

Environmentálne kmene mikroskopickej vláknitej huby
***Aspergillus niger* a ich fenotypová a molekulová**
charakteristika



Sanja Nosalj

Alexandra Šimonovičová

Hana Vojtková

Elena Piecková

Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava

2021

Environmentálne kmene mikroskopickej vláknitej huby *Aspergillus niger* a ich fenotypová a molekulová charakteristika

© Mgr. Sanja Nosalj, PhD.¹, prof. RNDr. Alexandra Šimonovičová, CSc.¹, doc. Mgr. Hana Vojtková, Ph.D.², doc. Ing. Elena Piecková, PhD., MPH³

¹Katedra pedológie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave

²Katedra environmentálneho inžinýrství, Hornicko-geologická fakulta, Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava

³Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave

Recenzenti:

RNDr. Alena Nováková, PhD.

RNDr. Miroslava Machariková, PhD.

doc. RNDr. Milan Seman, CSc.

Výstup grantového projektu VEGA 1/0194/21 Ekologické hodnotenie revitalizovaného acidifikovaného územia a projektů RPP2021/70 a SP2021/11 HGF VŠB – Technické univerzity v Ostravě ve spolupráci s MŠMT ČR.

Prvé vydanie

Rukopis neprešiel jazykovou úpravou.

Náklad: 200, CD-ROM

ISBN 978-80-248-4506-7

Obrázok na titulnej strane: *Aspergillus niger*, fenotypové zmeny, sklíčková kultúra, zv. 180x. A. Šimonovičová, archív.

OBSAH

1.	Úvod	1
2.	Prehľad literatúry	4
2.1	Rod <i>Aspergillus</i>	4
2.2	Výskyt druhov <i>Aspergillus niger</i> vo svete	7
2.3	Výskyt druhov <i>Aspergillus niger</i> v pôdach na Slovensku	9
3.	Metabolity mikroskopických vlákňitých húb a ich stanovenie systémom Biolog FF Microplate™	10
3.1	Pôdne enzýmy	11
3.2	Organické kyseliny mikroskopických vlákňitých húb a ich význam v pôde	12
3.3	Druh <i>Aspergillus niger</i> – producent organických kyselín	14
3.4	Druh <i>Aspergillus niger</i> – producent mykotoxínov	14
3.5	Druh <i>Aspergillus niger</i> a jeho využitie v bioremediačných procesoch	16
3.6	Pelety mikroskopických vlákňitých húb a ich využitie	17
3.7	Interakcia mikroskopických vlákňitých húb s ílovými minerálmi	17
4.	Materiál a metodika	19
4.1	Druh <i>Aspergillus niger</i> ako modelový organizmus	19
4.2	Molekulárna analýza kmeňov druhu <i>Aspergillus niger</i>	20
4.3	Stanovenie biologického profilu kmeňov druhu <i>Aspergillus niger</i> systémom Biolog FF Microplate™	21
4.4	Stanovenie lipázovej enzymatickej aktivity	21
4.5	Kultivácia kmeňov druhu <i>Aspergillus niger</i> na stanovenie mykotoxínov	22
4.6	Tenkovrstvová chromatografia (SAMSON, 1989)	22
4.7	Dôkaz ochratoxínu A	22
4.8	Dôkaz fumonizínu B1	23
4.9	Retenčný factor RF (FILTENBORG et al., 1989)	23
4.10	Stanovenie organických kyselín u vybraných kmeňov druhu <i>Aspergillus niger</i>	24
4.11	Práškové formy a ich vplyv na tvorbu peliet	24
4.12	Príprava peliet kmeňov druhu <i>Aspergillus niger</i> a stanovenie ich veľkosti v prostredí s ílovými minerálmi	26
5.	Výsledky a diskusia	28
5.1	Pôdy a substráty – zdroj kmeňov druhu <i>Aspergillus niger</i>	28
5.2	Molekulárna analýza kmeňov druhu <i>Aspergillus niger</i>	38
5.3	PCR – RAMP analýza kmeňov druhu <i>Aspergillus niger</i>	39
5.4	Makromorfologické a mikromorfologické znaky kmeňov druhu <i>Aspergillus niger</i>	40
5.5	Stanovenie biologického profilu kmeňov druhu <i>Aspergillus niger</i> systémom Biolog FF Microplate™	43
5.6	Produkcia enzýmu lipáza kmeňov druhu <i>Aspergillus niger</i>	49
5.7	Produkcia mykotoxínov kmeňmi druhu <i>Aspergillus niger</i>	53

5.8	Produkcia organických kyselín vybranými kmeňmi druhu <i>Aspergillus niger</i>	57
5.9	Vplyvy anorganických práškových látok na veľkosť a morfológiu peliet kmeňov druhu <i>Aspergillus niger</i>	61
5.10	Kmen An – L18 a jeho pôvod	68
5.11	Aktivita kmene An – L18 v biodegradaci PSHs	74
5.12	Aktivita kmene An – L18 v biodegradaci textilných azobarviv	78
6.	Záver	84
7.	Literatúra	86

Zoznam skratiek

PCR	polymerázová reťazová reakcia
RAMP	náhodne amplifikovaný polymorfizmus
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SDB	Sabouraud Dextrose Broth Liquid
MEA	Malt Extract Agar
SBA	Spirit Blue Agar
CDA	Czapek Dox Agar
YES	Yeast Extract Sucrose
CYA	Czapek Yeast Agar
RCM	Reinforced Clostridial Agar
OMA	Oat Meal Agar
PDA	Potato Dextrose Agar
OMA	Oat Meal Agar
DNA	deoxyribonukleová kyselina
AMD	kyslá banská voda
An	<i>Aspergillus niger</i>
An – Š	kmeň <i>Aspergillus niger</i> izolovaný z lokality Šobov
An – N	kmeň <i>Aspergillus niger</i> izolovaný z lokality Nováky
An - POP 4	kmeň <i>Aspergillus niger</i> izolovaný z lokality Poproč
An - POP 1	kmeň <i>Aspergillus niger</i> izolovaný z lokality Poproč
An – P	kmeň <i>Aspergillus niger</i> izolovaný z lokality Pezinok
An – Sm	kmeň <i>Aspergillus niger</i> izolovaný z lokality Smolník
An – Kmi	kmeň <i>Aspergillus niger</i> izolovaný z lokality Belianske Tatry
An – POP 5	kmeň <i>Aspergillus niger</i> izolovaný z lokality Poproč
An – L 18	kmeň <i>Aspergillus niger</i> izolovaný z lagúny Ostrava
An – POP 3	kmeň <i>Aspergillus niger</i> izolovaný z lokality Poproč
An – ZK	kmeň <i>Aspergillus niger</i> izolovaný z lokality Zemianske Kostol'any
An – G	kmeň <i>Aspergillus niger</i> izolovaný z lokality Gabčíkovo
An – KD	kmeň <i>Aspergillus niger</i> izolovaný z púšte (D ako „desert“) v štáte Kuvajt
An – KF	kmeň <i>Aspergillus niger</i> izolovaný z farmy (F ako „farm“) v štáte Kuvajt
An – Sl	kmeň <i>Aspergillus niger</i> izolovaný z lokality Slovinky
An – A	kmeň <i>Aspergillus niger</i> izolovaný z povrchu adamitu (A)
SEM	skenovací elektrónový mikroskop
KTJ	kolónie tvoriaca jednotka
TLC	tenkovrstvová chromatografia
OTA	Ochratoxin
FB1	fumonizín B1
R_F	retenčný faktor
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
(PAHs)	polycyklické aromatické uhľovodíky
S_{BET}	špecifický povrch
V_{micro}	špecifický objem mikropórov
S_t	veľkosť externého povrchu
V_{a-m}	celkový objem pórov
D_p	veľkosť mezopórov

Vysvetlivky: podrobná charakteristika lokalít, z ktorých sme izolovali kmene druhu *Aspergillus niger* je uvedená v texte; skratku An – používame v tabuľkách a obrázkoch

1. Úvod

Mikroskopické vlákňité huby sú heterotrofné eukaryotické mikroorganizmy, ktoré predstavujú viac ako 100 000 doteraz známych druhov. Po hmyze je to druhá najrozšírenejšia skupina organizmov na Zemi. Sú nielen významnou zložkou životného prostredia, ale majú tiež medicínsky význam. V prírode sa nachádzajú takmer všade: predovšetkým v pôde, ale aj vo vode, vzduchu, na potravinách, rastlinách, živočíchoch, nevhodne uskladnenom archivovanom materiáli a pod.

Najväčším zdrojom výskytu mikroskopických vlákňitých húb je vo všeobecnosti pôda, ktorá týmto mikroorganizmom poskytuje všetky atribúty potrebné k životu (organické látky, vlhkosť, určitý rozsah teploty a dostatočné množstvo kyslíka), aby v nej dokázali žiť a metabolizovať, a zároveň ich chráni pred intenzívnym slnečným žiarením.

Pôda sa mnohými odborníkmi chápe ako „oživená hornina“. Je to „samostatný prírodný útvar, ktorý vzniká v najvrchnejšej časti zemskej kôry, v zóne interakcie litosféry, atmosféry, hydrosféry a biosféry, s ktorými je v sústavnej látkovej a energetickej premene a môže byť výrazne ovplyvňovaná prvkami antroposféry“. Nesmieme však zabudnúť tiež na teplo a energiu pohlcovanú povrchovými vrstvami Zeme zo slnečných lúčov. Neodmysliteľnou súčasťou pôdy sú aj rôzne iné mikroorganizmy, a tiež organizmy z rastlinnej a živočíšnej ríše. Rastliny svojím koreňovým systémom rozrušujú pôdu a jej čiastočky, a zároveň ju obohacujú o koreňové výlučky, ktoré obsahujú širokú škálu organických látok. Pôdne živočíchy svojou činnosťou mechanicky premiešavajú organické látky s minerálnymi, a v povrchových vrstvách pôdy jednotlivé druhy edafónu zároveň neustále rozkladajú, pretvárajú a zlučujú jednoduché aj zložité chemické látky. Pôdne bezstavovce tiež rozdrobujú organický materiál, čím zväčšujú jeho povrch pre rozkladnú činnosť pôdnych baktérií a mikroskopických húb. Baktérie a mikroskopické huby sú zaspotravou pre mnohé pôdne bezstavovce, ktoré sa takýmto spôsobom podieľajú na ich rozširovaní v pôde. Vďaka tomu, že spóry húb prechádzajú cez črevný trakt týchto organizmov, končí sa ich endogénna dormancia a môžu následne vyklíčiť. Mikroorganizmy sú teda funkčne prepojené s rastlinami a pôdnymi živočíchmi, pričom tvoria zložitú štruktúru potravových, symbiotických, konkurenčných a iných vzťahov živej zložky pôdy. Pôda by bez organizmov nebola pôdou, ale len mŕtvym substrátom, zvetranou hornou vrstvou

litosféry. Táto by nemohla plniť dôležité a nevyhnutné funkcie v rôznorodých ekosystémoch na našej planéte (BEDRNA et al. 2010).

Pôda je primárnym prostredím pre mikroorganizmy, činnosťou ktorých dochádza v nej k neustálym premenám. Pôdne organizmy, vrátane mikroorganizmov, podmieňujú zvetrávanie hornín a minerálov, rozklad a syntézu organických látok, premiešavanie organických a minerálnych látok, ako aj tvorbu pôdných agregátov. Podieľajú sa na fixácii vzdušného dusíka, asimilácii minerálnych látok, a sú tiež dôležitým článkom v potravnom reťazci iných organizmov. Ich schopnosť akumulovať a sorbovať mnohé ťažké kovy a potenciálne toxické prvky má značné využitie v ochrane pôd a vôd ako zložiek životného prostredia (ŠIMONOVICHOVÁ et al. 2013a, 2016b). Mikroorganizmy sú tiež primárne zodpovedné za rozklad pôdnej organickej hmoty a stabilitu pôdných agregátov, ktoré opletajú svojim mycéliom (RAJU et al. 2017).

Výskyt a rozšírenie mikroskopických vláknitých húb ovplyvňujú primárne a sekundárne ekologické faktory, ktorých účinok je navzájom veľmi prepojený. Priamy vplyv má napr. pH pôdy, ktoré ovplyvňuje nielen dynamiku, ale aj biologickú aktivitu mikroskopických vláknitých húb. A svojou metabolickou činnosťou spätne aj samotné mikroskopické vláknité huby ovplyvňujú hodnoty pôdnej reakcie. Rovnako, teplota pôdy, jej vlhkosť a prevzdušnenie priamo ovplyvňujú priestorovú distribúciu a dynamiku mikroskopických vláknitých húb v priebehu roka. Obsah humusu a rôznych iných organických látok predstavuje kľúčový faktor pre ich abundanciu a diverzitu, pretože sú to heterotrofné mikroorganizmy, ktoré bez týchto látok nedokážu existovať. Zároveň sú primárne zodpovedné za rozklad pôdnej organickej hmoty a stabilitu pôdných agregátov, ktoré opletajú svojim mycéliom (RAJU et al. 2017). Sekundárne ekologické faktory, ako napr. pôdny typ, textúra a štruktúra pôdy, hĺbka pôdneho profilu, nadmorská výška, sklon reliéfu, rastlinné spoločenstvo a jeho diverzita, veterné kalamity, požiar a pod. síce pôsobia sprostredkovane, ale ich vplyv nie je o to menší. Je dôležité si uvedomiť, že všetky tieto faktory pôsobia komplexne a nie je možné ich navzájom oddeliť. So stúpajúcou nadmorskou výškou sa mení rastlinné spoločenstvo a pôdny typ, čo sú sekundárne ekologické faktory. Mení sa tiež pH pôdy, znižuje sa množstvo humusu a klesá teplota, čo sú primárne ekologické faktory. Komplexné pôsobenie tak primárnych, ako aj sekundárnych ekologických faktorov sa následne prejaví nielen na zníženom počte rodov mikroskopických vláknitých húb, ale mení sa aj ich druhové zastúpenie vyjadrené ich diverzitou (ŠIMONOVICHOVÁ 2013, ŠIMONOVICHOVÁ et al. 2016a).

