolacija 9: izolacija DNA s centrifugiranjem vodnega vzorca v prvem koraku in pridobivanju peleta, čiščenje peleta z 0,9 % fiziološko raztopino ter nato izolacija DNA s kompletem PowerWater® DNA Isolation Kit.

5 RAZPRAVA

5.1 FENOTIPSKA ANALIZA GLIVNIH IZOLATOV ČRNIH KVASOVK VRSTE *Hortaea werneckii*

Rast in pojavljanje različnih morfoloških oblik na gojiščih z različno slanostjo

Črna kvasovka *H. werneckii* je značilno polimorfna ter genetsko zelo heterogena, zato je prišlo v preteklosti do večkratne spremembe njenega poimenovanja (Zalar in sod., 1999, Cabanes in sod., 2012). Kriterija za njeno identifikacijo sta temno pigmentirane hife, ki so gosto septirane ter dvocelični konidiji (Nishimura, 1994). Pri gojenju *H. werneckii* na gojiščih z različno slanostjo smo skušali opaziti znotraj vrste razlike na mikromorfološkem nivoju (Slika 16). Ugotovili smo, da je več različnih pojavnih oblik črne kvasovke najverjetnejše posledica njene prilagoditve na življenje v izjemno slanem okolju. Pri nižjih koncentracijah NaCl v okolju sta prevladujoči oblici dvocelični konidiji ter temno pigmentirane hife. Pri višjih koncentracijah soli pa prevladujejo meristematski skupki z debelo celično steno, pojavljajo pa se tudi dvocelični konidiji, vendar se ti po velikosti razlikujejo od tistih pri nižji slanosti. Najpomembnejša značilnost za identifikacijo *H. werneckii* je izmenjujoča se anelidna konidiogeneza, opazna tako na kratkih nediferencianih konidiogenih celicah, kot na samih kvasnih celicah (Nishimura, 1994). Konidiogenezo lahko opazujemo le z visoko ločljivim elektronskim mikroskopom (npr. SEM), zato lahko vrsto izključno na osnovi morfoloških značilnosti zlahka zamenjamo z nesorodnim rodom patogenih črnih kvasovk *Exophiala*, predvsem z vrsto *E. salmonis*. Identifikacija kliničnih izolatov je zaradi slabe sporulacije otežena. Kot dodaten fiziološki znak pri klasični morfološki identifikaciji vrste lahko uporabljam halotoleranco (Zalar in sod., 1999; Abliz in sod., 2003) ter prisotnost meristematskih hif in endokonidijev (Chen in sod., 2012). Tovrstna morfologija je značilna tudi za druge črne kvasovke iz rodov *Phaeotheca*, *Hyphospora* in *Trimmatostroma* (Zalar in sod., 1999; Chen in sod., 2012). Tekom našega dela smo halotoleranco vrste *H. werneckii* uporabili pri klasični identifikaciji na nivoju morfologije ter s tem skušali določiti znotrajvrstno raznolikost. Pri nižjih slanostih je morfologija *H. werneckii* značilno polimorfna (de Hoog, 1993; Wollenzein in sod., 1995; Sterflinger in sod., 1999; Zalar in sod., 1999). V sklopu naše

raziskave smo na vseh gojiščih, kjer je rastla *H. werneckii*, opazili trend povečanja števila različnih pojavnih oblik glive z daljšim časom inkubacije, vendar se to po določenem časovnem intervalu ustavi, stagnira, in potem je naprej opazna prevlada le ene pojavne oblike – kvasne, kvasno-filamentozne, filamentozne ali meristematske oblike, čeprav so v preteklosti opisali, da se gliva lahko pojavlja le v kvasni ali filamentozni obliki (Nishimura, 1994). Sklepamo, da verjetno prevlada za glivo najbolj uspešna in ugodna oblika v danih razmerah. Z višanjem slanosti je opazna tudi prevlada kvasne oblike rasti, ki se pri daljši inkubaciji spremeni v meristematsko rast. Pri optimalni koncentraciji soli (5 do 10 % NaCl v gojišču oz. 1,0 do 3,0 M NaCl v okolju) (Gunde-Cimerman in sod., 2000) je pestrost pojavnih oblik najmanjša in narašča z višanjem koncentracije dodane soli v gojišču. Opazili smo trend ireverzibilne transformacije iz kvasne v filamentozno obliko. Klinični in okoljski izolati se na tej osnovi niso razlikovali. Velikost kolonij je bila na gojišču z optimalno koncentracijo soli največja, sledila je rast na gojišču brez soli, nato na 20, 25 in 30 % soli. Glede na samo okolje izolacije seva ne moremo sklepati na pojavno obliko rasti. Na gojišču MEA brez dodane soli (Slika 8) so rastli vsi sevi razen dveh. Ta dva seva sta bila osamljena iz izjemno slane vode Sečoveljskih solin ter drevesa *Casuarina equisetifolia* iz Kanarskih otokov (CBS 255.96) in sta halofilna, kar še ni bilo opaženo pri tej vrsti. Kot je razvidno iz Slike 11 (gojišče s 25 % NaCl), so se iz začetne prevladajoče kvasne ter kvasno-filamentozne oblike rasti razvile zelo raznolike kolonije, s prevlado kvasno-meristematske oz. večinsko meristematske oblike, ki je bila pričakovana pri tej vsebnosti soli v gojišču (Sterflinger, 1998). Sklepamo, da je rast glive na tako visoki slanosti posebnost le nekaterih, na visoko slanost prilagojenih sevov iz izjemno slane vode solin, tako iz Sredozemlja kot tudi iz tropskih območij. Dva seva sta bila izolirana iz rib. Prvi sev je bil izoliran iz ribe vrste *Osteoglossum bicirrhosum*, ki se pojavlja v Južni Ameriki, pretežno v amazonskem porečju (Ferraris, 2003), drugi sev je bil osamljen iz ribe, vrste *Spondylisoma cantharus*, ki se pojavljaja v vzhodnem Atlantiku od Skandinavije do Namibije, Sredozemlju in Črnem morju (Bauchot in Hureau, 1990). Na gojišču z dodatkom 30 % NaCl ni rastel noben klinični izolat, prav tako pa niso rastli vsi solinski sevi pri takšni koncentraciji soli v gojišču. Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko hipotezo, da se pojavnost patogenih sevov z višanjem slanosti v okolju zmanjšuje, potrdimo samo delno, saj tudi solinski sevi ne rastejo pri tako visoki koncentraciji soli.

Vpliv prisotnosti antibiotika v gojišču na rast *H. werneckii*

Za spremljanje dinamike populacije gliv s klasičnimi pristopi za različne tarčne glive raziskovalci uporabljajo različne antibiotike. Tekom raziskovalnega dela smo testirali vpliv antibiotika kloramfenikol na rast glive *H. werneckii*. Po štiritedenski inkubaciji na gojišču z antibiotikom smo ugotovili, da ta ne vpliva na rast omenjene glive. Opazili smo le manj intenzivno in upočasnjeno melanizacijo kvasovk na gojišču z dodanim antibiotikom.

Pomnoževanje različnih odsekov DNA za ugotavljanje heterogenosti znotraj vrste *H. werneckii*.

Pri glivah se za taksonomske študije uporablja različne regije genoma kot npr. majhno podenoto (SSU) in veliko podenoto (LSU) rRNA genov, regijo notranjih distančnikov (ITS), ki ločuje dva rRNA gena ter druge (Diaz in sod., 2005). Tekom raziskovalnega dela smo pridobili nukleotidna zaporedja regije ITS rDNA, ki je najbolj uveljavljena črtna koda za identifikacijo gliv (Diaz in sod., 2005). Uporabljajo jo tudi za razlikovanje med glivami, ki povzročajo površinske mikoze (Chen in sod., 2001). Regija LSU rDNA se uporablja za razlikovanje med asko- in bazidiomicetnimi kvasovkami. Vsebuje dve hipervariabilni regiji, imenovani D1 in D2, ki jih pri večini gliv obdajajo relativno konzervativne regije 26S RNA. LSU zaporedje zato služi predvsem kot molekularni označevalec za umestitev novih vrst gliv iz okoljskih raziskav v celoten filogenetski okvir, služi pa tudi za bazalne analize glivnih linij (Liu in sod., 2012).

Poleg zapisov za ribosomske RNA se v zadnjih letih uporabljajo funkcionalni ali t.i. gospodinjski geni, med katerimi so najpogosteje uporabljeni zapis za RNA polimerazo II, translacijski elongacijski faktor 1 α , del gena, ki kodira beta tubulin, aktin in kalmodulin (Liu in sod., 1999; Helgason in sod., 2003; Einax in sod., 2003; de Carvalho in sod., 2003; Krausa in sod., 2003). Nekatere izmed njih (RNA polimeraza II, translacijski elongacijski faktor 1 α , beta tubulin in kalmodulin) smo uporabili tudi pri našem raziskovalnem delu. Veliko število različnih zapisov smo uporabili zato, ker vsi zapisi niso primerni za vse glive, zato je izbor pravega ključen za študije taksonomije in filogenije gliv vrste *H. werneckii*. Uporabljeni geni morajo biti hkrati dovolj konzervativni in variabilni (Roger in sod., 1999).

RNA polimeraza II je encim, ki prepisuje pre-mRNA. Njeni dve veliki podenoti uporabljajo pri proučevanju evolucije različnih evkariontskih organizmov. Gen za RPB2, ki kodira drugo največjo podenoto RNA polimeraze II, ima majhno stopnjo evolucijskih sprememb, kar omogoča njegovo uporabo tudi za filogenetsko ločljivost znotraj askomicet (Liu in sod., 1999).

Gen za trankripcijski elongacijski faktor 1 α (TEF) je običajno prisoten v genomu v eni kopiji in kodira translacijske elongacijske faktorje, ki sodelujejo pri kontroli hitrosti in natančnosti proteinske sinteze na ribosomih (Helgason in sod., 2003).

Proteini tubulini igrajo ključno vlogo v evkariontskih celičnih procesih. Kot osnovne podenote mikrotubulov predstavljajo glavne sestavine celičnega skeleta (vključno z mitotskim vretenom) in evkariontskih flagelov. Sestavljajo dinamične polimere mikrotubuline, ki sodelujejo pri kromosomski segregaciji, delitvi celic, obliku celic. Obstaja 7 vrst tubulinov, α in β tubulini so najpogosteji v evkariontski celic, njihovi heterodimeri so osnovne sestavine mikrotubulov. Geni za tubuline, še zlasti za β -tubulin, so uporabni za evolucijske in filogenetske študije kot tudi študije kompleksnih vrst protistov, živali, gliv in rastlin (Einax in sod., 2003).

Kalmodulin (CAM) modulira znotrajcelično signalizacijo s kalcijem (Ca^{2+}), vključuje se v številne znotrajcelične presnovne poti in regulira izražanje genov v mnogih evkariontskih organizmih, vključno s človeškimi glivnimi patogeni, kot so *Candida albicans* in *Histoplasma capsulatum* (de Carvalho in sod., 2003). Signalizacija s kalcijem preko kalmodulina in lakkinevrina je ključnega pomena pri uravnavanju stresnih odzivov pri glivah. Funkcije kalmodulina in lakkinevrina so v veliki meri ohranjene pri patogenih in modelnih glivah. (Krausa in sod., 2003).