Kedže sa viac ako desať rokov, venujeme štúdiu viacerých lokalít z hľadiska pôdnej mikrobiológie a mykológie, vrátane oblastí s environmentálnou záťažou, naším tu prezentovaným cieľom bolo bližšie preštudovať najčastejšie sa vyskytujúci druh mikroskopických vlákňitých húb – *Aspergillus niger*. Rôzne kmene uvedeného druhu charakterizujeme z hľadiska molekuovej biológie s vyjadrením ich podobnosti, a tiež na základe ich fyziologických vlastností prostredníctvom metabolitov, ako sú enzýmy, organické kyseliny a mykotoxíny. Dôležitou súčasťou celej práce je vzájomné pôsobenie peliet druhu *Aspergillus niger* a ílových minerálov, ktoré majú veľké využitie v priemyselných biotechnológiách.

2. PREHLAD LITERATÚRY

2.1 Rod *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* zahŕňa rozmanitú skupinu druhov mikroskopických vláknitých húb, ktorá je založená na morfológických, fyziologických a fylogenetických znakoch. Tie významne ovplyvňujú biotechnológiu, výrobu potravín, vnútorné prostredie a tiež zdravie ľudí. Z taxonomického hľadiska sa rod *Aspergillus* doteraz spájal s teleomorfami deviatich rodov. Fylogenetické údaje však naznačujú, že spolu s rodmi, ako sú *Polypaecilum*, *Phialosimplex*, *Dichotomomyces* a *Cristaspora*, tvorí rod *Aspergillus* monofyletickú skupinu úzko súvisiacu s rodom *Penicillium*. Zmeny v Medzinárodnej nomenklatúre (International Code of Nomenclature) pre riasy, huby a rastliny viedli k prechodu na jedno meno podľa druhu, čo znamená, že bolo potrebné rozhodnúť, či sa *Aspergillus* ponechá ako jeden veľký rod, alebo sa rozdelí na niekoľko menších rodov. Medzinárodná komisia pre *Penicillium* a *Aspergillus* sa rozhodla ponechať *Aspergillus* ako samostatný rod, namiesto použitia menších rodov (SAMSON et al. 2014, TANNEY et al. 2017).

Kolónie aspergilov zvyčajne rastú rýchlo, sú sfarbené v rôznych odtieňoch bielej, žltej, hnedej, zelenej až po čiernu so zamatovým povrchom. Konídiofóry sú neseptované a nevetvené stonky s hruškovitou zdureninou na konci, tzv. vezikulou. Fialidy pučia priamo z vezikuly (uniseriálne – v jednom rade) alebo z metúl (biseriálne – vo dvoch radoch). Vezikula, fialidy, metuly a konídie tvoria typickú hlavičku. Konídie bývajú v suchých retiazkach, buď v kompaktných stĺpcoch alebo lúčovito sa rozbiehajúce (radiálne), sú jednobunkové s rôznou ornamentáciou, hyalínne alebo sfarbené (KLICH 2002). Druhy rodu *Aspergillus* patria medzi najčastejšie sa vyskytujúce mikroskopické vláknité huby po celom svete, a to vďaka schopnosti prežívať v rozmanitých podmienkach, ako je napr. široký rozsah teploty od 6 až do 55 °C a relatívne nízka vlhkosť. Rozšírenie druhov rodu *Aspergillus* spočíva aj v efektívnom rozptýlení ich konídií vzduchom na veľmi veľké vzdialenosti (BENNETT 2010).

Rod *Aspergillus* predstavuje početnú a druhovo veľmi rozmanitú skupinu mikroskopických vláknitých húb. Vyskytujú sa v nej tak patogénne, ako aj človeku prospešné druhy (SAMSON et al. 2014). Niektoré druhy sú významné ako humánne alebo živočíšne, či rastlinné patogény (napr. *A. fumigatus*, *A. terreus*), mnohé produkujú toxické

metabolity, ako sú aflatoxíny, ochratoxíny, patulín, citrinín, fumonizíny a iné mykotoxíny (napr. *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. niger*). Na druhej strane majú niektoré druhy široké využitie v rôznych oblastiach priemyslu, napr. v potravinárstve (výroba potravín, nápojov), chemickom priemysle (výroba kyselín a mnohých enzýmov), kozmetickom priemysle, priemyselných biotechnológiách (výroba antibiotík, alkaloidov) a pod. (KLICH 2002, GUPTA 2016).

Základná systematika druhov rodu *Aspergillus* a taxonomická klasifikácia je u mnohých aspergilov stále nejasná. Za veľmi dôležité, v rámci diagnostiky, je poznanie molekulovej, morfologickej aj fyziologickej charakteristiky, vrátane sekundárnych metabolitov, a chemotaxonómie založenej na chemickom zložení špecifických látok daného druhu (CHI-CHING et al. 2018). Veľmi dôležitá je diagnostika ekonomicky významných a taxonomicky problematických druhov, tzv. čiernych aspergilov zo sekcie *Nigri*. Ako uvádzajú SAMSON et al. (2004), *Aspergillus niger* komplex zahŕňa osem druhov – *A. niger*, *A. foetidus*, *A. piperis*, *A. brasiliensis*, *A. vadensis*, *A. costaricensis* a *A. lacticoffeatus*.

Skupina čiernych aspergilov je jednou z najťažších na identifikáciu a klasifikáciu preto, že aj v molekulovej identifikácii je značná variabilita. Odporúča sa preto, okrem molekulovej identifikácie, sledovať aj tvar a veľkosť kolónií na viacerých živných pôdach pri rôznych teplotách, zároveň pozorovať tvar a pigmentáciu konídií. Veľký dôraz sa kladie na stanovenie extrolitov, ktoré sú charakteristické iba pre určité druhy, a na základe ktorých je možné identifikovať všetkých zástupcov sekcie *Nigri*. Je to napr. asperazín, ktorý je možné použiť na rozlíšenie druhov *Aspergillus tubingensis*, *A. foetidus*, *A. vadensis* a *A. brasiliensis*, zatiaľ čo pyranonigrín A sa nachádza vo všetkých druhoch v komplexe *Aspergillus niger*, okrem *A. brasiliensis*, *A. costaricensis* a *A. vadensis*. Ako konštatujú SAMSON et al. (2007), všetky aspergily zo sekcie *Nigri* je možné od seba odlíšiť pomocou údajov o sekvencii kalmodulínu a všetky, okrem jedného, je tiež možné rozlíšiť pomocou sekvencie beta-tubulínu.

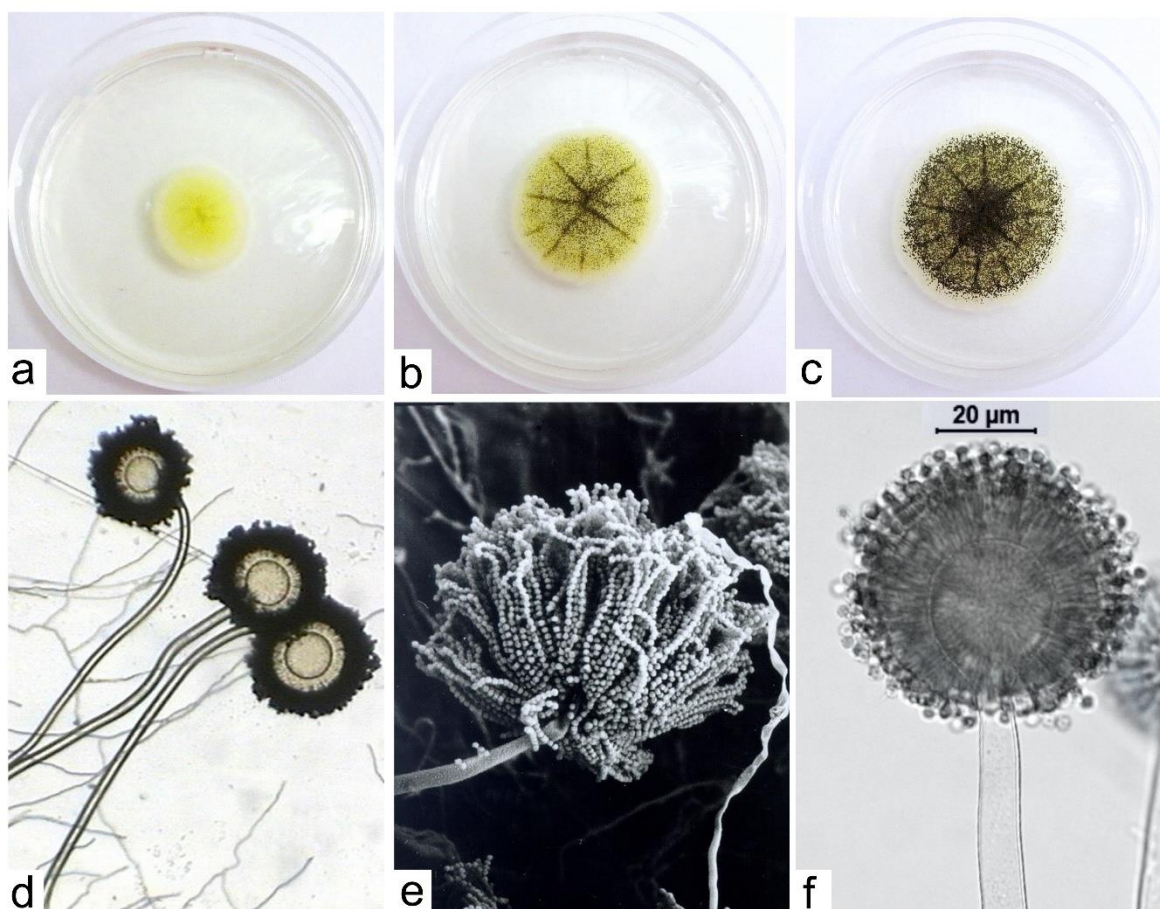
Systematické zaradenie druhu *Aspergillus niger* Tiegh. dokumentuje tab. 1. Tento kozmopolitný predstaviteľ mikroskopických vláknitých húb rastie na živných médiách v podobe roztoku alebo na pevnom substráte (rôzne živné pôdy s pridaním agaru) pomerne rýchlo.

Tabuľka 1. Systematické zaradenie druhu *Aspergillus niger* v rámci ríš húb (DE HOOG et al. 2020)

ríša	Fungi
kmeň	Ascomycota
trieda	Eurotiomycetes
rad	Eurotiales
čel'ad'	Aspergillaceae
sekcia	<i>Nigri</i>
rod	<i>Aspergillus</i>
druh	<i>Aspergillus niger</i>

Za 7 až 10 dní (u niektorých kmeňov aj skôr) sa vytvorí vzdušné mycélium, ktoré je najskôr bielej, potom žltej farby. Vysporulovaná kultúra sa následne javí ako čierna (Obr. 1a-c). Na vzdušnom mycéliu sa formujú konidiofóry končiace guľatou vezikulou, na ktorej vyrastajú metuly a štíhle fialidy. Z fialíd sa odškrucujú konídie s drsným povrchom (Obr. 1d-f). Substrátové mycélium je svetlej farby (DOMSCH et al. 2007).

Druh *Aspergillus niger* produkuje tiež široké spektrum hydrolytických a oxidačných enzýmov, ktoré sa podieľajú na rozklade rastlinnej lignocelulózy (BAKER 2006, KLICH 2002) a mnohé ďalšie enzýmy, ktoré majú využitie aj v priemysle. Z priemyselného hľadiska je *Aspergillus niger* dôležitý v odpadovom hospodárstve, najmä pre schopnosť degradovať plastické látky (RAAMN et al. 2012) a celulózu (PATYSHAKULIYEVA et al. 2016). Označený je ako GRAS (**g**enerally **r**ecognized **a**s **s**afe), všeobecne považovaný za bezpečný (GAUTAM et al. 2011). Je preto považovaný za „továreň“ na produkciu enzýmov, ktoré sa využívajú na výrobu kyseliny citrónovej ako potravinárskeho aditíva a kyseliny glukónovej (DIJKSTERHUIS et WÖSTEN 2013). Vďaka produkcii organických kyselín (napr. kyselina citrónová, glukónová, glykolová a mnoho ďalších (DOMSCH et al. 2007), ktoré sú významné pri lúhovaní ťažkých kovov, sa druh *Aspergillus niger* vyznačuje aj mimoriadnou schopnosťou účinne odstraňovať potenciálne toxické prvky ako napr. arzén, olovo, kadmium, meď, nikel a iné, procesom biolúhovania, bioakumulácie alebo biovolatilizácie (DOKU et BELFORD 2015, KAPOOR et al. 1999, PEŤKOVÁ et al. 2014, SANTHI et JAGADEESWARI, 2015).



Obr. 1. Vzdušné mycélium druhu *Aspergillus niger* na SDA po troch dňoch rastu (a), piatich dňoch rastu (b) a siedmich dňoch rastu (c). Konídiofór ukončený hlavičkou s metulami, fialidami a odškrucujúcimi sa konídiami. Sklíčková kultúra druhu zv. 180x (d), dlhé retiazky konídií SEM zv. 940x (e), detail hlavičky (f). (A. Šimonovičová, archív, S. Nosalj).

Aspergillus niger produkuje tiež širokú škálu sekundárnych metabolitov, z ktorých napr. ochratoxín A, malformín C a niektoré nafto- γ -chinóny pôsobia toxicky. Kontaminuje tiež niektoré potraviny, ako sú napr. vajcia, mäso, cibuľa. U ľudí môže vyvolávať otomykózy, t. j. ochorenie uší, ale aj pľúc, a pridružuje sa tiež k TBC, či rakovine pľúc (DOMSCH et al. 2007).

2.2 Výskyt druhov *Aspergillus niger* vo svete

Veľkým zdrojom údajov o výskyte príslušného druhu, nielen v pôdach, ale aj iných substrátoch, je najčastejšie diagnostická literatúra (DOMSCH et al. 2007), monografia príslušného rodu (KLICH, 2002) alebo tzv. mykologické checklisty (LEE et al. 2003, NOVÁKOVÁ et al. 2012), čo sú národné zoznamy druhov mikroskopických vlákňitých húb.

V celosvetovom meradle bol jeho výskyt zaznamenaný v pôdach naprieč všetkými vegetačnými zónami, ako sú napr. stepi, lúky a pasienky, listnaté a ihličnaté lesy, vresoviská, poľnohospodárske pôdy, vinohrady s vysokým obsahom medi (ABDEL-AZEEM 2003, DEVI et JOSHI 2012, HAFEZ 2012, IRAM et al. 2013, OZKAN et al. 2001), slaniská (BUTINAR et al. 2011, CANTRELL et al. 2006), pôdy parkov a záhrad (OGUNMWONYI et al. 2008), pôda z pobrežia Červeného mora (ALWAKEEL 2017), púštne oblasti v Egypte (MOUBASHER et MOUSTAFA 1970), púštne oblasti v Líbyi (EL-SAID a SALEEM 2008), ale tiež v Syrii (ABDEL-KADER et al. 1983), Kuvaite (HALWAGY et al. 1982) a Číne (GRISHKAN et al. 2015).

V arktickej oblasti výskyt druhu *Aspergillus niger* zaznamenal SINGH et al. (2012) na Špicbergoch, na ruskom ostrove Kara Sea vo výskumnom stredisku Izvestia TSIK pri simulovaných podmienkach vplyvu ľudskej činnosti na arktickú mikrobiotu KIRTSIDELI et al. (2014). Z pôdných typov bol jeho výskyt preukázaný napr. v černozemiach, rendzinách a v podzoloch (DOMSCH et al. 2007, KLICH 2002).

Druh *Aspergillus niger* bol izolovaný ako termofilný z pôdy dažďového pralesa pred vstupom do jaskyne, a tiež v jaskyni na Taiwane (HSU et AGORAMOOOTHY 2001), ale aj zo zasoleného substrátu na pobreží Mŕtveho mora (GRISHKAN et al. 2003) a zo zasoleného substrátu a vody jazera Mono v Kalifornii (STEIMAN et al. 2003), z pieskových pláží v Egypte (MIGAHED 2003), z lesnej pôdy s porastom borovice čiernej v Turecku (ASAN 2004), z pôdy pod lúčnym porastom v Španielsku (MAGGI et al. 2005), z povrchu zŕn pšenice, ciroku a jačmeňa (FAKHRUNNISA et al. 2006), z viacerých bližšie nešpecifikovaných pôd v Pakistane z hĺbky 10 až 50 cm (SUHAIL et al. 2007), z poľnohospodárskej pôdy pred siatím hrachu a v priebehu jeho kvitnutia (OKORSKI et MAJCHRZAK 2007), z povrchu guána netopierov v jaskyni v Portoriku (NIEVER-RIVERA et al. 2009), z pôdneho typu glej a pseudoglej za redukčných podmienok, z pôdneho typu černozem, rendzina a podzol (DOMSCH et al. 2007, KLICH 2002), z pôdy tropického lesa, a tiež z pieskových dún v Indii (PANDA et al. 2010), z podzolovej pôdy v Poľsku (MAJCHRZAK et al. 2010), z pôdy palmových plantáží v Španielsku (ABDULLAH et al. 2010), z morského sedimentu (SAMUEL et PRABAKAN 2011), ale aj z cesnaku (DELGADO 2011), z vrchnej vrstvy pôdy a opadanky v Indii (SHARMA et al. 2011). Ako koprofilný druh ho z Brazílie (v štáte Pernambuco) uvádza CALAÇA et al. (2014). JENA et al. (2015) uvádza *Aspergillus niger* ako dominantného zástupcu mykobiocenózy, a to tak v letnom ako aj zimnom období, z bližšie nešpecifikovanej lesnej pôdy listnatého lesa. Druh bol izolovaný tiež z pôdy po zbere arašidov vo východnej Zambii (NJOROGI et al. 2016), z poľnohospodárskej pôdy v Argentíne (CARRANZA et al. 2017), ale aj z detského ihliska v Nigérii (GULUMBE et al. 2017).

Aspergillus niger sa pomerne často vyskytuje aj v pôdach s kontamináciou rôznych potenciálne toxických prvkov, pričom je schopný tolerovať zvýšené hodnoty napr. hliníka a fluóru (EVDOKIMOVA et KORNEYKOVA 2010), kadmia, chrómu, medi, niklu, olova a zinku (IRAM et al. 2013a, b). Druh bol tiež izolovaný z prímestskej poľnohospodárskej pôdy so zvýšeným obsahom zinku, olova, kadmia, niklu a kobaltu v Pakistane (IRAM et al. 2009), z pôd kontaminovaných ropnými derivátmi (HUSSEIN et YOUSEF 2011), z poľnohospodárskej pôdy kontaminovanej arzénom v Indii (SINGH et al. 2015), zo sedimentov a pobrežnej lagúny so zvýšeným obsahom kadmia, medi, železa, mangánu, olova a zinku v Egypte (ABDEL-AZEM et al. 2015), z poľnohospodárskej pôdy so zvýšeným obsahom ortuti po nezákonnej ťažbe zlata v Indonézii (HINDERSAH et al. 2018).

2.3 Výskyt druhu *Aspergillus niger* v pôdach na Slovensku

Výskyt druhu *Aspergillus niger* v rôznych pôdných typoch, vrátane bližšie nešpecifikovaných pôd, od roku 1958 zdokumentovala ŠIMONOVICHOVÁ (2013). Jeho výskyt zaznamenala v pôdnom type litozem, ranker, regozem, fluvizem, černoze, čiernica, umbrizem, hnedozem, luvizem, kambizem, podzol, kultizem, antrozem a technozem. Je zaujímavé, že v skupine technogénnych pôd, čo sú pôdy výrazne ovplyvnené technogénnou činnosťou človeka, kam patrí pôdny typ antrozem (pôvodne prírodné materiály) a technozem (človekom vyrobené látky), má druh *Aspergillus niger* dominantné zastúpenie (ŠIMONOVICHOVÁ et al. 2019).

Mikroskopické vlákňité huby majú veľkú schopnosť prispôbiť sa negatívne zmeneným podmienkam prostredia, čo im umožňuje existovať často aj v extrémnom prostredí, ako sú napr. acidifikované alebo banskou činnosťou ovplyvnené pôdy a riečne sedimenty, výsypky, haldy a AMD. Výskyt mikroorganizmov, vrátane mikroskopických vlákňitých húb v prostredí, kde sa vyskytujú ióny kovov uvoľnené z pôvodných anorganických zlúčenín, predstavujú vážne environmentálne riziko, nakoľko u nich dochádza k výrazným morfológickým. Na nevyhovujúce fyziologické podmienky mikroskopické vlákňité huby reagujú vylučovaním veľkého množstva medziproduktov citrátového cyklu, napr. kyseliny citrónovej, fumárovej a α -oxalglutarovej. Dlhodobý účinok rôznych ťažkých kovov a toxických prvkov, ako je napr. olovo, zinok, meď, kadmium, ortuť, arzén, antimón a pod., spôsobuje výrazné deformácie na makromorfológickej a mikromorfológickej úrovni. Zmeny na makromorfológickej úrovni sa prejavujú menším

rastom kolónií, tvorbou riedkeho, resp. nevyvinutého mycélia s potlačenou alebo výrazne oneskorenou sporuláciou (ŠIMONOVICHOVÁ et al. 2002, 2013b).

Environmentálna záťaž jednotlivých zložiek životného prostredia ovplyvňuje v mikroorganizmoch aj hladinu metaloproteínov a ich aktivitu. Často dochádza k poškodeniu samotnej štruktúry proteínu v dôsledku chemickej výmeny iónov kovov, ktoré tvoria aktívne centrum molekuly enzýmu. Odpoveďou na dlhodobé pôsobenie kontaminovaného prostredia sú modifikované (mutantné) kmene pôdných mikroorganizmov so zmenenou štruktúrou bunkových stien, obsahom a pomerom medzi monosacharidmi a oligosacharidmi, ako aj zložením lipoproteínov a ich podielom na receptorových kanáloch. Súčasne sú tieto mutanty zdrojom nových modifikovaných génov so zmenenou úrovňou expresie. Poskytujú tak možnosť ovplyvniť úroveň expresie hydrolytických enzýmov zo skupiny glukonáz (β -1,2 a β -1,4-Glu), chitináz a celuláz, ktorých produkty sa nachádzajú vo vysokomolekulovej časti kyslého a bázického proteínového spektra. Celulázy sú práve jedným z molekulových produktov, ktoré druh *Aspergillus niger* poskytuje vo veľkoobjemových priemyselných kultiváciach (ŠIMONOVICHOVÁ et al. 2013b).

3. Metabolity mikroskopických vláknitých húb a ich stanovenie systémom Biolog FF MicroplatesTM

Každý živý organizmus v rámci svojich metabolických dráh produkuje širokú škálu rôznych látok, t. j. produktov alebo medziproduktov metabolizmu, ktoré sú nevyhnutné pre udržanie životných procesov živej bunky, napr. sacharidy, vrátane polysacharidov, bielkoviny, aj enzýmy, lipidy, nukleové kyseliny a pod. Mikroskopické vláknité huby sú však už veľmi dlho známe svojou schopnosťou produkovať obrovské množstvá chemických zlúčenín, známych ako sekundárne metabolity, z ktorých mnohé majú potenciálne antibiotické, a tiež iné farmakologické vlastnosti. Sekundárny metabolizmus, ktorý prebieha nepravidelne až zriedkavo, predstavuje skupinu biologických procesov, ktoré nie sú pre bunku esenciálne, ale predstavujú zdroj biologicky aktívnych zlúčenín (GOYAL et al. 2016, LEITÃO and ENGUITA 2016). Každý z produktov tohto metabolizmu zohráva v životnom cykle daného mikroorganizmu veľmi dôležitú úlohu. Je však rozdiel, v akej časti životného cyklu, resp. rastovej krivky, a tiež v akých ekologických podmienkach sa daný organizmus nachádza. Na základe týchto špecifických metabolitov možno zaznamenať a následne vytvoriť biologický profil daného druhu a určiť jeho fenotyp. Metóda, resp. systém, Biolog sa v mikrobiológii používa viac ako pätnásť rokov a prvýkrát ho použili KLINGLER et al.

(1992). Na spoľahlivosť metódy poukazujú práce viacerých autorov. Napr., RICE et CURRAH (2005) ju použili na rozlíšenie podobných kmeňov rodu *Oidiodendron* a *Myxotrichum*. Metóda Biolog má široké využitie aj v ekologických štúdiách na odhad metabolického potenciálu rizosféry mikrobiálnych spoločenstiev v pôde (STEFANOWICZ 2006), pri zisťovaní vplyvu zmien prostredia na mikroorganizmy antropogénnou činnosťou, ako je napr. využívanie krajiny a jej obhospodarovanie (WANG et al. 2018), ale tiež vyhodnotenie mikrobiálnej diverzity (GRYTA et al. 2014). Skúmané boli aj kmene druhu *Aspergillus* sp., kedy systém Biolog FF MicroPlates zaznamenal a vyhodnotil údaje o využití substrátu s obsahom uhlíka a o mitochondriálnej aktivite jednotlivých kmeňov (ROLA et al. 2015). AZIZ et ZAINOL (2018) tento systém použili tiež na identifikáciu mikroskopických vlákňitých húb izolovaných z lesnej pôdy, ktoré boli aplikované do pôdy po záplave na znovuoživenie mikrobiálneho života.

Fenotypový profil mikroorganizmov získaný pomocou systému Biolog FF MicroPlates umožňuje okrem identifikácie druhov získať aj cenné informácie o fyziologických vlastnostiach druhov, a tak dopĺňa ich genotypový identifikačný profil získaný molekulovými technikami. Použitie GENIII, FF a YT-microassay Biolog umožňuje rozsiahle metabolické profilovanie a autentifikáciu rôznych mikroorganizmov – mikroskopických vlákňitých húb, kvasiniek aj baktérií.

Systém Biolog sa v súčasnosti osvedčuje ako veľmi užitočný nástroj na štúdium mikroorganizmov. Okrem základnej funkcie, ktorá umožňuje identifikáciu mikroorganizmov, je vhodné jeho využitie aj na pochopenie rozmanitosti mikroorganizmov nielen v rámci štruktúry spoločenstva, ale aj ich funkcií pri interakcii s prostredím. Ako uvádza STEFANOWICZ (2006), technika systému Biolog je vhodná na hodnotenie environmentálnych rizík, kvality životného prostredia a zmien daného prostredia.