Za izbor primerne molekularne markerje za določitev znotrajrstne variabilnosti smo izbrali 8 sevov vrste *H. werneckii* osamljenih iz različnih naravnih habitatov (tla, ledvica, *tinea nigra*, soline iz Slovenije, Španije ter Portorika). Pomnoževali smo različne odseke DNA: ITS, LSU rRNA genov, drugo veliko podenoto RNA polimeraze II (RPB2), dva različna pomnožka genov, ki kodirajo elongacijski faktor 1 α (EF-1 α), dva gena za β -tubulin ter gen za kalmodulin. Pomnoževanje izbranih odsekov DNA (Preglednica 13) je bilo pri EF-1 α uspešno, pri ostalih odsekih pa je bil odstotek uspešnosti pomnoževanja manjši. Pri manjšem odseku EF-1 α , kalmodulinu ter RPB2 odsekih smo zaznali prisotnost nespecifičnih pomnožkov (Slika 17). Pomnožkom smo določili njihovo nukleotidno

zaporedje, jih uredili in poravnali ter primerjali. Kot najbolj heterogen in variabilen molekularni marker pri *H. werneckii* se je izkazal gen za kalmodulin, zaradi česar ni zanesljiv in uporaben za nadaljnje filogenetske analize. Zapisi za RPB2 in β-tubulin so imeli približno enako uspešnost pomnoževanja (50 – 60 %) ter tudi niso predstavljali zadostne genetske podpore, da bi jih lahko uvrstili v filogenetsko analizo. Najbolj uspešen molekularni marker je bil gen za translacijski elongacijski faktor 1α. Iz poravnanih nukleotidnih zaporedij smo s programom MEGA 5 za vsak odsek DNA posebej izrisali filogenetsko drevo. S tem smo potrdili hipotezo, da je regija ITS genoma *H. werneckii* preveč variabilna in je zato neprimerno zaporedje za določevanje vrste *H. werneckii*, saj smo z ostalimi pomnoženimi regijami pridobili zanesljivejša filogenetska drevesa z večjo resolucijo (Slike 20, 21, 22, 23 in 24). Vsa so nakazovala vsaj dve skupini znotraj vrste *H. werneckii*, medtem ko smo s filogenetskim drevesom ITS (Slika 19) pridobili vsaj štiri skupine znotraj vrste.

Znotrajvrstno raznolikost *H. werneckii* so raziskovalci že proučevali. Sprva so uporabili različne metode prstnega odtisa, in sicer kariotipizacijo (Boekhout in sod., 1993), Uijthof in sodelavci so uporabili RAPD analizo za določanje razlik znotraj vrste (Uijthof in sod., 1994). Rezultati so pri obeh nakazovali več skupin znotraj vrste *H. werneckii*. Sledila je RFLP analiza mitohondrijske DNA (de Cock in sod., 1994) in RFLP analiza 18S rDNA (Zalar in sod., 1999) številnih izolatov iz različnih okolij. Tudi ti so opazili pojav več različnih skupin znotraj vrste *H. werneckii*. Sledila je analiza krajsih odsekov, kot npr. analiza 5,8S rDNA, s katero zaradi konzervativnosti zaporedja razlik med sevi niso zaznali (de Hoog in sod., 1999). Z analizo nukleotidnih zaporedij celotne ITS regije pa so Abliz in sodelavci (2003) odkrili nukleotidne substitucije, na podlagi katerih so lahko določili dva tipa znotraj vrste *H. werneckii*. Analiza primerjave nukleotidnih zaporedij D1/D2 rDNA in ITS rDNA pri vrstah *H. werneckii* in *Exophiala* je pokazala, da se vrsti v prvem zaporedju razlikujeta v 100 nukleotidih, medtem ko se v ITS regiji razlikujeta v 200 nukleotidih (Abliz in sod., 2003). Ng in sodelavci (2005) so primerjali nukleotidna zaporedja pomnožkov 306 baznih parov, ki so jih pridobili s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za *H. werneckii* (Hor F in Hor R, ki so jih oblikovali Abliz in sod., 2003). Na podlagi primerjave nukleotidnih zaporedij so ugotovili, da sta znotraj vrste *H. werneckii* dve skupini (Ng in sod., 2005). Podobno so ugotovili tudi Cabanes in sodelavci (2012), ki so različne seve *H. werneckii* iz različnih okolij na osnovi filogenetske analize ITS in D1/D2

zaporedij uvrstili celo v tri različne genotipe. Niso pa uspeli vzpostaviti nobene specifične povezave med genotipi in ekologijo le-teh (Cabanes in sod., 2012). Chen in sodelavci (2012) so analizi ribosomskih genov dodali še zaporedja elongacijskega faktorja 1 α in potrdili, sicer na manjšem številu izolatov, obstoj vsaj dveh sorodnih, a vendar različnih genotipov (Chen in sod., 2012).

Filogenetska drevesa (Slike 20, 21 in 22) so pri vseh pomnoženih regijah (EF-1 α , β -tubulin in RPB2) nakazala prisotnost vsaj dveh genetsko različnih skupin znotraj vrste *H. werneckii* in to z zadostno podporo. Na osnovi rezultatov, prikazanih na Sliki 17 in v Preglednici 13 smo se za nadaljnjo analizo odločili za uporabo gospodinjskega gena za translacijski elongacijski faktor 1 α (večji odsek gena (1100 bp)), ki je dovolj ohranjen in hkrati dovolj variabilen za filogenetsko analizo vrste *H. werneckii*, s čimer smo potrdili delovno hipotezo, da bomo na osnovi primerenega lokusa lahko znotraj rodu *Hortaea* oz. znotraj danes priznane vrste *H. werneckii* predvidoma ločili več genotipov.

S programsko opremo PAUP smo po kriterijih maksimalne parsimonije izrisali filogenetsko drevo vseh analiziranih sevov na podlagi treh zaporedij, ITS, LSU in EF-1 α (Slika 23). Tudi s tem filogenetskim drevesom smo uspeli dokazati dva genetsko ločena genotipa znotraj vrste *H. werneckii*, en genotip bolj in drugi manj podprt. Ta dva genotipa se tudi ekološko razlikujeta, v genotipu A so okoljski in klinični izolati (vsi izolati so bili osamljeni iz tropskega in subtropskega pasu), v genotipu B pa se pojavljajo izključno okoljski izolati (osamljeni iz zmerrega klimatskega pasu). Genotip A se deli še na 2 skupini, genotip A1 z izključno kliničnimi izolati ter genotip A2 z okoljskimi in kliničnimi izolati. V genotip A1 spada tudi tipski sev vrste *H. werneckii*, CBS 115.90, ki je bil izoliran iz ledvice žabe v Braziliji.

Če torej primerjamo našo razporeditev genotipov A in B z do sedaj znanimi rezultati znotrajvrstne raznolikosti (Preglednica 14) opazimo, da se rezultati skladajo z raznolikostjo, ki so jo dobili Zalar in sodelavci (1999) z uporabo rDNA RFLP tehnike.

Podatki, ki smo jih pridobili z metodo prstnega odtisa z nukleotidnim začetnikom M13 (Slika 25) prav tako nakazujejo na veliko vrstno heterogenost. Okoljski izolati iz zmernih solinskih voda so se večinoma umestili v druge skupine kot klinični sevi. Primerjava metode prstnega odtisa M13 (Slika 25) in filogenetskega drevesa (Slika 23 in Slika 24) je pokazala, da se sevi skladno grupirajo v dve ločeni genetski skupni, z opaznimi razlikami med genotipi znotraj vrste.

5.2 DETEKCIJA ČRNIH KVASOVK VRSTE *H. werneckii* IZ SLANICE SEČOVELJSKIH SOLIN

Spremljanje pojavnosti *H. werneckii* tekom sezone delovanja Sečoveljskih solin

Princip zgoščevanja morske vode od vstopa v soline do same kristalizacije soli se med posameznimi solinami ne razlikuje. Vodo vodijo preko zaporednega sistema izparitvenih bazenov in ko voda v posameznem bazenu doseže ustrezen slanost, jo prečrpajo v naslednji red bazenov (Gunde-Cimerman in sod., 2000). Pri približno 14 % slanosti se pojavi precipitacija kalcijevega karbonata (CaCO_3) v obliki aragonita ali kalcita, pri 22 % slanosti pa precipitira sadra ($\text{CaSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$). Takšno slanico nato prečrpajo v pred-kristalizacijske bazene. Ko doseže slanost 29 %, jo prečrpajo v kristalizacijske bazene, kjer pride do precipitacije halita (NaCl), voda, ki ostane, pa se imenuje grenčica in vsebuje pretežno Mg^{2+} , K^+ , Cl^- in SO_4^{2-} ione (Butinar in sod., 2005b; Tkavc, 2012). V vzorčeni solinski vodi smo poleg mikrobiološke analize spremljali tudi njen kemijsko sestavo. Rezultati kemijske analize vode so prikazani v Prilogi A, sestava morske vode na začetku izparitvenega procesa je predstavljena v Prilogi B, sestava matične vode, ki ostane po procesu kristalizacije NaCl pa je predstavljena v Prilogi C.

Sečoveljske soline so največe slovenske delajoče solarne soline. Ležijo na jugovzhodnem delu Piranskega zaliva, ob delti reke Dragonje ter na meji z Republiko Hrvaško (Gunde-Cimerman in sod., 2000). Zaradi submediteranskih klimatskih pogojev je pridelava soli v Sečoveljskih solinah mogoča od maja do oktobra (Butinar in sod., 2005b).

Mikrobiota v solinskih vodah globalno gledano obsega meristematske melanizirane kvasovkam podobne glive in različne sorodne vrste rodu *Cladosporium* (Gunde-Cimerman in sod., 2000; Butinar in sod., 2005c; Zalar in sod., 2007), nemelanizirane kvasovke (Butinar in sod., 2005b), filamentozne rodove *Wallemia*, *Scopulariopsis* in *Alternaria* (Gunde-Cimerman in sod., 2005; Zalar in sod., 2005) in različne vrste rodu *Aspergillus* in *Penicillium* z njihovimi teleomorfnimi oblikami (*Eurotium*, *Emericella* in *Petromyces*) (Butinar in sod., 2005a). Znotraj Ascomycota so glavni predstavniki halotolerantnih gliv iz redov Capnodiales, Dothideales in Eurotiales. Red Capnodiales in Dothideales imata kserotolerantno nagnjenost in v ta dva redova spada veliko število ekstremno tolerantnih vrst, ki lahko rastejo epilitično ali kriptoendolitično na skalah pri visokih ali nizkih

temperaturah (Wollenzien in sod., 1995; Selbmann in sod., 2005). Zmožni so rasti v arktičnih ledenikih (Gunde-Cimerman in sod., 2003) ter v izjemno slani solinski vodi povsod po svetu (Butinar in sod., 2005c). Dominantne halofilne vrste predstavljajo glive *Hortaea werneckii*, *Phaetotheca triangularis*, *Trimmatostroma salinum* in halotolerantna gliva *Aureobasidium pullulans* (Gunde-Cimerman in sod., 2009). Glede na sposobnosti preživetja gliv v ekstremnih okoljih, jih delimo v tri ekološke skupine. Skupina mezofilov, ki ne tolerirajo ekstremnih pogojev v okolju ampak se razmnožujejo v okoljih z zmernimi fizikalno kemijskimi parametri. Generalisti lahko tolerirajo velik nabor stresnih okolij, vendar v najbolj ekstremnih pogojih ne uspevajo. Skupina specialistov pa vključuje vrste, ki lahko uspevajo v najbolj ekstremnih okoljih, so nanje prilagojena, torej ekstremo tolerantne vrste in ekstremofilne vrste. Primer specialistov je *Hortaea werneckii*, ki lahko raste pri najvišjih koncentracijah soli v okolju kot tudi v okolju brez soli, torej je adaptiven ekstremofil, medtem ko je *Wallemia ichthyophaga* obligaten ekstremofil, saj v okolju brez soli sploh ne raste (Gostinčar in sod., 2009).

Detekcija celokupnega števila gliv ter črnih kvasovk vrste *H. werneckii* iz slanice Sečoveljskih solin s klasičnimi ter molekularnimi pristopi

Dinamiko pojavljanja črne kvasovke v vodah Sečoveljskih solin smo opisali v poglavju 2.3.3.1. V vzorcih solinske vode smo skušali tekom sezone pridobivanja soli z molekularnimi metodami na osnovi izolacije celokupne DNK detektirali vrste rodu *Hortaea*. Vse pridobljene vzorce vode smo obdelali tudi s klasičnimi metodami membranske filtracije ter inkubirali na mikoloških gojiščih z dodatki soli. Za detekcijo z molekularnimi metodami smo uporabili različne komercialno pripravljene komplete za izolacijo celokupne okoljske DNA iz vodnih vzorcev.

S klasičnimi metodami smo deloma potrdili že prej znano hipotezo pojavljanja črnih kvasovk v treh vrhovih tekom sezone pridelave soli (Slika 26, 27, 28). Prvo in drugo povečanje števila gliv nasploh ter črnih kvasovk je bilo na začetku same sezone oz. nekoliko kasneje, ko se je temperatura ozračja že dvignila in so postajali dnevi vse daljši. Tretje povečanje črnih kvasovk ter gliv v vodnih vzorcih smo pričakovali v glavni sezoni, vendar je do povečanja prišlo šele pri zadnjem vzorčenju, ko je bila sezona že končana. Slednje pripisujemo ugodni letini pridelave soli, saj je le-ta bila zaradi ugodnih vremenskih

razmer zelo intenzivna še v septembru in je posledično tudi glivna populacija v okolju vztrajala dalj časa. Rezultati števila kolonijskih enot (CFU) so bili signifikantno različni.

Za izolacijo celokupne okoljske DNA iz vodnih vzorcev smo uporabili komercialno pripravljene komplete. Zaradi gostote vzorcev vode smo za izolacijo DNA preizkusili več različnih komercialno pripravljenih kompletov, od katerih smo nekatere tudi modificirali in nadgradili, da smo pridobili kar optimalno količino DNA. Uporabili pa smo tudi klasičen način izolacije DNA z mehansko lizo in CTAB pufom (poglavlje 3.3.1.2). Koncentracijo DNA smo odčitali z merilnikom Nanodrop (Priloga 4). Koncentracije DNA so bile zelo nizke skozi celotno sezono, največ DNA pa smo izmerili ravno v vrhu sezone, vzorčenje v avgustu, kar se ne sklada z našimi rezulati klasične inkubacije, saj smo takrat zaznali zelo malo prisotnih gliv. Sklepamo, da bi plošče po klasičnem načinu morali inkubirati dalj časa, da bi zrasle tudi gline, ki rabijo več časa. Sklepamo tudi, da vse glivne vrste, ki smo jih zaznali z molekularnimi metodami ni mogoče gojiti. Največjo izmerjeno koncentracijo DNA smo pridobili s klasično metodo izolacije ter očiščenim peletom, ki pa vseeno na DGGE profilu (opisano kasneje v razpravi) ni pokazala več prisotnih glivnih vrst. Ugotovili smo, da veliko izmerjene DNA v vzorcu ni pomenilo več zaznavnih vrst gliv v vzorcu. Kot metodo izbora izolacije celokupne glivne DNA iz vodnih vzorcev solinskih voda bi izbrali več različnih metod izolacije (komercialno pripravljenih kompletov ter klasične metode izolacije DNA), vzorce DNA pa bi nato združevali, z namenom pridobivanja celotne glivne populacije v dotičnem vzorcu.

Prisotnost *H. werneckii* v vzorcih smo preverjali z metodo PCR in uporabo specifičnih oligonukleotidnih začetnikov Hor-F in Hor-R, ki so jih Abliz in sodelavci (2003) skonstruirali za detekcijo *H. werneckii* znotraj ITS regije. Rezultati pomnoževanja so prikazani na Sliki 29. Ker smo pomnožek ustrezone velikosti (306 bp) zaznali le pri pozitivni kontroli, sklepamo, da je v vzorcu premalo DNA *H. werneckii* in je zato nismo uspeli detektirati.

Za določanje celotne tarčne skupine (v našem primeru *H. werneckii*) znotraj večje populacije organizmov v okoljskem vzorcu, je posebej uporabna metoda kvantitativnega PCR (qPCR), s katero lahko kvantitativno določamo prisotnost specifične skupine gliv.

Merimo natančno količino pomnožkov, ki jih detektiramo v trenutnem času ter s tem merimo nizke koncentracije DNA. Metoda meri fluorescenco signalnih molekul (npr. Sybr green), medtem ko količina PCR produktov narašča med cikli pomnoževanja. Tako je mogoča primerjava vzorcev med eksponentno fazo, torej kateri vzorec ob enakem času vsebuje največ tarčne DNA (Manter in sod., 2007).

Vzorce smo nadalje analizirali z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (RT-PCR). Rezultati analize so prikazani na Sliki 30. Pomnoževali smo DNA okoljskih vzorcev iz glavne sezone pridobivanja soli (avgusta), vendar zopet nismo uspeli detektirati *H. werneckii* v vzorcih. Da je bila reakcija uspešna, nakazuje pomnožek pozitivne kontrole EXF-225 na ustreznih višini. Kvantifikacije tako nismo uspeli narediti, saj ni bilo ustreznih pomnožkov. Domnevamo tudi, da začetni oligonukleotidi niso bili ustreznih za postopke, ki smo jih izvajali, saj je bil postopek pomnoževanja standarden za RT-PCR, naši uporabljeni začetni oligonukleotidi pa so bili namenjeni klasičnemu PCR postopku. Najverjetnejše pa so bili v vzorcih okoljske DNA prisotni inhibitorji, ki so zavirali samo pomnoževanje, saj je metoda zelo občutljiva in količina DNA v vzorcih ni bila problematična. Sklepamo, da bi bilo vzorce DNA pred nadaljnjo analizo potrebno dodatno očistiti.

Strategija detekcije specifične vrste gliv iz vzorcev celokupne okoljske DNA z uporabo vgnezdenih (angl. nested) PCR metode in nadaljnjo uporabo gelske elektroforeze z denaturacijskim gradientom (DGGE) kot metodo prstnega odtisa gliv v vzorcu, se je izkazala za zelo uspešno in uporabno metodo vrstne zaznave glivne diverzitete v mešanih okoljskih vzorcih (Hou in sod., 2013). Sama uporaba kompleta začetnih oligonukleotidov ITS1F in ITS4 za pomnoževanje 18S in ITS regije gliv je uspešna, saj imata začetna oligonukleotida visoko specifičnost za zaznavo tako askomicetnih, bazidiomicetnih in zigomicetnih gliv iz mešanih vzorcev (Manter in sod., 2007).

Za detekcijo gliv oz. natančneje glive *H. werneckii* v vzorcih okoljske DNA, smo tako uporabili vgnezdeno metodo PCR z uporabo specifičnega kompleta začetnih oligonukleotidov, ki pomnožujejo celotno ITS regijo kot matrico pri prvi PCR reakciji, pomnožek pa smo nato uporabili v drugi PCR reakciji, kjer smo uporabili specifične začetne oligonukleotide Hor-F in Hor-R. Na ta način smo dobili ustrezne pomnožke (Slika 31), torej smo uspeli detektirati *H. werneckii* iz okoljskih vzorcev vode Sečoveljskih solin. Pri tem smo tudi ugotovili, da pomnožkov nismo dobili, če smo sami pripravili reakcijsko mešanico za prvi ali drugi PCR, ob uporabi komercialno pripravljenih mešanic pa smo

dobili ustrezne pomnožke. *H. werneckii* smo detektirali v vseh treh vzorčenih bazenih, prevladovala je v pilotskem bazenu 2/3 skozi celotno sezono (Slika 31, C), medtem ko se je v ostalih dveh bazenih pojavila v začetku in vrhu sezone (Slika 31, C).

S programsko opremo MEGA 5 smo na podlagi zbirke ITS nukleotidnih zaporedij *H. werneckii* preverili specifičnost in uspešnost naleganja Hor-F in Hor-R začenih oligonuklotidov, specifičnih za detekcijo *H. werneckii*. Samo naleganje začetnih oligonukleotidov je na mestu 147 znotraj nukleotidnega zaporedja regije ITS. Ugotovili smo, da ti ne nalegajo specifično, saj izmed nabora naših solinskih in kliničnih izolatov nalegajo le na polovico nukleotidnih zaporedij izbranih sevov (tisti, ki imajo na mestu 147 timin), drugo polovico pa izpustijo (tiste seve, ki imajo na mestu 147 citozin). Problematično je tudi mesto 155, saj oligonuklotidi pokrijejo mesto, če je prisoten timin, če pa je prisoten citozin, zaporedja ne prepozna več. Začetni oligonukleotidi nalegajo le na seve, osameljene iz bolnikov in specifičnih okolij (puščava Atakama, sediment v Bengalskem zalivu, ...), medtem ko večino solinskih sevov izpustijo (Slika 32). Prav tako ne nalegajo na tipski sev *H. werneckii* CBS 115.90 (EXF-157). Sklepamo torej, da komplet začetnih oligonukleotidov ni primeren za tako heterogeno vrsto kot je *H. werneckii*, saj niso dovolj specifični znotraj vrste, kar je tudi možen razlog, zakaj s tem kompletom začetnih oligonukleotidov kljub nested PCR reakciji nismo uspeli detektirati pričakovano visoko število prisotne *H. werneckii* v vzorcih okoljske DNA.

Vgnezdena metoda PCR se je izkazala za optimalno pri detekciji glivne DNA iz celokupnih vzorcev DNA (Slika 33), saj smo pri vseh vzorcih dobili ustrezne pomnožke. Te smo potem ločili na DGGE profilu, kjer je posamezna črtica na akril-amidnem gelu pomenila eno glivno vrsto v vzorcu. Če primerjamo glivno diverziteto po posameznih vzorčenjih (Priloga 5), s populacijsko dinamiko, ki smo jo pridobili s klasičnimi metodami (Slike 26, 27 in 28), vidimo, da se skladata. Veliko število lis, ki so se pojavile v okoljskih vzorcih na začetku sezone nakazuje na veliko različnih glivnih skupin, kar smo glede na samo dinamiko pojavljanja gliv tudi pričakovali. Tekom sezone se je število pojavnih lis zmanjšalo, kar smo zaznali tudi s klasičnimi metodami. Po koncu same sezone se je število lis kot tudi število gliv, ki smo jih zaznali s klasičnimi metodami, zopet povečalo. Tudi z molekularnimi tehnikami smo zaznali 3 vrhove pojavljanja glivne populacije tekom sezone, in tudi z molekularnimi tehnikami smo dobili povečanje glivne populacije pri zadnjem vzorčenju. Glivna pestrost je bila največja pri prvem in drugem vzorčenju

spomladji, pred samo sezono, medtem ko je tekom sezone populacijska pestrost znatno padla, pri zadnjem vzorčenju pa smo zopet zaznali povečanje glivne populacije. Konstantno je bila večja glivna pestrost v pilotskem bazenu 2/3, medtem ko je bila najmanjša pestrost v kristalizacijskem bazenu. Voda v pilotskem bazenu nima tako visoke koncentracije NaCl kot kristalizacijski bazen, in zato je v tem bazenu pričakovana večja glivna diverziteta.