3.1 Pôdne enzýmy

Z mnohých mikrobiologických charakteristík sa, napr. enzýmy používajú ako indikátory kvality pôdy, pretože veľký povrch, aktivita, rozšírenie, generačná doba a diverzita pôdnej mikrobiocenózy umožňuje veľmi rýchlu reakciu na akýkoľvek podnet (KUBÁT et al. 2002). Aktivita enzýmov je v úzkom vzťahu k dôležitým pôdnym charakteristikám, môže vykazovať zmeny skôr než iné pôdne vlastnosti, a preto môže byť integrujúcim pôdno-biologickým indexom odrážajúcim využívanie pôdy (ŠARAPATKA 2002).

Pôdne enzýmy zohrávajú kľúčovú úlohu pri prenose energie v pôde rozkladom organických látok. Je to napr. esteráza, ktorá štiepi lignocelulózový materiál, celulóza, ktorá rozkladá najrozšírenejší stavebný polysacharid celulózu, tiež proteázy, ktoré štiepia peptidové väzby v proteínoch na menšie fragmenty peptidov a mnohé iné (ABIRAMI et al. 2011, ARINZE et YUBEDEE 2000, DIMAROGONA et TOPAKAS 2016, VISHWANATHA et al. 2010). Mnohé dôležité reakcie potrebné pre životné procesy pôdných mikroorganizmov sú katalyzované enzýmami. Tieto pomáhajú tiež pri stabilizácii pôdnej štruktúry. Mikroorganizmy sú primárnym zdrojom pôdných enzýmov, ale k ich zásobe prispievajú tiež rastliny a živočíchy. Enzýmy reagujú pomerne rýchlo na akékoľvek zmeny v postupoch obhospodarovania pôdy, a tiež na zmeny podmienok prostredia. Ich aktivita je úzko spojená s fyzikálno-chemickými a biologickými vlastnosťami pôdy. Používajú sa preto ako senzory na vyhodnotenie stavu pôdnej mikrobioty, napr. vplyvu rôznych polutantov, vtrátane ťažkých kovov, fyzikálno-chemických podmienok pôdy, pôdných úprav, ako aj vplyvu klimatických faktorov na úrodnosť pôdy (RAO et al. 2017, SHEN et al. 2005). Enzýmy sa tiež významne podieľajú na zdravotnom stave pôdy, kedy medzi najdôležitejšie patria amyláza, arylsulfatáza, β -glukozidáza, chitináza, dehydrogenáza, fosfatáza, proteáza a ureáza. Pôdne enzýmy sú priamymi mediátormi biologického katabolizmu organických a minerálnych zložiek v pôde a úzko súvisia s pôdnymi organickými látkami, aktivitou mikroorganizmov a mikrobiálnou biomasou (DAS et VARMA 2010, UTOBO et TEWARI 2015).

Lipáza (triacylglycerol acylhydroláza) je jedným z významných enzýmov zo skupiny hydroláz, ktorý rozkladá tuky na glycerol a mastné kyseliny. V prírode sa vyskytuje hojne, najmä v baktériách, kvasinkách a mikroskopických vláknitých hubách (GUPTA 2016). Lipázy majú veľké využitie vo viacerých odvetviach priemyslu, napr. v potravinárstve, kožiarskom priemysle, používajú sa tiež pri výrobe kozmetiky, pracích prostriedkov, liečiv a pod. (ABD EL AAL et al. 2019, LIMA et al. 2019). Zdrojom priemyselne pripravovaných lipáz sú baktérie a mikroskopické vláknité huby, a to najmä druhy rodu *Aspergillus*. V posledných rokoch vzrastá záujem o produkciu mikrobiálnej lipázy kvôli veľkému potenciálu v priemysle, napr. na syntézu biopolymérov a bionafty, agrochemikálií a aromatických látok (JIA et al. 2015).

3.2 Organické kyseliny mikroskopických vláknitých húb a ich význam v pôde

Pôda je komplexný systém zložený z mnohých, pre funkciu ekosystému dôležitých, procesov. Podmienkou života všetkých organizmov v ekosystéme je kolobeh hmoty a

energie. Základom každého kolobehu prvkov je rozklad organickej hmoty, na ktorom sa výrazne podieľajú aj organické kyseliny vyskytujúce sa v pôde. Zdrojom organických kyselín v pôde sú mikroorganizmy, korene rastlín a rozkladajúca sa organická hmota. Vo všeobecnosti organické kyseliny možno rozdeliť na vysokomolekulové a nízkomolekulové. Nízkomolekulové organické kyseliny obsahujú jednu až tri karboxylové skupiny, ako napr. kyselina šťaveľová, citrónová, jablčná, jantárová a iné, ktoré pochádzajú z koreňových výlučkov, metabolitov mikroorganizmov alebo produktov vznikajúcich z rozkladu organickej hmoty (JIANG et al. 2012). Vysokomolekulové organické kyseliny obsahujú viac ako tri karboxylové skupiny a vznikajú primárne rozkladom organickej hmoty. Patria sem humínové a fulvické kyseliny (POTYSZ et al. 2017).

Organické kyseliny majú v pôde viacero významných úloh. Kľúčovú úlohu zohrávajú vo fyzikálno-chemických procesoch, ako je mineralizácia a solubilizácia, čo je rozpúšťanie ťažko dostupných a komplexných minerálov. Značný význam majú aj v bioremediáciach potenciálne toxických prvkov (ADELEKE et al. 2017). Organické kyseliny sú bežnou zložkou väčšiny poľnohospodárskych pôd, kde sa podieľajú na sprístupňovaní živín (BALOGH-BRUNSTAD et al. 2008). Schopnosť pôdných organických kyselín uvoľňovať nerozpustné minerály je naviazaná na tri základné mechanizmy: acidifikáciu, chelatizáciu a výmennú reakciu (ADELEKE et al. 2010). Acidifikáciou pôdy dochádza k rozpúšťaniu a uvoľňovaniu minerálov do pôdneho roztoku, čo v konečnom dôsledku umožňuje rastlinám získať dovtedy neprístupné živiny. Chelatizáciou organické kyseliny formujú komplexné zlúčeniny s minerálmi a následne uľahčujú ich rozpustnosť v pôde (MORGAN et al. 2005). Tretím spôsobom je výmenná reakcia, čo je nahrádzanie minerálov naviazaných na pôdných koloidoch (BAO et al. 2013).

V súčasnosti sa pôda mení najmä pod vplyvom človeka, ktorý čoraz viac zasahuje do životného prostredia. Výskyt potenciálne toxických prvkov sa stáva súčasťou všetkých zložiek životného prostredia a široká škála potenciálne toxických prvkov, ako sú napr. hliník, kadmium, olovo, zinok, meď a chróm, sa dostáva do pôdy z prírodných, ale najmä antropogénnych zdrojov (PRASAD et al. 2010). Výsledkom tejto činnosti je zmena primárnych ekologických faktorov pôsobiacich v pôde, na ktorú mikroorganizmy odpovedajú produkciou organických kyselín. Mikroskopické vlákňité huby tak reagujú na nevyhovujúce fyziologické podmienky, vylučovaním veľkého množstva medziproduktov citrátového cyklu, ako je napr. kyselina citrónová, fumárová a α -oxalglutarová. Organické kyseliny produkované mikroorganizmami majú tiež schopnosť znížiť pôdne pH, a následne formovať komplexy s potenciálne toxickými prvkami, ktoré sú v kyslom prostredí mobilné

(RENELLA et al. 2004). Potenciálne toxické prvky nie sú biodegradovateľné, ale môžu byť transformované na menej toxické látky. Niektoré mikroorganizmy sú schopné tieto toxické látky viazať, stabilizovať alebo mobilizovať prostredníctvom svojich metabolických procesov (JUHASOVÁ et al. 2016). Produkciou organických kyselín sa vyznačuje široká škála mikroskopických vláknitých húb, najmä druhy rodov *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Talaromyces* a mnohé ďalšie.

3.3 Druh *Aspergillus niger* – producent organických kyselín

Jedným z najznámejších producentov organických kyselín je druh *Aspergillus niger*. Produkuje ich široké spektrum, ako je napr. kyselina jablčná, octová, vínna, propiónová, glukánová, oxalátová a mnohé ďalšie.

Z organických kyselín má, najmä v potravinárskom a farmaceutickom priemysle, najväčšie využitie kyselina citrónová (BRANDL et al. 2018, LIAUD et al. 2014, MAHARANI et al. 2014, TONG et al. 2019, WALASZCZYK et al. 2018). Uvedený druh je už viac ako 50 rokov hlavným zdrojom priemyselne vyrábanej kyseliny citrónovej. Kyselina citrónová má vďaka svojim mnohým aplikáciám vysoký ekonomický potenciál. Vzhľadom na prudký nárast dopytu a rastúce trhy je potrebné vyvinúť lepšie výrobné techniky na zvýšenie produkcie. Výrobný proces by mal byť ekologicky šetrný s využitím ľahko dostupných a lacných agropriemyselných odpadových produktov pri zachovaní vysokej produkcie (SHOW et al. 2015). Ako uvádzajú UPTON et al. (2017), vývoj náhodnou mutagenézou umožnil metabolické modelovanie, čím sa dosiahlo zlepšenie fermentačného výkonu. Takýto kmeň, resp. kmene upravené tzv. metabolickým inžinierstvom sú schopné zvýšiť produkciu kyseliny citrónovej na lacných surovinách. Pod metabolickým inžinierstvom RASOULNIA et MOUSAVI (2016) uvádzajú vytvorenie optimálnych podmienok na produkciu kyseliny citrónovej v bioreaktore. Je to predovšetkým vhodná koncentrácia sacharózy (101,9 g/l), prevzdušenie (762,5 ml/min) a veľkosť inokula (40 ml/l).

Významnou úlohou organických kyselín produkovaných druhom *Aspergillus niger* v pôde je aj rozpúšťanie minerálov, sprístupňovanie živín a viacerých prvkov, ako napríklad fosfor. Fosfor je pre rastliny esenciálnym prvkom a jeho nízka mobilita je v poľnohospodárskych pôdach limitujúcim faktorom pre pestovanie obilnín, čo sa, okrem iného, pripisuje aj jeho nízkej rozpustnosti. Pri porovnaní druhov *Penicillium oxalicum* a *Aspergillus niger*, izolovaných z poľnohospodárskej pôdy, ZHEN et al. (2016) poukázali, na väčšiu efektívnosť druhu *Aspergillus niger* vďaka vyššej produkcii organických kyselín a

schopnosti prispôbiť sa prostrediu s nižším pH. Organické kyseliny zohrávajú tiež významnú úlohu pri biologickej dostupnosti selénu (DINH et al. 2017). Druh *Aspergillus niger* vylučuje citrát, ktorý umožňuje zvýšenie biologickej dostupnosti železa (ODONI et al. 2017). Na druhej strane, produkcia organických kyselín má využitie nielen v biotechnológii.

3.4 Druh *Aspergillus niger* – producent mykotoxínov

Druhú veľkú skupinu metabolitov mikroskopických vláknitých húb predstavujú mykotoxíny. Sú to neprchavé zlúčeniny s nízkou molekulovou hmotnosťou. Ako sekundárne metabolity nie sú nevyhnutné pre život daného organizmu, ale pravdepodobne producentovi poskytujú určitú ekologickú výhodu, napr. pri prístupe k živinám v prostredí. Štúdium mykotoxínov sa spája najčastejšie s ich výskytom v potravinách, či krmivách, pretože vďaka svojim toxickým vlastnostiam predstavujú hrozbu pre všetky teplokrvné živočíchy (KLICH et al. 2009, NELSON et al. 1993). Medzi najproduktívnejšie patria druhy rodov *Fusarium*, *Penicillium* a *Aspergillus* (DING et al. 2017). Druh *Aspergillus niger* môže syntetizovať mykotoxíny ochratoxín A a fumonizíny (PITT et HOCKING 2009), pričom obe tieto skupiny majú na zdravie ľudí a zvierat teratogénny, imunotoxický, mutagénny a karcinogénny účinok (CREPPY 2002). Doteraz je známych cca 500 mykotoxínov a problematika väčšiny z nich stále nie je preštudovaná (GACEM et al. 2020, MOSINA et al. 2020). Význam sekundárnych metabolitov, ktoré produkujú mikroskopické vláknité huby v pôde, sa spája predovšetkým s posilnením ich obranných reakcií vo vzťahu k iným pôdnym organizmom. Mikroskopické vláknité huby sú totiž v pôde často vystavené konkurentom, ako sú napr. améby, nematódy alebo aj iné mikroorganizmy, s ktorými majú antagonistické vzťahy (KARKLOVSKY 2008, FOX et HOWLETT 2008, ROHLFS et CHURCHILL 2011, ROHLFS et al. 2007). Mykotoxíny v pôde môžu tiež slúžiť ako chemické signály medzi jednotlivými mikroorganizmami, napr. za účelom ochrany sklerócia húb pred predátormi (RASMUSSEN et al. 2005, ROHLFS et KÜRCHNER 2010). Funkcia mykotoxínov v pôde zatiaľ nie je podrobne preskúmaná, nakoľko tento typ výskumu narúšajú rôzne prirodzené faktory. Prostredníctvom produkcie sekundárnych metabolitov mikroskopickými vláknitými hubami však v pôde dochádza často k interakcii týchto metabolitov s rastlinami. U niektorých rastlín bolo napr. pozorované tzv. maskovanie mykotoxínov v dôsledku metabolických zmien daného rastlinného druhu ako výsledok obranného mechanizmu (PFLIEGER et al. 2020).