Pozamezne profile, ki smo jih pridobili z DGGE, smo analizirali s programom BioNumerics za izris sorodstvenih povezav med vzorci. Na Sliki 34 so prikazani okoljski vzorci ter pozitivne kontrole (črne kvasovke, ki se pojavljajo v solinskih vodah). Naši rezultati se skladajo s samo dinamiko pojavljanja črnih kvasovk v Sečoveljskih solinah tekom vzorčenega leta (opisano v poglavju 2.3.3.1). V začetku sezone vzorčenja številčno prevladujejo vrste iz rodu *Cladosporium*, pojavljajo se tudi vrste iz rodu *Wallemia* (predvsem pri drugem vzorčenju), *Emericella* ter *Aureobasidium* vendar v manjšem obsegu. Vrsta *H. werneckii* se sicer pojavi že v začetku sezone, vendar v manjši meri, prevladuje v glavni sezoni pridobivanja soli. Na Sliki 35 so samo okoljski vzorci in pozitivna kontrola *H. werneckii* EXF-225. V vzorcih vode kristalizacijskih bazenov smo s sorodstvenimi povezavami uspeli dokazati prisotnost *H. werneckii* v glavni sezoni. Zopet se pojavijo dve skupine znotraj pozitivne kontrole, kar še enkrat potrjuje naše rezulata, da obstajata vsaj dva genotipa znotraj same vrste *H. werneckii*.

6 SKLEPI

Gliva *Hortaea werneckii* je polimorfna črna kvasovka. Polimorfizem (rast v obliki kvasnih celic, filamentov, dimorfizem) je opaziti tako na gojiščih brez soli, kot tudi z dodano soljo in je nenapovedljiv glede na slanost in mesto izolacije.

H. werneckii naseljuje raznolika slana okolja, kar se odraža tudi v izjemnem razponu halotolerance: večina testiranih izolatov raste od 0 do 25 % NaCl v gojiščih, 2 seva sta halofilna, saj brez soli nista uspevala, kar do sedaj še ni bilo opaženo pri tej vrsti. Optimalna koncentracija za rast *H. werneckii* je pri slanosti do 10 % NaCl, kjer je raznolikost morfoloških oblik najmanjša, saj večinoma raste v kvasno-filamentozni obliki. Z višanjem koncentracije soli v gojišču raste počasneje in je značilno bolj polimorfna. Maksimum NaCl za rast je 30 %, kjer pa raste 29 % okoljskih izolatov, medtem ko klinični sevi pri tej koncentraciji ne rastejo.

Pri koncentraciji soli nad 20 % se pojavlja pretežno ena oblika rasti – meristematski skupki, medtem ko pri nižjih slanostih prevladuje kvasno-filamentozna oblika.

Najpogosteje uporabljen DNA črtna koda za glive, ITS rDNA, je pri vrsti *H. werneckii* preveč variabilna in je posledično neprimerno zaporedje za določevanje te vrste.

Na osnovi analize združenih nukleotidnih zaporedij za translacijski elongacijski faktor 1 α , ITS in LSU smo lahko znotraj danes priznane vrste *H. werneckii* ločili več genotipov, ki najverjetneje predstavljajo posamezne vrste. Genetska raznolikost se odraža v ekologiji in izvoru sevov iz tropov, subtropov (genotip A) in v zmernem podnebnem pasu (genotip B). Genotip A se deli na dva podgenotipa: genotip A1 predstavlja klinične izolate, genotip A2 pa okoljske izolate.

Gospodinjski gen, gen za translacijski elongacijski faktor 1 α (TEF), predstavlja ustrezni lokus z zadostno genetsko podporo za ločevanje med genotipi (vrstami).

Začetni oligonuklotidi HorF in HorR, ki so jih leta 2003 objavili Abliz s sodelavci, niso dovolj specifični za detekcijo vseh genotipov znotraj vrste *H. werneckii*. Primerni so za detekcijo večine izolatov znotraj genotipa A (A1 - kliničnih izolatov in A2 - okoljskih izolatov iz tropskega in subtropskega pasu), ne nalegajo pa na genotip B (okoljski izolati zmernega klimatskega pasu).

Za določitev prisotnosti glive *H. werneckii* in drugih gliv z molekularnimi pristopi v okoljskih vzorcih iz solin je najprej potrebno pridobiti DNA iz teh vzorcev. Ugotovili smo, da z uporabo vgnezdenih reakcij PCR pridobimo dovolj produkta celokupne okoljske DNA za nadaljnje analize. Vzorce pridobljene celokupne DNA iz slanice je potrebno pred analizo RT-PCR dodatno očistiti prisotnost inhibitorjev.

Diverziteta gliv v slanici se z naraščajočo slanostjo tekom sezone pridobivanja soli zmanjšuje. Vrsto *H. werneckii* smo zasledili pri vseh vzorčenjih, največkrat smo jo zasledili v pilotskem bazenu 2/3, zasledili pa smo jo tudi v kristalizacijskem bazenu. V skladu s tem je bila prisotna najmanjša glivna diverziteta v kristalizacijskem bazenu, največja pa v pilotskem bazenu 2/3. Pojavljanje *H. werneckii* je bilo neodvisno od koncentracije soli v solinskih bazenih, saj je bila prisotna v bazenu z najvišjo kot tudi v bazenih z nižjo koncentracijo soli.

Določevanje diverzitete gliv v slanici, proučevane na osnovi pomnožkov ITS rDNA iz celokupne DNA vzorca, ločenih z DGGE analizo, je zelo odvisna od uporabljene metode za izolacijo celokupne DNA. Za slednjo je priporočljivo uporabiti več različnih metod ter nato združiti vzorce.

7 POVZETEK

Halofilna saprofitna melanizirana črna kvasovka *Hortaea werneckii* iz askomicetnega rodu *Capnodiales* je ubikvitaren ekstremofilen organizem, prisoten v naravnih ali umetnih slanih okoljih povsod po svetu. Predstavlja dominantno vrsto v izjemno slanih evaporacijskih bazenih v solinah. Njen širok razpon zmožnosti preživetja pri raztopini soli od 0 pa tja do 30 % (5,1 M) dokazuje, da gre verjetno za na slano okolje najbolj prilagojen evkariontski organizem. Vrsta predstavlja modelni organizem za proučevanje mehanizmov halotolerance pri evkariontih. *H. werneckii* je poznana tudi kot povzročiteljica površinske mikoze imenovane *tinea nigra*, ki spada med glivne okužbe kože s prevalenco v vlažnih tropskih in subtropskih predelih sveta. Površinske lezije se pogosteje pojavijo na dlaneh, redkeje na stopalih ter drugod po telesu.

V okviru te naloge smo primerjali izbrane izolate vrste *H. werneckii* iz zbirke ekstremofilnih mikroorganizmov EX na nivoju ITS rDNK z zaporedji v svetovnih bazah, določili smo nukleotidna zaporedja gospodinjskih genov na izboru sevov iz različnih okolij ter na osnovi teh rezultatov izbrali lokus translacijski elongacijski faktor 1 α kot dovolj ohranjen in hkrati dovolj variabilen za izvedbo filogenetske analize le-teh. S filogenetsko analizo nam je uspelo dokazati obstoj dveh genotipov znotraj vrste *H. werneckii*. V okviru naloge smo skušali razviti metodo molekularne detekcije za vrsto *H. werneckii* iz okoljskih vodnih vzorcev Sečoveljskih solin.

8 VIRI

- Abliz P., Fukushima K., Takizawa K., Miyaji M., Nishimura K. 2003. Specific oligonucleotide primers for identification of *Hortaea werneckii*, a causative agent of *tinea nigra*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 46: 89-93
- Abliz P., Fukushima K., Takizawa K., Miyaji M., Nishimura K. 2004. Identification of pathogenic dematiaceous fungi and related taxa based on large subunit ribosomal DNA D1 / D2 domain sequence analysis. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 40: 41-49
- Andrighetto C., Psomas E., Tzanetakis N., Suzzi G., Lombardi A. 2000. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. Letters in Applied Microbiology, 30: 5-9
- Bauchot, M. L., Hureau J. C. 1990. Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA). Fish Biology and Fisheries, 2, 2: 182-184
- Bonifaz A., Badali H., de Hoog G. S., Cruz M., Araiza J., Cruz M. A., Fierro L., Ponce R.M. 2008. *Tinea nigra* by *Hortaea werneckii*, a report of 22 cases from Mexico. Studies in Mycology, 61: 77-82
- Boekhout T., Renting M., Scheffers W. A., Bosboom R. 1993. The use of karyotyping in the systematics of yeasts. Antonie van Leeuwenhoek, 63: 157-163
- Boekhout T., Kurtzman C. P. 1996. Principles and methods used in yeast classification and an overview of currently accepted yeast genera. V: Nonconventional yeasts in biotechnology. Wolf K. (ed.). Berlin, Heidelberg, Springer: 1-81
- Butinar L., Zalar P., Frisvald J. C., Gunde-Cimerman N. 2005a. The genus *Eurotium*-members of indigenous fungal community in hypersaline waters of salterns. FEMS Microbiology and Ecology, 51: 155-166
- Butinar L., Santos S., Spencer-Martins I., Oren A., Gunde-Cimerman N. 2005b. Yeast diversity in hypersaline habitats. FEMS Microbiology Letters, 244: 229-234
- Butinar L., Sonjak S., Zalar P., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2005c. Melanized halophilic fungi are eukaryotic members of microbial communities in hypersaline waters of solar salterns. Botanica Marina, 48: 73-79
- Cabanes J. F., Bragulat R. M., Castella G. 2012. *Hortaea werneckii* isolated from silicone scuba diving equipment in Spain. Medical Mycology, 50, 8: 852-857

- 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
- Carbone I., Kohn L. M. 1999. A methode for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91, 3: 553-556
- Chen J., Xing X. K., Zhang L. C., Xing Y. M., Guo S. X. 2012. Identification of *Hortaea werneckii* isolated from Mangrove plant *Aegiceras corniculatum* based on morphology and rDNA sequences. *Mycopathologia*, 174, 5-6: 457-466
- Crous P. W., Schoch C. L., Hyde K. D., Wood A. R., Gueidan C., de Hoog G. S., Groenewald J. Z. 2009. Phylogenetic lineages in the Capnodiales. *Studies in Mycology*, 64: 17–47
- de Carvalho M. J., Amorim Jesuino R. S., Daher B. S., Silva-Pereira I., de Freitas S. M., Soares C. M. A., Sueli M., Felipe S. 2003. Functional and genetic characterization of calmodulin from the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genetics and Biology*, 39, 3: 204-210
- de Cock A. W. A. M. 1994. Population biology of *Hortaea werneckii* based on restriction patterns of mitochondrial DNA. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 65: 21-28
- de Hoog G. S., Gerrits van den Ende A. H. 1992. Nutritional pattern and eco-physiology of *Hortaea werneckii*, agent of human *tinea nigra*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 62, 4: 321-329
- de Hoog G. S. 1993. Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. *Antonie van Leeuwenhoek*, 63: 105-109
- de Hoog G. S., Zalar P., Urzi C., de Leo F., Yurlova N. A., Sterflinger K. 1999. Relationships of Dothideaceous black yeasts and meristematic fungi based on 5.8S and ITS2 rDNA sequence comparison. *Studies in Mycology*, 43: 31-37
- de Hoog G. S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J. 2001. *Atlas of clinical fungi*. 2nd ed. Washington, ASM Press: 1160 str.
- Diaz Munos G., Montalvo Rodriguez R. 2005. Halophilic black yeast *Hortaea werneckii* in the Cabo Rojo solar salterns: its first record for this extreme environment in Puerto Rico. *Caribbean Journal of Science*, 41, 2: 360-365
- Einax E., Voig K. 2003. Oligonucleotide primers for the universal amplification of

- β-tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. *Organisms, Diversity and Evolution*, 3: 185-194
- Ferraris C. J. Jr. 2003. Osteoglossidae (Arowanas). V: Checklist of the freshwater fishes of South and Central America. Reis R. E., Kullander S. O., Ferraris C. J. Jr. (eds.) Porto Alegre, Edipucrs: 30
- Gardes M., Bruns T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes: application to identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2: 113-118
- 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
- Google Maps 2013. Mountain View, Google inc: 1 str.
<https://maps.google.si/maps?ct=reset&tab=ll> (maj, 2013)
- Gorjan A., Plemenitaš A. 2006. Identification and characterization of ENA ATPases HwENA1 and HwENa2 from halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *FEMS Microbiology Letters*, 265: 41-50
- Gostinčar C., Grube M., de Hoog G. S., Zalar P., Gunde-Cimerman N. 2010. Extremotolerance in fungi: evolution on the edge. *FEMS Microbiology Ecology*, 71: 2-11
- Gunde-Cimerman N., Zalar P., de Hoog G. S., Plemenitaš A. 2000. Hypersaline waters in salterns: natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology*, 32: 235-240
- Gunde-Cimerman N., Sonjak S., Zalar P., Frisvald J. C., Diderichsen B., Plemenitaš A. 2003. Extremophilic fungi in arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity. *Physics and Chemistry of the Earth*, 28: 1273-1278
- Gunde-Cimerman N., Frisvad J.C., Zalar P., Plemenitaš A. 2005. Halotolerant and halophilic fungi. V: *Biodiversity of fungi-Their role in human life*. Deshmukh S.K., Rai M.K. (eds.). New Delhi, Oxford & IBH Publishing Co: 69-128.
- Gunde-Cimerman N., Ramos J., Plemenitaš A. 2009. Halotolerant and halophilic fungi. *Mycology Research*, 113: 1231-1241
- Helgason T., Watson I. J., Peter J., Young W. 2003. Phylogeny of the Glomerales and

- Diversisporales (Fungi: Glomeromycota) from actin and elongation factor 1-alpha sequences. FEMS Microbiology Letters, 229: 127-132
- Hölker U., Bend J., Pracht R., Tetsch L., Müller T., Höfer M., de Hoog G.S. 2004. *Hortaea acidophila*, a new acid-tolerant black yeast from lignite. Antonie van Leeuwenhoek, 86: 287-294
- Hou Y., Ma Z., Dong S., Chen Y. H., Yu X. 2013. Analysis of yeast-like symbiont diversity in the Brown Planthopper (BPH), Nilaparvata lugens Stål, using a novel nested PCR-DGGE protocol. Current Microbiology, 67, 3: 263-270
- Kejžar A., Gobec S., Plemenitaš A., Lenassi M. 2013. Melanin is crucial for growth of black yeast *Hortaea werneckii* in its natural hypersaline environment. Fungal Biology, 117, 5: 368-379
- Kogej T., Ramos J., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2005. The halophilic fungus *Hortaea werneckii* and the halotolerant fungus *Aureobasidium pullulans* maintain low intracellular cation concentration in hypersaline environments. Applied and Environmental Microbiology, 71, 11: 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
- Krausa P. R., Heitman J. 2003. Coping with stress: calmodulin and calcineurin in model and pathogenic fungi. Biochemical and Biophysical Research Communications, 311, 4: 1151–1157
- Iwatsu T., Udagawa S. 1988. *Hortaea werneckii* isolated from sea-water. Japanese Journal of Medical Mycology, 29, 2: 142-145
- Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGgettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 23, 21: 2947-2948
- Lenassi M., Plemenitaš A. 2007. Novel group VII histidine kinase HwHhk7B from the halophilic fungi *Hortaea werneckii* has a putative role in osmosensing. Current Genetics, 51: 393-405
- Lenassi M., Gostinčar C., Jackman S., Turk M., Sadowski I., Nislow C., Jones S., Birol I.,

- Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A. 2013. Whole genome duplication and enrichment of metal cation transporters revealed by *de novo* genome sequencing of extremly halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. PLoS ONE, 8, 8: e71328, doi:10.1371/journal.pone.0071328: 18 str.
- Liu Y.L., Whelen S., Hall B.D. 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. Molecular Biology and Evolution, 16: 1799-1808
- Liu K. L., Porras-Alfaro A., Kuske C. R., Eichorst S. A., Xie G. 2012. Accurate, rapid taxonomic classification of fungal large-subunit rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology, 78, 5:1523-1533
- Lutzoni F. 2012. Primers. New York, Duke University: 1 str.
<http://www.lutzonilab.net/primers/page246.shtml> (maj 2012)
- Markuš T. 2011. Izolacija in identifikacija gliv. Individualni raziskovalni projekt. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Katedra za biologijo mikroorganizmov: 40 str.
- Manter D. K., Vivanco J. M. 2007. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. Journal of Microbiological Methods, 71: 7-14
- Mycology Adelaide. 2013. *Tinea nigra*. Adelaide, The University of Adelaide: 1 str.
http://www.mycology.adelaide.edu.au/Mycoses/Superficial/Tinea_nigra (oktober, 2012)
- NCBI. 2013a. GenBank. Bethesda, NCBI – National Center for Biotechnology Information: baza podatkov
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> (junij 2013)
- NCBI 2013b. Basic Local Alignment Searchtool (BLAST). Bethesda, NCBI – National Center for Biotechnology Information: software
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (junij 2013)
- Nishimura, K. 1994. Dematiaceous fungi: *Fonsecaea*, *Exophiala*, *Phialophora*, *Cladosporium*, *Alternaria* and *Hortaea*. Rinsho to Biseibutsu, 21: 538-544
- Ng K. P., Soo – Hoo T. S., Na S. L., Tay S. T., Hamimah H., Lim P. C., Chong P. P., Seow

- H. F., Chavez A. J., Messer S. A. 2005. The mycological and molecular study of *Hortaea werneckii* isolated from blood and splenic abscess. *Mycopathologia*, 159: 495-500
- O'Donnell K., Cigelnik E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus Fusarium are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7, 1: 103-116
- Onofri S., Zucconi L., Selbmann L., de Hoog G.S., de Los Rios A., Ruisi S., Grube M. 2007. Fungal associations at the cold edge of life. V: Algae and Cyanobacteria in extreme environments. Seckbach J. (ed.). Berlin, Springer: 735-757
- Petrovič U., Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A. 2002. Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Molecular Microbiology*, 45: 665-672
- Plemenitaš A., Vaupotič T., Lenassi M., Kogej T., Gunde-Cimerman N. 2008. Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity: a molecular perspective at a glance. *Studies in Mycology*, 61: 67-75
- Reeb V., Lutzoni F., Roux C. 2004. Contribution of RPB2 to multilocus phylogenetic studies of the euascomycetes (Pezizomycotina, Fungi) with special emphasis on the lichen-forming Acarosporaceae and evolution of polyspority. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32: 1036-1060
- Rehner S. 2001. EF1 – alpha primers. Betsville, USDA, Insect Biocontrol Laboratory: 4 str.
<http://www.aftol.org/pdfs/EF1primer.pdf> (junij 2013)
- Roger A. J., Sandblom O., Doolittle W. F., Philippe H. 1999. An evaluation of elongation factor 1a as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 2: 218-233
- Ryskov A. P., Jincharadze A. G., Prosnjak M. I., Ivanov P. L., Limborska S. A. 1988. M13 phage DNA as a universal marker for DNA fingerprinting of animals, plants and microorganisms. *FEBS Letters*, 233, 2: 388-392
- Samson R. A., Hoekstra E. S., Frisvad J. C., Filtenborg O. 2004. Introduction to food and airborn fungi. 7th ed. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures, ASM Press: 389 str.
- Schoch C. L., Crous P. W., Groenewald J. Z., Boehm E. W., Burgess T. I., de Gruyter J.,

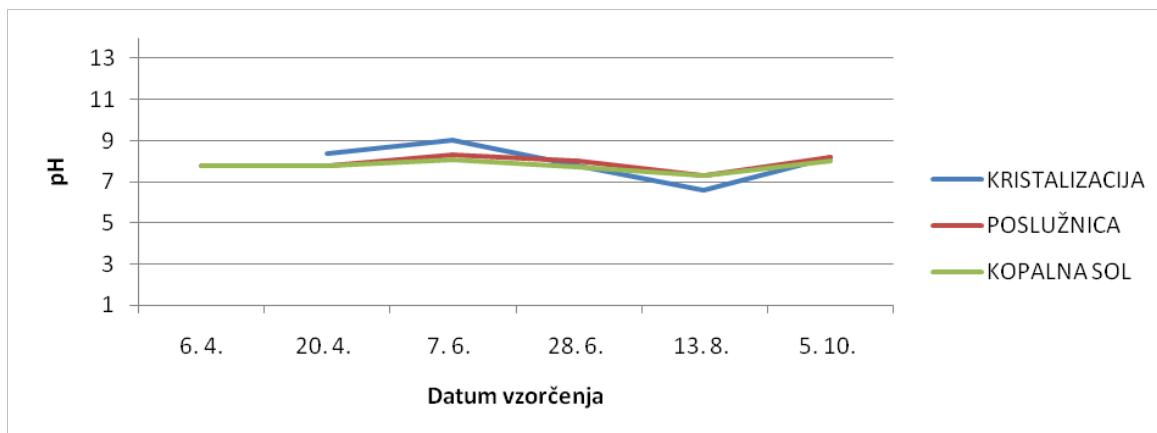
- de Hoog G. S., Dixon L. J., Grube M., Gueidan C., Harada Y., Hatakeyama S., Hirayama K., Hosoya T., Huhndorf S.M., Hyde K. D., Jones E. B., Kohlmeyer J., Kruys A., Li Y. M., Lücking R., Lumbsch H. T., Marvanová L., Mbatchou J. S., McVay A. H., Miller A. N., Mugambi G. K., Muggia L., Nelsen M. P., Nelson P., Owensby C. A., Phillips A. J., Phongpaichit S., Pointing S. B., Pujade-Renaud V., Raja H. A., Plata E. R., Robbertse B., Ruibal C., Sakayaroj J., Sano T., Selbmann L., Shearer C. A., Shirouzu T., Slippers B., Suetrong S., Tanaka K., Volkmann-Kohlmeyer B., Wingfield M. J., Wood A. R., Woudenberg J. H., Yonezawa H., Zhang Y., Spatafora J.W. 2009. A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. *Studies in Mycology*, 64: 1-15
- Schroers H. J., O'Donnell K., Lamprecht S. C., Kammeyer P. L., Johnson S., Sutton D. A., Rinaldi M. G., Geiser D. M., Summerbell R. C. 2009. Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. *Mycologia*, 101, 1: 44-70
- Selbmann L., de Hoog G. S., Mazzaglia A., Friedmann E. I., Onofri S. 2005. Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from Antarctic desert. *Studies in Mycology*, 51: 1-32
- Sharmin S., Haritani K., Tanaka R., Abliz P., Takizawa K., Sano A., Fukushima K., Nishimura K., Miyagi M. 2002. The first isolation of *Hortaea werneckii* from a household guinea pig. *Nippon Ishinkin Gakki Zasshi*, 43, 3: 175-180
- Stamatakis A., Hoover P., Rougemont J. 2008. A fast bootstrapping algorithm for the RAxML web-servers. *Systematic Biology*, 57: 758-771
- Sterflinger K. 1998. Temperature and NaCl- tolerance of rock-inhabiting meristematic fungi. *Antonie van Leeuwenhoek*, 74: 271-281
- Sterflinger K., de Hoog G. S., Haase G. 1999. Phylogeny and ecology of meristematic ascomycetes. *Studies in Mycology*, 43: 5-22
- Sterflinger K. 2006. Black yeasts and meristematic fungi: ecology, diversity and identification. V: *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Berlin, Springer: 501-514
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739