Ako ukázali LEE et al. (2013), medzi sekundárnymi metabolitmi sú niektoré viazané na konkrétny druh mikromycéty, napr. neosartorín identifikovali ako zlúčeninu špecifickú

iba pre druh *Aspergillus lentulus*. A táto chemotaxonomická klasifikácia založená na metabolitoch sa tak stáva účinným nástrojom klasifikácie *Aspergillus* spp. s druhovo špecifickou účinnosťou.

3.5 Druh *Aspergillus niger* a jeho využitie v bioremediačných procesoch

Adaptácia druhu *Aspergillus niger* na kyslé až extrémne kyslé prostredie a jeho schopnosť produkovať mnohé organické kyseliny sa využíva v mnohých biotechnologických procesoch. Sú to napr. procesy biodegradácie, biosorpcie, biolúhovania a bioremediácie kontaminovaného pôdneho prostredia za účelom znižovania obsahov kovov a potenciálne toxických prvkov v prostredí (JOSHI et al. 2011, GULZAR et al. 2017, SRIVASTAVA et THAKUR 2006, URÍK et al. 2015).

CHAUDHRY et al. (2012) a OLUKUNLE et OYEGOKE (2016) sledovali biodegradáciu ropy; GULZAR et al. (2017) zase syntetických aj priemyselných odpadových vôd vznikajúcich v textilnom priemysle. Viaceré druhy mikroskopických vláknitých húb izolované z kontaminovaných substrátov, a predovšetkým *Aspergillus niger*, sú považované za vhodné biosorbenty napr. niklu, chrómu a kadmia (AHMAD et al. 2006), ale aj ortuti z viacerých substrátov, ako je napr. pôda, kaly, priemyselné a odpadové vody (BAHOBIL et al. 2017). Akumuláciu širokej škály potenciálne toxických prvkov, ako napr. kadmium, zinok, meď, olovo a iné, potvrdili napr. ZENG et al. (2015). Biolúhovanie je proces extrakcie rôznych kovov živými organizmami, resp. činnosťou organických kyselín, ktoré tieto organizmy produkujú. *Aspergillus niger* má v tomto smere veľmi veľké využitie, napr. pri biolúhovaní kadmia, medi, olova, zinku z kontaminovaných pôd (REN et al. 2009, XINHUI et al. 2018), pri znižovaní obsahu zinku, olova, kobaltu, kadmia, medi, arzénu(III), fluóru, a tiež striebra (ACOSTA-RODRÍQUEZ et al. 2018; ANJUM et al. 2010, GHOLAMI et al. 2011) a uránu (WANG et al. 2013).

V bioremediačných procesoch sa najčastejšie používajú druhy, resp. kmene určitých druhov mikroskopických vláknitých húb, ktoré boli izolované z kontaminovaného prostredia. Predpokladá sa ich vyššia účinnosť v porovnaní s druhmi, resp. kmeňmi pochádzajúcimi z nekontaminovaného prostredia. Takto sa ako vysoko účinný ukázal druh *Aspergillus niger* pri bioremediácii ortuti z pôdy kontaminovanej týmto prvkom (HINDERSAH et al. 2018).

3.6 Pelety mikroskopických vláknitých húb a ich využitie

Pelety predstavujú stabilné guľaté, oválne alebo elipsoidné aglomeráty pozostávajúce z rozvetvených a prepletených sietí hýf. Ako však uvádza VEITER et al. (2018), pelety sa môžu vytvárať koagulačným alebo nekoagulačným spôsobom. V tzv. koagulačnom type peliet sa spóry rýchlo zoskupujú a následne klíčia, čím vytvoria peletu. Pri tzv. nekoagulačnom type peliet je to naopak. Tento typ peliet je spojený s premiešavaním a prevzdušňovaním. GARCÍA-REYES et al. (2017) uvádza štyri hlavné časti (regióny) pelety, označené ako R1 – R4. V strede sa nachádza jadro pelety (R1), okolo ktorého môže byť dutá časť (R2). Časť označenú ako R3 tvoria vlákna, ktoré môžu vykazovať znaky autolýzy, a to v takom prípade, keď sa tieto vlákna začínajú rozkladať vlastnými enzýmami. Oblasť životaschopných vlákien (hýf) je označená ako R4 a je to vonkajšia časť pelety, ktorú vidíme ako chlpatú alebo vlasatú („hairy“ region).

V priemyselných procesoch sa z ekonomického hľadiska uprednostňujú pelety. Dôvodom je menšia spotreba energie pri prenose teploty a hmoty, ako aj možnosť opätovného využitia biomasy, a tiež nepretržitá prevádzka. Mycéliové pelety sú veľmi nejednotné bunkové celky, pri ktorých obmedzenie prenosu teploty a hmoty spôsobuje biochemické a štruktúrne zmeny vedúce k vzniku rôznych špecifických metabolických štruktúr. Veľkosť a tvar vonkajšieho povrchu peliet sa odlišuje, pohybuje sa od chlpatých až po hladké formy (ŽNIDARŠČIČ et PAVKO 2001).

Na morfológiu peliet vplývajú viaceré faktory dôležité pri ich kultivácii, ako napr. rýchlosť otáčok, teplota a pH prostredia, prítomnosť kovov, ale tiež vlastnosti druhu mikroskopickej vláknitej huby a jeho metabolické aktivity (COURI et al. 2003, PAPAGIANNI 2014, ŠIMONOVICOVÁ et al. 2017, VEITER et al. 2018).

3.7 Interakcia mikroskopických vláknitých húb s ílovými minerálmi

Vzťahy medzi mikroorganizmami a minerálnymi časticami pôdy, najmä ílovými minerálmi, majú veľký význam tak pre samotné mikroorganizmy, ako aj pre pôdu. Na rozdiel od ílového zloženia pôdy, ktoré je v podstate stále, štruktúra biocenózy podlieha značným zmenám v priestore a čase pod vplyvom mnohých ekologických, trofických a technologických faktorov (NOVÁKOVÁ 1989). Spoločný výskyt mikroskopických vláknitých húb a mikrokryštalických anorganických silikátov je v prírodných sedimentoch veľmi častý. Oba komponenty sú veľmi frekventovanou zložkou väčšiny pôd a sedimentov, pričom oba

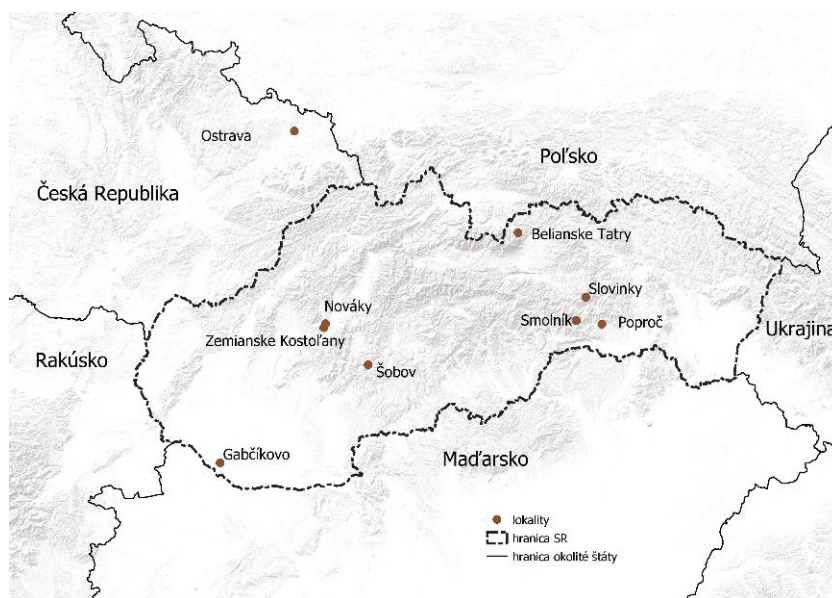
sú schopné znižovať v ich bezprostrednom prostredí koncentráciu rôznych vo vode rozpustných látok. Predpokladom pre transport týchto látok z okolitého prostredia je prítomnosť vody v jej kvapalnej fáze, ktorá výrazne zvyšuje interakčnú plochu sorbentu aj v dôsledku ich rozpadu na menšie častice a zároveň umožňuje uplatnenie sorpčných mechanizmov (JESENÁK et al. 2015, NOSALJ et al. 2020).

Interakcie mikroskopických vláknitých húb s anorganickými a organickými tuhými látkami sa uskutočňujú na povrchu tuhých látok, či už priamo bezprostredným kontaktom hýf mikroskopických vláknitých húb (mechanické rozrušovanie tuhých látok) alebo nepriamo chemickým pôsobením metabolitov húb (KOLENČÍK et al. 2007). Adsorpcia medzi mikroorganizmami a minerálnymi časticami pôdy je veľmi dôležitý ekologický fenomén mikrobiálnej existencie, ktorý pomáha pôdnym mikroorganizmom pri zadržiavaní vo vyšších pôdných vrstvách a zabraňuje stresu a letálnym environmentálnym efektom (FOMINA et al. 1999). Vzhľadom na bioakumulačné vlastnosti mikroskopických vláknitých húb, ako aj sorpčné vlastnosti mikrokryštalických silikátov, sa uvažuje o ich potenciálnom využití pri dekontaminácii životného prostredia (FOMINA et GADD 2002).

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1 Druh *Aspergillus niger* ako modelový organizmus

Ako modelový organizmus sme si zvolili druh *Aspergillus niger* a jeho, z viacerých substrátov, izolované environmentálne kmene. Celkovo sme pracovali so 16-timi kmeňmi uvedeného druhu, ktoré sme získali v priebehu rokov 2013 – 2018 z viacerých miest zo Slovenska, z Českej republiky (Obr. 2), tiež z Kuvajtu a z povrchu pevného substrátu.



Obr. 2. Lokality odberu pôdných vzoriek a pevných substrátov ako zdroja získaných environmentálnych kmeňov druhu *Aspergillus niger*.

Kmene sme izolovali kultivačnými metódami z určitého pôdneho typu pri navážke 10 g jemnozeme a riedení 10^{-4} . Kultiváciou 5 – 7 dní pri laboratórnej teplote 25 °C na viacerých živných pôdach (CD, SDA, MEA) sme získali zmesné kultúry. Z týchto zmesných kultúr sme opakovaním preočkovaním na nové živné pôdy (CDA, MEA a SDA) postupne kmene aspergilov prečistili a v čistom stave ich uchováваме na šikmom agare (CDA a SDA). Všetky kmene sú tiež deponované v zbierke mikroskopických vláknitých húb na Katedre pedológie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave a evidované pod rovnakým označením, ako je uvedené ďalej.

4.2 Molekulová analýza izolátov druhu *Aspergillus niger*

Všetky izoláty *Aspergillus niger* sme identifikovali tak na základe ich fenotypových znakov, t. j. makromorfologicky a mikromorfologicky, ako aj na základe genotypových znakov, t. j. využitím molekulových metód.

Každý druhu *Aspergillus niger* sme kultivovali v čistej kultúre v skúmavkách na živnej pôde SDA (HiMedia, Mumbai, India) pri laboratórnej teplote 25 °C. Následne sme pridali 10 ml konídií čistej kultúry rovnakého kmeňa do 50 ml živného roztoku SDB (HiMedia, Mumbai, India) v 250 ml Erlenmayerových bankách, ktoré sme uložili na trepačku Unimax 2010 (Heidolph, Schwabach, Nemecko). Tvorba peliet prebiehala pri otáčkach 150 za minútu. počas nasledovných 5 – 7 dní pri laboratórnej teplote 25 °C. Vytvorené pelety sme ďalej prefiltrovali a dôkladne premyli destilovanou vodou. Takto sme ich pripravili na ďalšie spracovanie. Následne sme z peliet izolovali DNA podľa priloženého protokolu v DNeasy Plant Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Genomickú analýzu sme urobili v spolupráci s Ústavom molekulárnej biológie SAV v Bratislave. Sekvencie ITS kmeňov sú deponované v GenBank pod prístupovými číslami MV739953 – MV739968 (ŠIMONOVICHOVÁ et al. 2021).

Izoláciu DNA z jednotlivých kmeňov duhu *Aspergillus niger* sme urobili pomocou DNeasy Plant mini purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) podľa návodu od výrobcu. Na RAMP-PCR sme podľa protokolu (PANGALLO et al. 2012) pripravili zmes obsahujúcu 2 U SuperHotTag DNA polymerázu (Bioron), 2.4 mmol-l MgCl₂, 200 µmol-l dNTP, 60 pmol mikrosatelitného primeru T14 (AAT GCC GCA G) a 60 pmol bežného primeru K7 (CAA CTC TCT CTC TCT), do ktorého sme nakoniec pridali DNA v množstve 50 – 100 ng. Program PCR pozostával z počiatočnej denaturácie pri 95 °C po dobu 5 minút, 30 cyklov (95 °C po dobu 45 s; 30 °C po dobu 60 s pri nábehu 0,1 °C s⁻¹ až 50 °C; 50 °C po dobu 60 s so stúpaním 0,1 °C s⁻¹ až 68 °C; 68 °C počas 90 s) a konečnej polymerizácie pri 68 °C počas 10 minút. Päť µL produktov RAMP-PCR bolo separovaných na 1,8 % agarózovom géli počas 4,5 hodiny pri 2,3 V cm⁻¹ v tlmivom roztoku TAE (Tris-acetát-EDTA). Gély sme zafarbili etídiumbromidom, vizualizovali sme ich pod UV svetlom a na záver sme urobili fotodokumentáciu.