- Tkavc R. 2012. Mikrobne združbe solinskega raka *Artemia* sp. in izbranih solinskih mikrobnih preprog. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje biotehnologije: 152 str.
- Turk M., Plemenitaš A. 2002. The HOG pathway in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*: isolation of the *HOG1* homolog gene and activation of HwHog1p. FEMS Microbiology Letters, 216: 193-199
- Uijthof J. M. J., Cock A. W. A. M., de Hoog G. S., Quint W. G. V., van Belkum A. 1994. Polymerase chain reaction-mediated genotyping of *Hortaea werneckii*, causative agent of tinea nigra. Mycoses, 37: 307-312
- Wollenzien U., de Hoog G.S., Krumbein W.E., Urzi C. 1995. On the isolation of microcolonial fungi occurring on and in marble and other calcareous rocks. Science of the Total Environment, 167: 287-294
- Zalar P., de Hoog G. S., Gunde-Cimerman N. 1999. Ecology of halotolerant dothideaceous black yeasts. Studies in Mycology, 43: 38-48
- Zalar P., de Hoog G. S., Schoers H. J., Frank M. J., Gunde-Cimerman N. 2005. Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (Wallemiomycetes and Wallemiales, cl. et ord. nov.). Antonie van Leeuwenhoek, 87: 311-328
- Zalar P., de Hoog G. S., Schoers H. J., Crous J., Groenewald J. Z., Gunde-Cimerman N. 2007. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium shpaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. Studies in Mycology, 58: 157-183

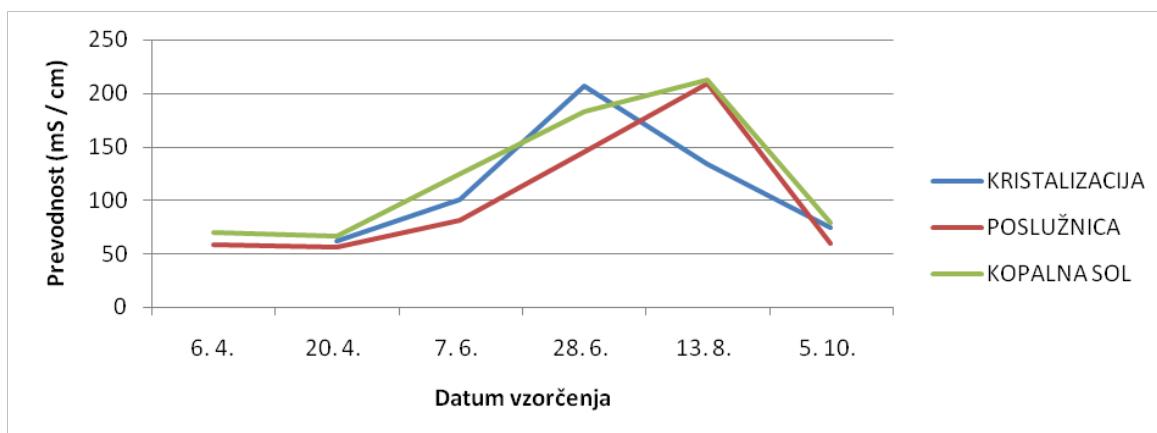
ZAHVALA

PRILOGE

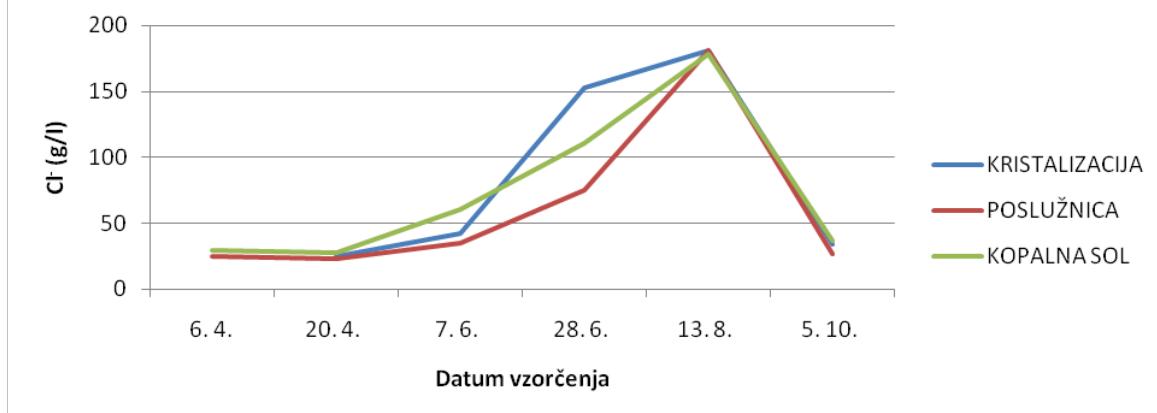
Priloga A: Kemijska analiza vzorčene vode iz Sečoveljskih



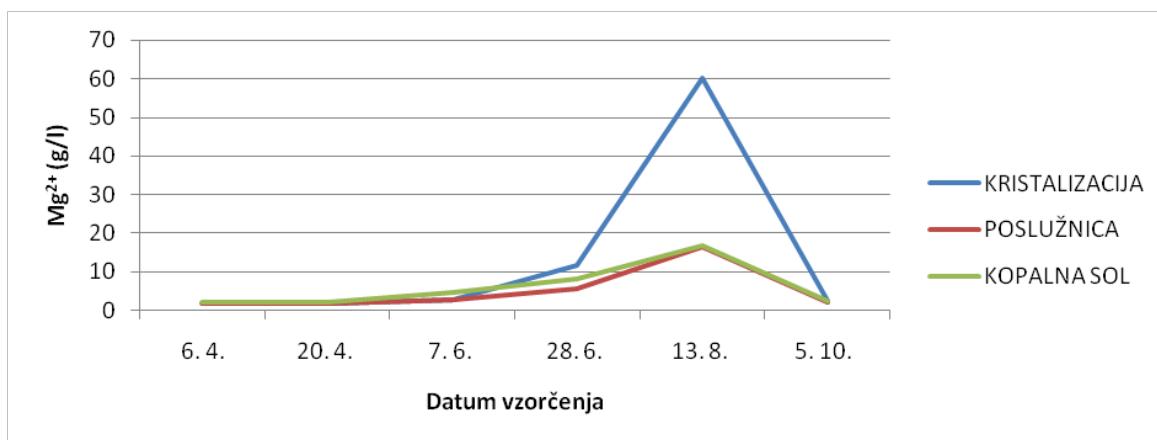
Priloga A1: pH vrednosti slanic iz 3 različnih bazenov.



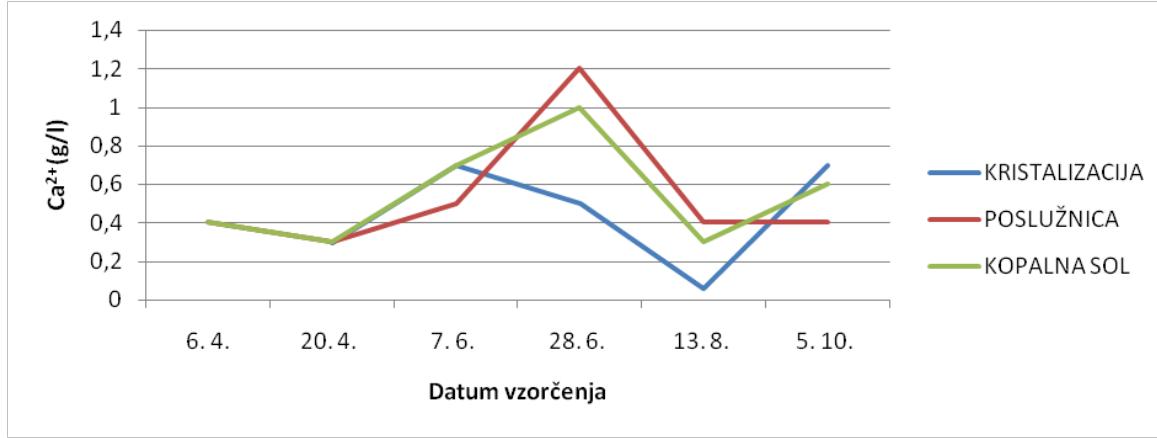
Priloga A2: Izmerjena prevodnost slanic iz 3 različnih bazenov.



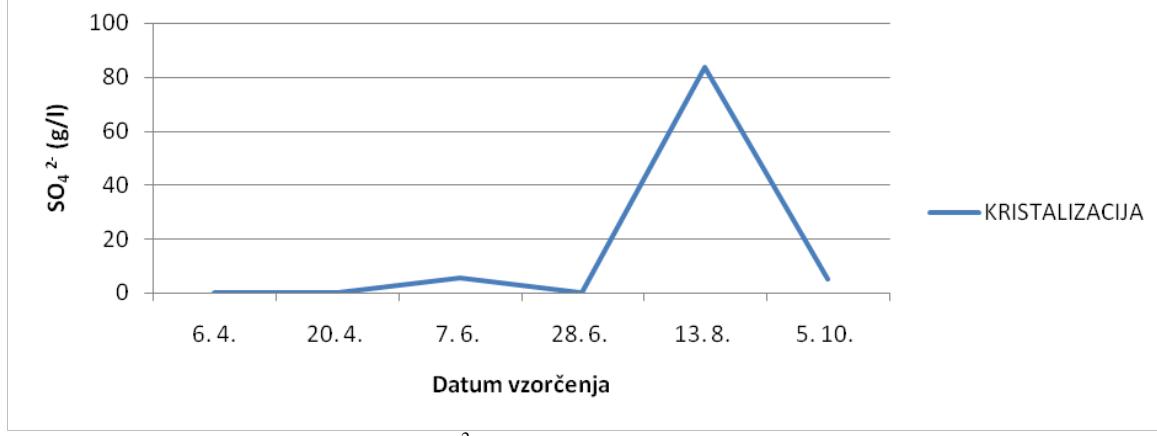
Priloga A3: Vsebnost kloridnega iona (Cl⁻) v 3 slanicah.