Následne sme všetky kmene *Aspergillus niger* porovnali pomocou RAMP analýzy, kedy sa produkty PCR analyzujú elektroforézou v 1,5 % agarózovom géli (Seakem LE, FMC Bioproducts, Rockland, Maine, USA) 3 – 4 h, v roztoku TAE. Do gélu sme pridali etídiumbromid, ktorý umožnil PCR produkty následne zobrazit' pod UV svetlom. Výsledkom bol fotografický záber. Profily RAMP sme analyzovali pomocou softvéru

BioNumeric ver. 6 (Applied Maths, Kortrijk, Belgicko) pomocou Pearsonovej korelácie a UPGMA klastrovania (ŠIMONOVICHOVÁ et al. 2021).

4.3 Stanovenie biologického profilu kmeňov druhu *Aspergillus niger* systémom Biolog FF Microplate™

Stanovenie biologického profilu 16-tich kmeňov *Aspergillus niger* sme urobili na základe produkovaných metabolitov pomocou systému Biolog FF Microplate™ v Ostrave.

Rozdiely v produkcii metabolitov sme zisťovali pomocou testovacieho systému Biolog MicroStation (MicroLog3, ver. 4.20.05). Identifikačný systém MicroStation GEN III firmy Biolog (Biolog Inc., Hayward, USA) slúži na fenotypovú identifikáciu mikroorganizmov na základe ich biochemických profilov získaných zo súboru utilizačných testov (BOCHNER 2009).

Izolované kmene *Aspergillus niger* sme kultivovali v skúmavkách na šikmom 2 % MEA agare (HiMedia Laboratories, Mumbai, India) pri teplote 26 °C počas 5 – 7 dní. Konídie sme následne naočkovali do inokulačného roztoku (IF), ktorý je súčasťou setu Biolog FF Microplate a kmene sme upravili na odporúčanú hustotu 65 %, ktorú sme zmerali turbidimetrom. Suspenziu konídií s objemom 100 µl sme následne naočkovali na agarové platničky, ktoré obsahovali prednastavený súbor testovaných substrátov. Mikroplatničky sme inkubovali po dobu 72 – 168 h, a následne sme ich vyhodnotili systémom Biolog.

4.4 Stanovenie enzýmu lipáza

Lipázy (triacylglycerolové hydrolázy) patria medzi biokatalyzátory, ktoré uskutočňujú reakcie vo vodnom aj v nevodnom prostredí. Katalyzujú hydrolýzu a tiež syntézu acylglycerolov s dlhým reťazcom. Stanovenie lipázovej aktivity sme robili kultivačne na diagnostickej živnej pôde SBA (Himedia, Mumbai, India). Živná pôda je modrej farby a produkcia enzýmu lipáza vytvára tzv. halo efekt. Ide o odfarbenú zónu v podobe jedného alebo viacerých kruhov (KRAKOVÁ et al. 2012). Súčasne sme sledovali rast jednotlivých kmeňov *Aspergillus niger* a ich makromorfologické znaky na kontrolnej SDA živnej pôde. V obidvoch prípadoch sme kmene naočkovali do stredu Petriho misiek vždy v troch opakovaníach. Kultivácia prebiehala v termostate pri teplote 25 °C po dobu 5 dní. Produkciu enzýmu lipáza sme kontrolovali vizuálne každý druhý deň, kedy sme zaznamenávali rast kolónie a veľkosť odfarbenej zóny.

4.5 Kultivácia kmeňov druhu *Aspergillus niger* na stanovenie mykotoxínov

Environmentálne *Aspergillus niger* sme kultivovali na živnej pôde MEA (Himedia, Mumbai, India) v Petriho miskách (d = 9 cm, s hrúbkou média 0,5 cm) pri laboratórnej teplote 14 dní.

4.6 Tenkovrstvová chromatografia (SAMSON et al. 1989)

Z vyrastených kmeňov *Aspergillus niger* na Petriho miske sme korkovrtom vyrezali tri kruhové časti z kolónie (d = 1 cm) a tie sme postupne naniesli na TLC silikagélovú platňu (Merck TLC aluminium silica gel, 20 x 20 cm, Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko). Výrezy hubových kultúr sme nanášali z oboch strán platne oproti sebe, a to tak agarovou stranou (testovanie exotoxínov), ako aj mycéliovou stranou (biomasa, testovanie endotoxínov po aplikácii dvoch kvapiek extrakčnej zmesi (metanol/voda v pomere 80 : 20). Výrezy biomasy sme aplikovali po dvoch po sebe na to isté miesto. Na TLC platničkách ostali po výrezoch odtlačky potrebné na analýzu. Ako štandard (kontrolu) sme použili 10 µl roztoku grizeofulvínu (Sigma Aldrich, St. Louis, USA; 100 µg/ml chloroformu). Takto pripravené platne TLC sme nechali voľne vyschnúť a ďalej vyvíjať v TEF (toluén / etylacetát / kyselina mravčia (90 %) na strane exotoxínovej v pomere 5 : 4 : 1) a v CAP (chloroform / acetón / izopropanol, v pomere 85 : 15 : 20; všetky použité chemikálie v čistote p. a., Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko) na strane endotoxínovej vo vývíjacích kyvetách (Camag, Muttenez, Switzerland). Po vyvinutí oboch polovic platní sa tieto nechali spontánne vysušiť a vizualizovali sa mykotoxíny, ktoré sú známe v spektre extrolitov druhu *Aspergillus niger* (NIELSEN et al. 2020).

4.7 Dôkaz ochratoxínu A

OTA sme stanovili podľa postupu FILTENBORG et al. (1989). Vysušenú TLC platňu sme na tri minúty vložili do nádoby s výparmi NH₃ (Lachema, Brno, Česká Republika). Následne sme pozorovali jednotlivé škvrny pod UV svetlom (254 nm) v TLC kabine Camag TLC Visualizer (Camag, Muttenez, Switzerland). Škvry OTA majú modrozelenú fluorescenciu, škvrna grizeofulvínu modrú.

4.8 Dôkaz fuminizínu B1

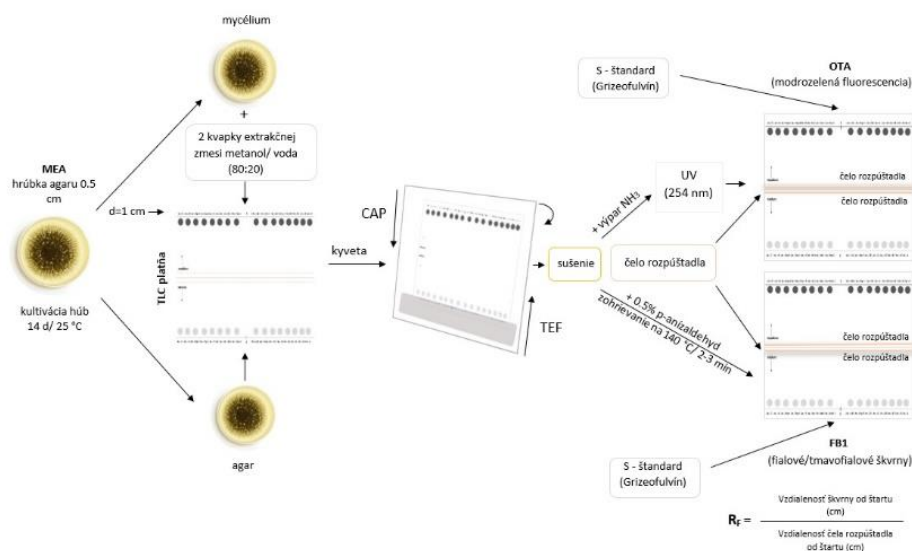
Fumonizín B1 sme stanovili podľa NELSON et al. (1993). Na povrch výrezov kmeňov *Aspergillus niger* sme pred aplikáciou na TLC platne kvapli roztok methanol / voda v pomere 80 : 20. Na elúciu TLC platní sme použili zmes chloroform / methanol / kyselina octová v pomere 6 : 3 : 1. Vysušené platne sme postriekali roztokom 0,5 % p-anízaldehydu v zmesi etanol / kyselina octová / kyselina sírová (17 : 2 : 1) (všetky použité chemikálie v čistote p. a., Merck KGaA Darmstadt, Nemecko) a zahriali ich na 140 °C po dobu 2 – 3 min. Fumonizín B1 sa zobrazí v tvare fialových až tmavofialových škvŕn, štandard v tvare modrých škvŕn.

4.9 Retenčný faktor RF

U pozorovaných škvŕn sme vypočítali retenčný faktor, ktorý potvrdzuje produkciu daného mykotoxínu porovnaním so štandardom grizeofulvínu v databáze týchto faktorov podľa autorov metódy (FILTENBORG et al. 1989, Nelson et al. 1993).

$R_F = \text{vzdialenosť škvŕny od štartu vyvíjania (cm)} / \text{čelo rozpúšťadla od štartu (cm)}$.

Schéma stanovenia mykotoxínov je graficky znázornená na Obr. 3.



Obr. 3. Schéma pracovného postupu skríningu *Aspergillus niger* na produkciu mykotoxínov metódou TLC.

4.10 Stanovenie organických kyselín u vybraných kmeňov druhu *Aspergillus niger*

Vyššie uvedené analýzy, resp. stanovenia sme robili so všetkými 16 kmeňmi *Aspergillus niger*. Následne sme na základe výsledkov týchto analýz vybrali štyri kmene, s ktorými sme pokračovali v ďalších experimentoch. Kmene sme vybrali naprieč škálou pH nasledovne: An-Š z ultra kyslého prostredia, An-P zo silne kyslého prostredia, An-Sl zo silne alkalického prostredia, kontrolný kmeň An-G zo slabo alkalického prostredia.

Kmene druhu *Aspergillus niger* sme na stanovenie organických kyselín kultivovali v živnom médiu SDB (Himedia, Mumbai, India). Suspenziu konídií *Aspergillus niger* sme v objeme 5 ml pridali do 95 ml SDB (konečné množstvo 100 ml). Ako kontrolnú vzorku sme použili 100 ml čistého SDB. Kultivácia kmeňov prebiehala v troch opakovaniach počas 10 dní pri laboratórnej teplote 25 °C. Počas kultivačnej doby sme stanovili pH živného média SDB v 2., 4., 6., 8. a 10. deň. Na stanovenie pH sme použili pH meter 3210 SET-2 (BRAND CITY, Weilheim, Nemecko). Po 10-dňovej kultivácii sme vytvorené mycélium dvakrát prefiltrovali cez modrý papierový filter KA 4 (BRAND CITY, Pernštejn, Česká republika). Na stanovenie organických kyselín sme oddelili 20 ml roztoku SDB.

Stanovenie organických kyselín sme robili v spolupráci s Ústavom geotechniky SAV v Košiciach. Organické kyseliny a bežné anorganické anióny vyskytujúce sa v živnom médiu sme zaznamenali ióniovým chromatografom Dionex ICS-5000 (Sunnyvale, Kalifornia, USA). Separácia analytov sa uskutočňovala v kolóne IonPac AS11–HC s použitím elektrolyticky generovanej gradientovej elúcie 1–30 mM KOH. Chromatografická metóda umožňuje dobré rozlíšenie jednotlivých aniónových druhov. Veľmi dobre rozlíšené sú aj píky na začiatku eluovania (glukonát, laktát a acetát).

4.11 Práškové formy a ich vplyv na tvorbu peliet

Oxid železitý a oxid kremičitý

V experimentoch sme použili jemné prášky oxidu železitého a oxidu kremičitého s veľkosťou častíc menšou ako jeden mikrometer (Sigma–Aldrich). Čistota Fe₂O₃ bola vyššia ako 97,0 % a čistota SiO₂ bola na úrovni 99,0 %. Oba údaje sú vyjadrené v hmotnostných percentách.

Ílový minerál

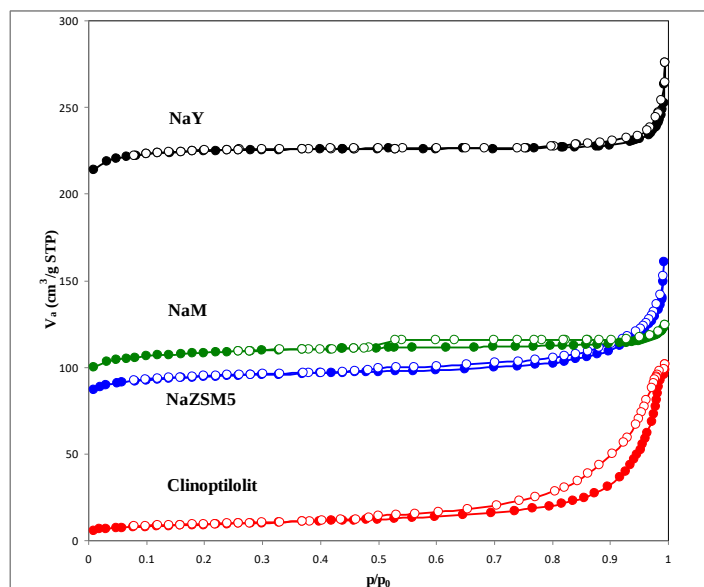
Montmorillonit použitý v tejto štúdii bol získaný sedimentačnou metódou zo 4 % vodnej suspenzie bentonitu z najznámejšej slovenskej lokality Stará Kremnička – Jelšov

Potok. Bentonit z tejto lokality obsahuje vápenato-horečnatý montmorillonit. Hlavná časť montmorillonitu bola obsiahnutá v časticiach menších ako 2 μm (JESENÁK 1994, 2005, JESENÁK et HLAVATÝ 2000).

Zeolity

V experimentoch sme použili štyri druhy syntetických zeolitov: Na-mordenit ($\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3 = 17,5$), NaY ($\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3 = 4,5$) a Na-ZSM-5 ($\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3 = 28,5$) a jednu vulkanickú zeolitovú horninu (zeolitový tuf) z najznámejšieho a priemyselne aj najviac využívaného slovenského ložiska v Nižnom Hrabovci na východnom Slovensku. Mineralogické zloženie tufu bolo nasledovné: 84 % klinoptilolitu, 8 % krystobalitu, 4 % illitu a 3 až 4 % plagioklasu. Chemické zloženie klinoptilolitu v zeolitovom tufe vyjadruje vzorec $(\text{Ca}, \text{K}_2, \text{Na}_2, \text{Mg})_4 (\text{Al}_8\text{Si}_{40}\text{O}_{96}) \cdot 24 \text{H}_2\text{O}$ (HOLUB et al. 2016).

Všetky zeolity boli použité vo forme jemného prášku s veľkosťou častíc menšou ako 5 μm . Textúrne charakteristiky vnútornej pórovitej štruktúry zeolitov boli určené metódou adsorpcie dusíka pri teplote -196°C prístrojom ASAP 2400 (Micromeritics, Bedfordshire, Veľká Británia). Pred meraním boli vzorky zeolitov počas noci zahrievané na 350°C a evakuované na rovnovážny tlak 2 Pa. Adsorpčné izotermy všetkých syntetických zeolitov (Obr. 4) sa vyznačujú širokým horizontálnym plató reprezentujúcim adsorpciu na vonkajšom povrchu zeolitových kryštálov.



Obr. 4. Adsorpčné izotermy zeolitov. Na obrázku je termínom „clinoptilolit“ označený zeolitový tuf z Nižného Hrabovca s obsahom klinoptilolitu.

Táto adsorpcia spolu s desorpciou nevykazuje na izotermách takmer žiadnu hysterézu. Izotermy potvrdzujú, že ide o typické mikropórovité látky. Výnimkou v súbore izoteriem zeolitov je izoterma zeolitového tufu, ktorá vykazuje pomerne výraznú hysterézu v oblasti vyšších relatívnych tlakov. Tá poukazuje na vysoké zastúpenie mezopórov a v menšom rozsahu aj makropórov.

V tabuľke 2 sú uvedené textúrne charakteristiky všetkých zeolitov. Z nej vyplýva, že špecifické povrchy všetkých syntetických zeolitov sú vysoké a pohybujú sa v rozsahu 285 m²/g (u NaZSM-5 zeolitu) až 668 m²/g (u NaY zeolitu). Špecifický povrch prírodného zeolitového tufu je približne desať- až dvadsaťkrát nižší ako u syntetických zeolitov. Kým u syntetických zeolitov je interakčný povrch tvorený povrchom mikropórov a externým povrchom kryštálov zeolitu, u zeolitového tufu je tento povrch zanedbateľný. Hlavnú časť jeho povrchu reprezentujú mezopóry v rozsahu 5 nm až 50 nm.

Tabuľka 2. Textúrne charakteristiky zeolitov.

	S _{BET}	V _{micro}	S _t	V _a	D _p
	m ² /g	cm ³ /g	m ² /g	cm ³ /g	nm
NaM	360	0,147	42,9	0,182	-
NaY	668	0,332	38,1	0,384	-
NaZSM-5	285	0,128	40,7	0,217	-
Zeolitový tuf	30.6	0,003	24,0	0,153	15, 38

Legenda: S_{BET} – špecifický povrch; V_{micro} – špecifický objem mikropórov; S_t – veľkosť externého povrchu; V_a – celkový objem pórov; D_p – veľkosť mezopórov.

4.12 Príprava peliet a stanovenie ich veľkosti v prostredí s ílovými minerálmi

Pelety sme pripravovali nasledovne: 5 ml vodnej suspenzie konídií sme pridali zo zásobného roztoku, pre každý kmeň *Aspergillus niger* samostatne, do 45 ml kultivačného SDB média (Himedia, Mumbai, India). Následne sme do kultivačného média pridali 1 g testovanej práškovej látky (ílového minerálu). Kultivácia prebiehala 5 dní pri laboratórnej teplote 25 °C v 250 ml v Erlenmayerových bankách na trepačke Unimax 2010 (Heidolph, Schwabach, Nemecko) pri frekvencii 150 otáčok za minútu. Po ukončení experimentu sme vytvorené pelety prefiltrovali, premyli destilovanou vodou a vložili do Petriho misiek, v ktorých sme ich spočítali a stanovili ich veľkosť pomocou mriežky z milimetrového papiera.

Makromorfologickú štruktúru peliet sme zachytili pomocou digitálneho fotoaparátu Canon IXUS 16.1 megapixelov. Mikromorfologickú štruktúru sme sledovali v kvapke

kyseliny mliečnej s bavlíkovou modrou (0,01 %) optickým mikroskopom AxioScope A1 Carl Zeiss Jena. Ďalšie mikroskopické snímky zaznamenané na stereomikroskope Leica M165 FC, digitálna kamera Olympus DP 72, (softvér Quick Photo Micro v. 3.0, Olympus) sme urobili na katedre Fyziológie rastlín PriF UK, ktoré nám pomohol spracovať Mgr. Michal Martinka, PhD.

Veľkosť peliet sme stanovovali v destilovanej vode v Petriho miske. Počet peliet na miske sa v závislosti na ich veľkosti pohyboval v rozsahu niekoľkých jednotiek až po približnú hranicu 1000 v prípade najmenších peliet. Vo všetkých prípadoch bol v peletách kumulovaný celý hmotnostný podiel biomasy reprezentovanej mikroskopickými vláknitými hubami. Veľkosť peliet bola zistená z fotografického záznamu doplneného pravouhlým čiarovým rastrom so známou vzdialenosťou rozostupu čiar bez použitia softvéru obrazovej analýzy.

Počet konídií sme tiež stanovovali v Bürkerovej komôrke, a to nasledovne: zo zriedeného kultivačného média (1 : 100), ktoré sme si pripravili na kultiváciu peliet, sme Pasteurovou pipetou odobrali suspenziu konídií a naniesli na podložné sklíčko do počítacej Bürkerovej komôrky. Po prekrytí krycím sklíčkom sme konídie spočítali pod mikroskopom (AxioScope A1 Carl Zeiss Jena). Konečný počet konídií sme vypočítali na základe vzorca (KOŽURKOVÁ 2011):

$$\text{počet konídií} = X * 250\,000 * R$$

X = aritmetický priemer počtu konídií na ploche štvorcov komôrky

R = riedenie

5. VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Pôdy a substráty – zdroj kmeňov *Aspergillus niger*

Všetky environmentálne kmene *Aspergillus niger*, s ktorými sme pracovali, sme postupne izolovali z rôznych pôdných typov, z riečnych sedimentov na nižšie uvedených lokalitách alebo z pevných substrátov. Klasifikáciu pôdných typov sme upravili podľa SOCIETAS PEDOLOGICA SLOVACA (2014). Niektoré kmene sme tiež získali v rámci spolupráce. Charakteristiku lokalít, resp. miesta odberov pôdných vzoriek a substrátov uvádzame podľa pôdnej reakcie, hodnoty ktorej sme zoradili od ultra kyslej až po veľmi silne alkalickú, a tak vytvorili poradie vzoriek od 1 do 16 (Tab. 3).

Kmeň 1 (An-Š)

Lokalita Šobov pri Banskej Štiavnici (Obr. 5a – c). Na tejto lokalite sa nachádza lom, kde sa stenovým spôsobom od r. 1953 ťažil sekundárny kremenec (HRUŠKOVIČ 1971) a postupne spolu s ťažbou vznikala aj halda odpadového materiálu z lomu. Haldu tvorí nevytriedený nespevnený materiál, ktorý je dobre priepustný pre vodu a vzdušný kyslík, čím následne dochádza k oxidácii horninového materiálu. Významnú úlohu pri oxidácii sulfidov zohrávajú acidofilné baktérie. Najdôležitejším procesom je oxidácia pyritu, pri ktorej vzniká kyselina sírová. Tá následne podmieňuje migráciu toxických prvkov, pôvodne viazaných v kryštalickej štruktúre pyritu, a rozkladá štruktúru ílových minerálov. Od vzniku haldy sa znečistenie do okolia šírilo aj kyslou banskou vodou, ktorá z lomu a haldy vytekala ako oplachová dažďová voda obohatená o SO_4^{2-} a ďalšie prvky z rozpustených síranov (FRANKOVSKÁ et al. 2010). Jej vplyvom sa na svahu Šobova následne vytvorila rýha (Obr. 5a), ktorá rozdelila pôvodný lúčny porast na územie acidifikované a erodované (Obr. 5b). Acidifikácia územia sa však šírila ďalej a postupne dochádzalo k erózii väčšej časti územia (Obr. 5c). V tomto období (r. 2008) sme na Šobove odoberali pôdne vzorky. Kmeň *Aspergillus niger* sme izolovali z územia, ktoré bolo negatívne ovplyvnené kyslou a mineralizovanou vodou vytekajúcou spod haldy pyritizovaného hlušínového materiálu. Pôdnym typom je kambizem kultizemná var. kontaminovaná forma erodovaná bez vegetácie. Pôda je ultra kyslá (pH 3,0) so zvýšeným obsahom hliníka 506 mg/kg a s minimom organických látok (Tab. 3).



Obr. 5. Rýha vytvorená vytekajúcou AMD (a). Pôdny typ pod lúčnym porastom vpravo na obr. b je kambizem kultizemná var. nasýtená, v strede je kambizem kultizemná var. kontaminovaná a vľavo je kambizem kultizemná var. kontaminovaná forma erodovaná. Erodované územie svahu Šobova (c). (A. Šimonovičová, archív).

Kmeň 2 (An-N)

Uhoľné ložisko na lokalite Nováky (Obr. 6a, b) vyplňa časť hornonitrianskej kotliny južne od mesta Prievidza na ploche 37 km² (HRONČEK et HERČKO 2014).



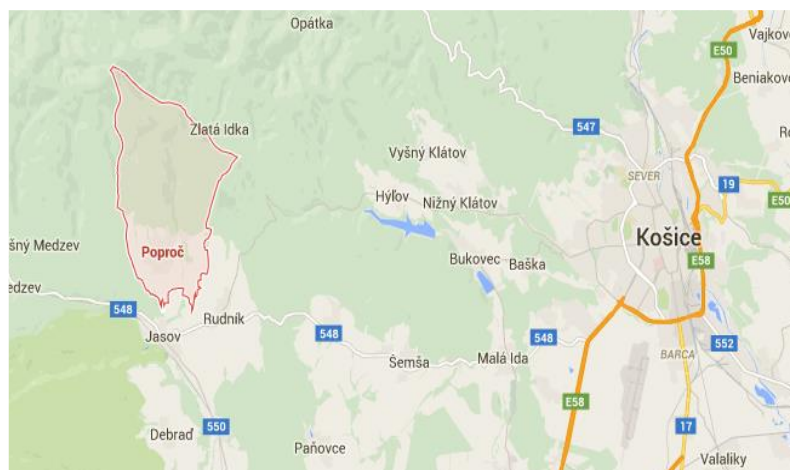
Obr. 6. Areál bane Nováky s haldou vyťaženého uhlia v r. 2008 (6a), areál závodu 2012 (6b). (A. Šimonovičová, archív).

Kmeň *Aspergillus niger* sme izolovali z uhoľného prachu z areálu závodu (Obr. 6a). Substrát je ultra kyslý (pH 3,32) s vysokým obsahom organického materiálu (% C_{ox} 39), ale aj s nadlimitným množstvom arzenu a zinku (Tab. 3), ktorý stanovuje zákon (ZBIERKA ZÁKONOV 2014).

Kmeň 3 (An-Pop 4)

Lokalita Poproč sa nachádza v Petrovej doline, vo východnej časti Slovenska medzi mestami Smolník a Košice, a spadá do katastra obce Poproč (Obr. 7). Na území negatívne

ovplyvnenom bývalou banskou činnosťou sa dnes nachádzajú skládky vytŕaženého materiálu, haldy a odkaliská, ktoré vznikli po ťažbe a úprave antimónu. Na ložisku antimónových rúd v Poproči prebiehala ťažba od roku 1938 do roku 1965 (BLAHOVCOVÁ 2016).



Obr. 7. Lokalita obce Poproč (<https://www.google.sk/maps>), BLAHOVCOVÁ (2016).

Kmene pochádzajúce z tejto lokality sme izolovali zo štyroch rôznych vzoriek. Kmeň označený ako An-Pop 4 sme izolovali z technozeme iniciálnej, ktorá je extrémne kyslá (pH 3,85) a obsahuje minimum organického materiálu (% C_{ox} 0,1). Na druhej strane, obsah arzénu, antimónu, zinku, medi a iných prvkov prekračuje limitné hodnoty.

Kmeň 4 (An-Pop 1)

Kmeň An-Pop 1 sme izolovali z rankra, ktorý má veľmi silne kyslú pôdnu reakciu (pH 4,52). Aj v tejto pôdnej vzorke boli stanovené nadlimitné hodnoty potenciálne toxických prvkov a ťažkých kovov (Tab. 3).