Priloga A4: Vsebnost magnezijevega iona (Mg²⁺) v slanicah bazenov.



Priloga A5: Vsebnost kalcijevega iona (Ca²⁺) v slanicah vzorčenih bazenov.



Priloga A6: Vsebnost sulfatnega iona (SO₄²⁻) v kristalizacijskem bazenu.

Priloga B: Poročilo o kemijski analizi morske vode, ki vstopa v soline.



Obr.90.17

št. 160

POROČILO O PRESKUSU

Šifra surovine: 1102
 Naziv surovine: Morska voda
 Kontrolna št. surovine: 110200003052011
 Lokacija vzorčevanja: 10000015

Datum in čas vzorčevanja: 20.05.2013; 7:00-8:00
 Datum izvida: 20.6.2013
 Datum začetka analize: 20.05.2013
 Datum zaključka analize: 21.02.2013

Parameter	Metoda	Rezultat	Enota
pH _{21,8°C}	AM 52.13	8	
Prevodnost _{22°C}	AM 52.12	51,1	µS/cm
Slanost	AM 52.02	35,9	psu
Gostota _{20°C}	AM 52.17	1,0256	g/ml
Cl ⁻	AM 52.01	20,2	g/l
Ca ²⁺	AM 52.03	0,4	g/l
Mg ²⁺	AM 52.04	1,4	g/l
SO ₄ ²⁻	AM 52.05	2,8	g/l
NO ₃ ⁻	AM 52.11	<1	mg/l
NO ₂ ⁻	AM 52.10	<0,02	mg/l
NH ₄ ⁺	AM 52.09	0,8	mg/l

AM – interna metoda

Pripravil:

 Damir Čendak,
 Tehnolog programa in kakovosti

Priloga C: Poročilo o kemijski analizi slanice – matične vode.



Obr.90.17

št. 11568

POROČILO O PRESKUSU

Šifra polizdelka: 1100
Naziv polizdelka: Slanica – matična voda
Kontrolna št. surovine: 110000001111811
Lokacija vzorčevanja: 300

Datum in čas vzorčevanja: 20.11.2011; 7:00-8:00
Datum prepisa izvida: 20.6.2013
Datum začetka analize: 20.11.2011
Datum zaključka analize: 21.11.2011

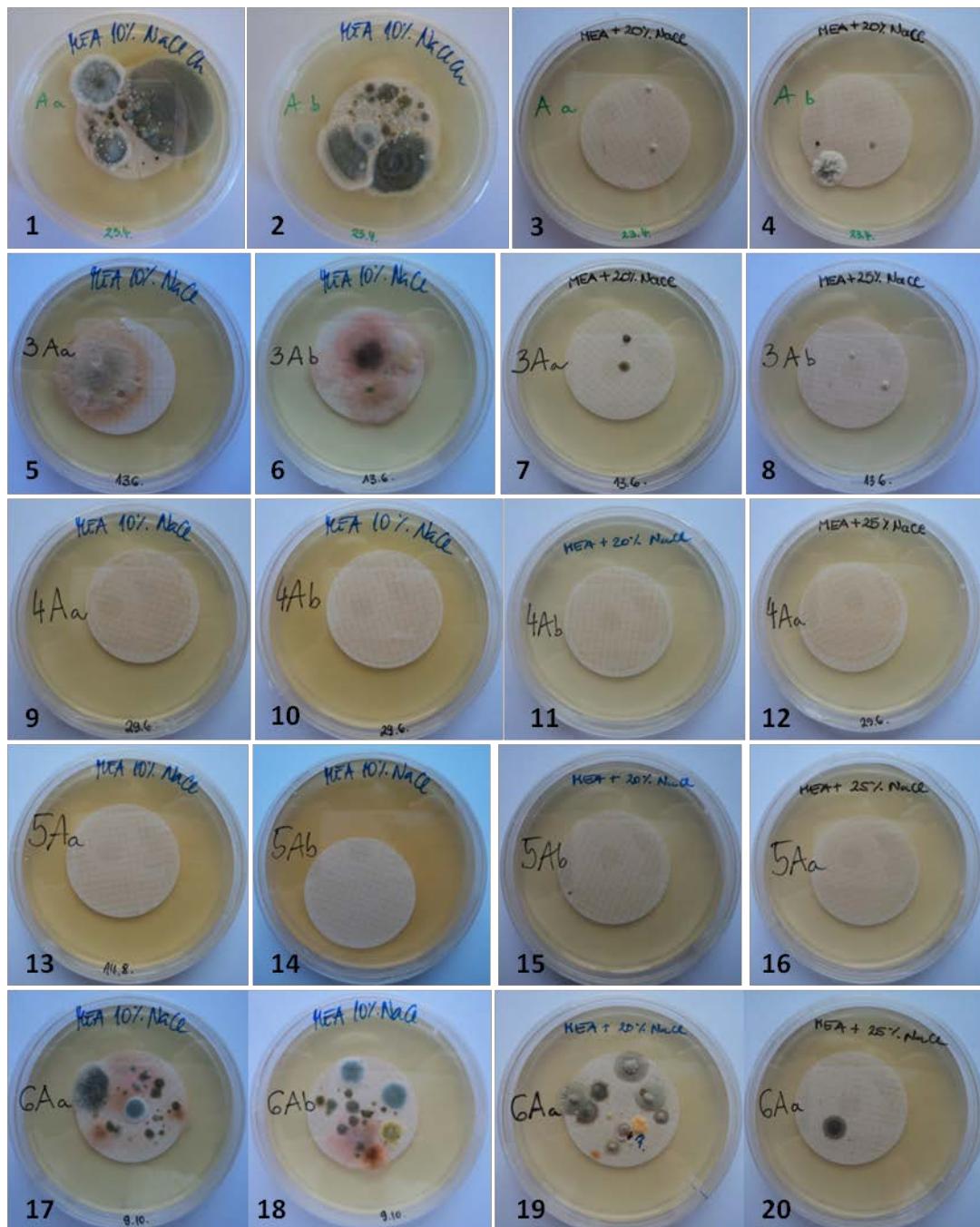
Parameter	Metoda	Rezultat	Enota
pH	AM 52.13	6,5	
Prevodnost _{22,2°C}	AM 52.12	172	µS/cm
Slanost	AM 52.02	/	psu
Gostota _{20°C}	AM 52.17	1,2426	g/ml
Cl ⁻	AM 52.01	180,8	g/l
Ca ²⁺	AM 52.03	<0,2	g/l
Mg ²⁺	AM 52.04	32,5	g/l
SO ₄ ²⁻	AM 52.05	46,7	g/l
NO ₃ ⁻	AM 52.11	< 1	mg/l
NO ₂ ⁻	AM 52.10	0,14	mg/l
NH ₄ ⁺	AM 52.09	6,2	mg/l

AM – interna metoda

Pripravil:


Damir Čendak,
Tehnolog programa in kakovosti

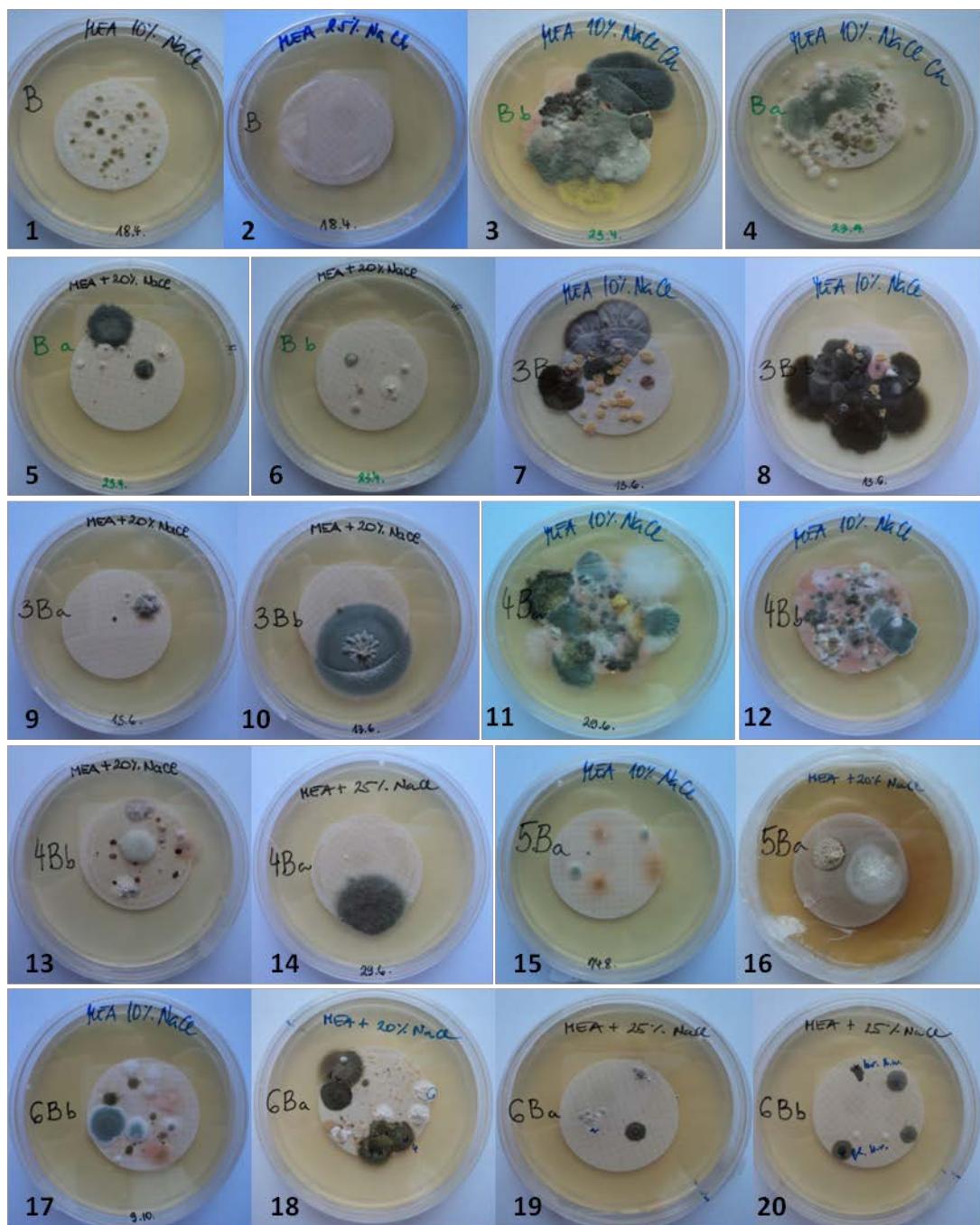
Priloga D: Detekcija celokupnega števila gliv ter črnih kvasovk vrste *H. werneckii* iz slanice Sečoveljskih solin z metodo membranske filtracije



Priloga D1: Plošče membranske filtracije vode iz Kristalizacijskega bazena Sever 10.

Legenda: **Slika 1-4:** solinska voda 2. Vzorčenje; **Slika 5-8:** solinska voda 3. Vzorčenje; **Slika 9-12:** solinska voda 4. Vzorčenje; **Slika 13-16:** solinska voda 5. Vzorčenje; **Slika 17-20:** solinska voda 6. Vzorčenje; **1, 2:** MEA + 10 % NaCl po prvem tednu inkubacije; **3, 4:** MEA + 20 % NaCl po 3 tednih inkubacije. **5, 6:** MEA + 10 % NaCl po prvem tednu inkubacije; **7:** MEA + 20 % NaCl po 3 tednih inkubacije; **8:** MEA + 25 % NaCl po 3 tednih inkubacije. **9, 10:** MEA + 10 % NaCl po prvem tednu inkubacije; **11:** MEA + 20 % NaCl po 3 tednih inkubacije; **12:** MEA + 25 % NaCl po 3 tednih inkubacije. **13, 14:** MEA + 10 % NaCl po prvem

tednu inkubacije; **15:** MEA + 20 % NaCl po 3 tednih inkubacije; **16:** MEA + 25 % NaCl po 3 tednih inkubacije. **17, 18:** MEA + 10 % NaCl po prvem tednu inkubacije; **19:** MEA + 20 % NaCl po 3 tednih inkubacije; **20:** MEA + 25 % NaCl po 3 tednih inkubacije.



Priloga E: Koncentracija celokupne DNA v okoljskih vzorcih**Priloga E1: Koncentracija celokupne izolirane DNA iz okoljskih vzorcev.****1. vzorčenje (izolacija 1)**

Vzorec	Volumen vode (ml)	Konc. DNA (ng / µl)	260 / 280	260 / 230
B1_1		3,62	3,24	0,08
B1_2	1000	5,32	3,83	0,12
B1_3		6,54	3,03	0,08
C1_1		6,19	2,49	0,1
C1_2	500	4,59	2,78	0,11
C1_3		4,32	3,87	0,09

2. vzorčenje (izolacija 1)

Vzorec	Volumen vode (ml)	Konc. DNA (ng / µl)	260 / 280	260 / 230
A2_1		4,32	5,77	0,07
A2_2	200	3,94	12,25	0,06
A2_3		2,13	2,98	0,08
B2_1		4,73	3,61	0,07
B2_2	500	5,51	1,69	0,07
B2_3		3,72	3,21	0,09
C2_1		4,05	3,31	0,07
C2_2	250	5,03	2,29	0,07
C2_3		4,19	3,1	0,07

3. vzorčenje (izolacija 2)

Vzorec	Volumen vode (ml)	Konc. DNA (ng / µl)	260 / 280	260 / 230
A3_1		0,37	0,64	0,07
A3_2	250	0,06	0,07	0,02
A3_3		0,82	0,4	0,21
B3_1		0,35	0,36	0,1
B3_2	500	1,12	0,63	0,29
B3_3		0,16	- 1,59	0,05
C3_1		0,67	1,48	0,02
C3_2	300	0,82	0,31	0,19
C3_3		0,17	0,57	0,03
A3	250	2,7	3,82	0,64
B3	500	9,11	3,24	0,11
C3	300	4,65	2,73	0,21

4. vzorčenje (izolacija 3)

Vzorec	Volumen vode (ml)	Konc. DNA (ng / µl)	260 / 280	260 / 230
A4_1	60	0,5	14,08	0,04
A4_2	50	5,55	1,72	0,23
A4_3	50	2,27	1,98	0,04
B4_1	150	1,81	5,28	0,28
B4_2	100	8,88	1,99	0,42
B4_3	100	1,74	4,35	0,04
C4_1		6,98	1,65	0,22
C4_2	150	12,54	1,53	0,19
C4_3		5,65	1,71	0,07

5. vzorčenje (izolacija 3)

Vzorec	Volumen vode (ml)	Konc. DNA (ng / µl)	260 / 280	260 / 230
A5_1	15	-0,41	0,62	-0,07
A5_2		-0,59	0,47	-0,03
B5_1	50	0,68	4,45	0,01
B5_2		0,96	2,28	0,28
C5_1	30	1,48	3,14	0,23
C5_2		0,8	-2,57	0,14

5. vzorčenje (izolacija 4)

Vzorec	Volumen vode (ml)	Konc. DNA (ng / µl)	260 / 280	260 / 230
A5_1	55	2,58	0,7	0,1
A5_2	40	2,26	1,32	0,05
A5_3	40	2,94	1,65	0,08
B5_1	120	6,1	1,69	0,11
B5_2	105	4,67	1,95	0,07
B5_3	50	3,26	1,41	0,05
C5_1	80	8,12	1,91	0,22
C5_2	70	6,57	1,87	0,23
C5_3	30	7,01	1,82	0,13

5. vzorčenje (izolacija 5)

Vzorec	Volumen vode (ml)	Konc. DNA (ng / µl)	260 / 280	260 / 230
A5_1		1,13	3,61	0,07
B5_1	270	3,35	1,69	0,07
C5_1		3,21	3,21	0,09

5. vzorčenje (izolacija 6)

Vzorec	Volumen vode (ml)	Konc. DNA (ng / µl)	260 / 280	260 / 230
C5_1	270	174,53	2,06	1,67
C5_2		153,82	2,04	1,74

5. vzorčenje (izolacija 7)

Vzorec	Volumen vode (ml)	Konc. DNA (ng / µl)	260 / 280	260 / 230
C5_1	270	-24,12	0,6	0,5
C5_2		36,06	5,5	-2,53

5. vzorčenje (izolacija 8)

Vzorec	Volumen vode (ml)	Konc. DNA (ng / µl)	260 / 280	260 / 230
C5_1	270	11,58	1,80	1,04
C5_2		13,91	1,78	0,51

5. vzorčenje (izolacija 9)

Vzorec	Volumen vode (ml)	Konc. DNA (ng / µl)	260 / 280	260 / 230
A5_1	270	55,69	1,86	0,67
A5_2		75,75	1,94	1,55
B5_1	270	26,85	1,84	0,82
B5_2		26,75	1,93	0,48
C5_1	270	17,87	1,91	1,32
C5_2		16,70	2,08	0,9

6. vzorčenje (izolacija 3)

Vzorec	Volumen vode (ml)	Konc. DNA (ng / µl)	260 / 280	260 / 230
A6_1		43,9	1,85	1,06
A6_2	500	32,68	1,92	0,78
A6_3		29,28	1,86	0,47
B6_1		27,69	1,75	0,46
B6_2	500	22,21	1,84	0,28
B6_3		20,34	1,81	0,51
C6_1		25,67	1,80	1,30
C6_2	400	30,28	1,79	1,35
C6_3		31,13	1,81	1,40

Legenda: Izolacija 1: izolacija s kompletom Ultra Clean™ Water DNA Isolation Kit; izolacija 2: izolacija s kompletom PowerWater® Sterivex™ DNA Isolation Kit; izolacija 3: izolacija s kompletom PowerWater® DNA Isolation Kit; izolacija 4: izolacija s kompletom Ultra Clean™ Water DNA Isolation Kit ter dodatnim korakom segrevanja pri 65 °C; izolacija 5: izolacija s centrifugiranjem vodnega vzorca v prvem koraku in pridobivanju peleta, nato pa tretiranje pridobljenjega peleta s kompletom Ultra Clean™ Water DNA Isolation Kit ter dodatnim korakom segrevanja pri 65 °C; izolacija 6: izolacija s centrifugiranjem vodnega vzorca v prvem koraku in pridobivanju peleta, čiščenje peleta z 0,9 % fiziološko raztopino ter nato izolacija DNA s klasično metodo mehanske lite in tretiranja s CTAB pufrom; izolacija 7: izolacija s centrifugiranjem vodnega vzorca v prvem koraku in pridobivanju peleta ter izolacija DNA s klasično metodo mehanske lite in tretiranja s CTAB pufrom; izolacija 8: izolacija DNA s kompletom Power Biofilm™ DNA Isolation Kit; izolacija 9: izolacija DNA s centrifugiranjem vodnega vzorca v prvem koraku in pridobivanju peleta, čiščenje peleta z 0,9 % fiziološko raztopino ter nato izolacija DNA s kompletom PowerWater® DNA Isolation Kit.

Priloga F: DGGE profili celokupne glivne DNA po posameznih vzorčenjih ter načinu izolacije.

1. VZORČENJE 6. 4. 2012

	Konc. DNA (ng / µl)	Št. bandov
B1 izolacija 1	5,32	15
C1 izolacija 1	6,19	16

2. VZORČENJE 20. 4. 2012

A2 izolacija 1	2,13	13
B2 izolacija 1	5,51	8
C2 izolacija 1	5,03	10

3. VZORČENJE 7. 6. 2012

A3 izolacija 2	0,82	3
B3 izolacija 2	1,12	3
C3 izolacija 2	0,17	4

4. VZORČENJE 28. 6. 2012

A4 izolacija 3	5,55	3
B4 izolacija 3	8,88	7
C4 izolacija 3	12,54	2

Se nadaljuje

5. VZORČENJE 13. 8. 2012 ; RAZLIČNI NAČINI IZOLACIJE		Konc. DNA (ng / µl)	Št. bandov
A5 izolacija 4		2,26	1
A5 izolacija 9		75,75	10
A5 izolacija 5		1,13	5
A5 izolacija 3		-0,59	6
B5 izolacija 4		6,10	3
B5 izolacija 9		26,75	10
B5 izolacija 5		3,35	6
B5 izolacija 3		0,96	0
C5 izolacija 4		6,57	7
C5 izolacija 3		17,87	0
C5 izolacija 5		3,21	5
C5 izolacija 6		174,53	6
C5 izolacija 8		11,58	5
C5 izolacija 7		-24,12	0

6. VZORČENJE 5. 10. 2012

A6 izolacija 3		43,90	8
B6 izolacija 3		27,69	6
C6 izolacija 3		30,28	5

Priloga F1: Pojavnost glivnih izolatov v vzorcih solinske vode.

Legenda: Prikazani so različni načini izolacije, koncentracije DNA v posameznih vzorcih ter število zaznanih lis na DGGE profilu. Izolacija 1: izolacija s kompletom Ultra Clean™ Water DNA Isolation Kit; izolacija 2: izolacija s kompletom PowerWater® Sterivex™ DNA Isolation Kit; izolacija 3: izolacija s kompletom PowerWater® DNA Isolation Kit; izolacija 4: izolacija s kompletom Ultra Clean™ Water DNA Isolation Kit ter dodatnim korakom segrevanja pri 65 °C; izolacija 5: izolacija s centrifugiranjem vodnega vzorca v prvem koraku in pridobivanju peleta, nato pa tretiranje pridobljenjega peleta s kompletom Ultra Clean™ Water DNA Isolation Kit ter dodatnim korakom segrevanja pri 65 °C; izolacija 6: izolacija s centrifugiranjem vodnega vzorca v prvem koraku in pridobivanju peleta, čiščenje peleta z 0,9 % fiziološko raztopino ter nato izolacija DNA s klasično metodo mehanske lite in tretiranja s CTAB pufrom; izolacija 7: izolacija s centrifugiranjem vodnega vzorca v prvem koraku in pridobivanju peleta ter izolacija DNA s klasično metodo mehanske lite in tretiranja s CTAB pufrom; izolacija 8: izolacija DNA s kompletom Power Biofilm™ DNA Isolation Kit; izolacija 9: izolacija DNA s centrifugiranjem vodnega vzorca v prvem koraku in pridobivanju peleta, čiščenje peleta z 0,9 % fiziološko raztopino ter nato izolacija DNA s kompletom PowerWater® DNA Isolation Kit.