Kmeň 5 (An-P)

Lokalita Pezinok – Kolársky vrch (Obr. 8a, b). Na tejto lokalite sa ťažil antimón s najväčším rozsahom ťažby v rokoch 1855 – 1896. V r. 1991 bola ťažba ukončená. Negatívny dopad banskej činnosti sa prejavil na kontaminácii pôd, vôd a riečnych sedimentov. Kmeň *Aspergillus niger* sme izolovali z riečného sedimentu potoka Blatina, ktorý má silne kyslú pôdnu reakciu (pH 5,25), dostatočné množstvo organickej hmoty a nadlimitné hodnoty najmä arzénu a zvýšené hodnoty viacerých ťažkých kovov (Tab. 3).



Obr. 8. Výtok AMD z odkaliska (a) a riečny sediment potoka Blatina (b). (A. Šimonovičová, archív).

Kmeň 6 (An-Sm)

Tento kmeň sme izolovali z lokality Smolník. Ložisko Smolník sa nachádza v Spišsko-gemerskom rudohorí, medzi Smolníckou Hutou a Smolníkom. Nachádza sa tu stará banská lokalita, kde sa v 13. A 14. storočí ťažila strieborná a medená ruda. Poslednú tonu rudy vyťažili v roku 1989. V roku 1991 sa bane uzatvorili a v roku 1994 zatopili. Ruda, ktorá sa nachádzala v okolí Smolníka, obsahovala vysoký podiel pyritu a odhaduje sa, že v zatopených baniach a haldách je ešte asi 6 miliónov ton pyritu (JESENÁK 2010). V dôsledku toho vytekajú z baní AMD so zvýšeným obsahom hliníka, vápnika, medi, horčíka, zinku a síranových aniónov. Veľký vplyv na zloženie banských vôd má aj oxidácia pyritu, ktorou dochádza k vzniku kyseliny sírovej, čo napomáha vylúhovaniu medi a iných prvkov. Acidita vôd je zvyšovaná aj biologicko-chemickou oxidáciou pyritu a sulfidickej síry činnosťou bakteriálnych druhov z rodu *Acidithiobacillus* a *Leptospirillum* (ŠIMONVIČOVÁ et al. 2013c).

Kmeň *Aspergillus niger* sme izolovali z riečneho sedimentu potoka Smolník, do ktorého vytekajú AMD zo zatopenej šachty Pech. Tieto vody sa zachytávajú najprv v bazéne (Obr. 9a) a z neho následne vytekajú priamo do potoka a vodným tokom sa dostávajú až do priehrady Ružín (Obr. 9b).



Obr. 9. Záchytný bazén s AMD vytekajúcej zo šachty Pech (a), riečny sediment potoka Smolník (b). (A. Šimonovičová, archív).

Riečny sediment má silne kyslú pôdnu reakciu (pH 5,4) a obsahuje veľmi malé množstvo organickej hmoty. Na druhej strane však obsahuje nadlimitné hodnoty horčíka, železa, mangánu, hliníka, medi, zinku aj kadmia (Tab. 3).

Kmeň 7 (An-Kmi)

Lokalitou pôvodu tohto kmeňa je úpätie vrchu Kýčera v Belianskych Tatrách. Pod porastom bučiny s javorom s prímiesou jedle a podrastom tráv sa nachádza pôdny typ kambizem pararendzinová, hlinitá, stredne skeletnatá, vyvinutá zo zvetralín silikátovo-karbonátových zlepcov a brekcií (BEDRNA et al. 2010). Z tohto pôdneho typu, ktorý má stredne kyslú pôdnu reakciu (pH 5,4) a veľmi nízky obsah organickej hmoty, sme izolovali kmeň *Aspergillus niger* (Tab. 3). Výskyt ťažkých kovov, resp. toxických prvkov, sme neštudovali.

Kmeň 8 (An-Pop 5).

Kmeň označený ako Pop 5 sme izolovali z technozeme iniciálnej so stredne kyslou pôdnou reakciou (pH 6,05), veľmi nízkym obsahom organického materiálu a nadlimitnými hodnotami potenciálne toxických prvkov a ťažkých kovov na lokalite Poproč (Tab. 3).

Kmeň 9 (An-L18)

Lokalita, z ktorej pochádza uvedený kmeň, sú Lagúny Ostrava v mestskej časti Moravská Ostrava, v Českej republike (Obr. 10).



Obr. 10. Lagúny Ostrava, miesto odberu kmeňa An-L18. (H. Vojtková, archív).

Lagúny zaberali plochu takmer 7 ha. Tieto nebezpečné skládky odpadu vznikali z rafinárskej výroby koncom 19. storočia. Od roku 1965 sa tu ukladal odpad vznikajúci pri procesoch regenerácie mazacích olejov z podniku OSTRAMO Ostrava. Po zmenepodniku na súkromnú firmu OSTRAMO-Vlček a spol., s. r. o. v roku 1992 sa tu ukladali odpady z ďalších priemyselných procesov v Ostrave, predovšetkým z chemickej výroby. Prevádzka skládky bola oficiálne zastavená až v roku 1996 (FEKETEOVÁ et al. 2017; VOJTKOVÁ 2014).

Kmeň 10 (An-Pop 3)

Kmeň označený ako Pop 3 bol izolovaný z pôdneho typu ranker so slabo alkalickou pôdnou reakciou (pH 7,45), nízkym obsahom organických látok a nadlimitným množstvom antimónu, zinku a arzenu (Tab. 3) na lokalite Poproč.

Kmeň 11 (An-ZK)

Na lokalite Zemianske Kostol'any sa nachádza odkalisko, kde je deponovaný elektrárenský popolček. Odkalisko sa začalo formovať v roku 1953, keď došlo k výraznej kontaminácii pôd polietavými popolmi v oblasti elektrárne v Zemianskych Kostol'anoch. V roku 1965 sa následkom intenzívnych dažďov pretrhla základňa hrádze odkaliska, kde sa skladoval popolček z tepelnej elektrárne Nováky a približne 3 milióny ton sa ho vylialo do okolia. Neskôr sa celé územie prekrylo navozenou zeminou. Dnes sa tu pasie dobytok a pôda je tiež obrábaná (FEKETEOVÁ et al. 2017).



Obr. 11. Technozem iniciálna (a) pod lúčnym porastom a vrstva popola (b) prekrytá zeminou. (A. Šimonovičová, archív).

Na tejto lokalite sme kmeň *Aspergillus niger* izolovali z vrstvy popola, ktorá je prekrytá navozenou zeminou (Obr. 11a, b). Vrstva popola má slabo alkalickú pôdnu reakciu (pH 7,51), je chudobná na organickú hmotu, ale obsahuje nadlimitné množstvo arzenu a iných ťažkých kovov a potenciálne toxických prvkov (Tab. 3).

Kmeň 12 (An-G)

Lokalita Gabčíkovo, v čase odberu pôdnej vzorky, predstavovala hospodársky lužný les v inundačnom území medzi hlavným tokom Dunaja a derivačným kanálom.

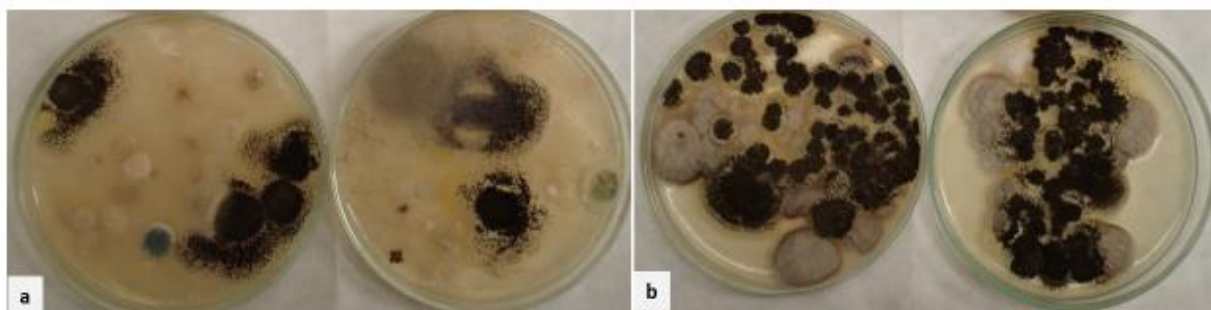


Obr. 12. Rastlinné spoločenstvo *Salici-Populetum*, jarný aspekt (a) a letný aspekt (b). Miesto odberu vzorky kmeňa An-G. (A. Šimonovičová, archív).

Rastlinné spoločenstvo *Salici-Populetum* tvorili vysadené a človekom udržiavané monokultúry topolových a vrbových porastov (Obr. 12a, b). Ťažba drevnej hmoty sa začala po roku 2000 (ŠIMONVIČOVÁ et ĎUGOVÁ 2008). Kmeň *Aspergillus niger* sme izolovali z fluvizeme var. nasýtená, ktorej pôdna reakcia je slabo alkalická (pH 7,7). Podobne ako pri vzorke 7 (kmeň An-Kmi) ani v tomto prípade sme nepredpokladali výskyt ťažkých kovov, resp. toxických prvkov v pôde, a preto sme analýzu tohto typu nerobili.

Kmeň 13 (An-KD) a kmeň 14 (An-KF)

Oba kmene sme izolovali zo vzoriek, ktoré pochádzajú z Kuvajtu z r. 2009. V tom čase na našom pracovisku dvaja pracovníci z Kuwajt Oil Company (závod na ťažbu a spracovanie ropy) absolvovali bakalárske štúdium a každý z nich si doniesol svoju vlastnú pôdnu vzorku na mykologické vyšetrenie. Kmeň *Aspergillus niger*, označený ako An-KD (Obr. 13a) sme izolovali zo vzorky pochádzajúcej z púšte (D ako „desert“). Je to vzorka so stredne alkalickou pôdnou reakciou (pH 8,25). Lokalitou je pravdepodobne oáza nového typu, ktorá mala byť refúgiom pre živočíchy a rastliny v púšti. Kmeň An-KF (obr. 13b) bol izolovaný zo vzorky pochádzajúcej z farmy (F ako „farm“). Je to vzorka so silne alkalickou pôdnou reakciou (pH 8,49).



Obr. 13. Kmeň An-KD (a), a kmeň An-KF (b), ktoré sme získali preočkovaním a vyčistením zo zmesných vzoriek. (A. Šimonovičová, archív).

Na mikrobiologické spracovanie mali k dispozícii veľmi malé množstvo materiálu, nebolo preto možné dať urobiť aj chemickú analýzu na stanovenie ťažkých kovov, resp. potenciálne toxických prvkov. Kontamináciu v týchto vzorkách je však možné s veľkou pravdepodobnosťou predpokladať, pretože v r. 1930 bola v Kuvajte objavená ropa, a tak sa základom ekonomiky štátu a hospodárstva stala práve ťažba ropy, jej spracovanie a vývoz. Ako uvádza CHO et al. (1997), v kuvajtskej púšti zostáva obrovské množstvo pôdy kontaminovanej ropou, ktorá znečisťuje podzemné vody.

Kmeň 15 (An-SI)

Oblasť Sloviniek je známa výskytom viacerých rudných žíl, kde niekoľko storočí prebiehala intenzívna banská činnosť. Nad obcou sa nachádza odkalisko, ktoré je výškou hrádze 113 m najväčšie na Slovensku (Obr. 14a, b). Na tomto odkalisku sa ukladal flotačný kal zo spracovania siderit-sulfidických rúd a neskôr struska z Kovohút Krompachy. Deponovaný minerálny odpad pochádza najmä z flotácie sideritovej rudy a je tu uložený vo forme flotačných pieskov (Obr. 14c) (TÓTH et al. 2014).



Obr. 14. Odkalisko Sloviniek s deponovaným flotačným kalom (a) je vegetáciou osídlené iba sporadicky (b), flotačné piesky tvoria veľmi tvrdý a pevný substrát (c). (A. Šimonovičová, archív).

Kmeň sme izolovali z technozeme iniciálnej, ktorá má silne alkalickú pôdnu reakciu (pH 8,6), obsahuje minimálne množstvo organických látok, ale nadlimitné množstvá arzénu, medi, zinku, olova, mangánu a kadmia (Tab. 3).

Kmeň 16 (An-A)

Kmeň *Aspergillus niger* označený ako An-A bol izolovaný z povrchu syntetického adamitu $[Zn_2(AsO_4)(OH)]$ a získali sme ho, podobne ako kmeň An-L18, v rámci spolupráce s VŠB-Technickou Univerzitou Ostrava.

Ako uvádzame v Tab. 3, pracovali sme s viacerými kmeňmi *Aspergillus niger*, ktoré sme postupne izolovali z rôzneho prostredia naprieč takmer celou škálou pH, okrem prostredia so slabou kyslou a veľmi silne alkalickou reakciou, a tiež s rôznou kontamináciou, ktorá predstavuje výraznú environmentálnu záťaž.

Tabuľka 3. Kmene *Aspergillus niger* zoradené podľa rozsahu hodnôt pôdnej reakcie (pH) izolované z pôd a substrátov a ich chemická charakteristika.

Poradie vzoriek	Rozsah pH hodnôt (Čurlík et al. 2003)	Kmene An	Pôdy a substráty uvedených lokalít a ich chemická charakteristika	PCR analýza	Literatúra
1.	< 3,5 ultra kyslé	An-Š	Banská Štiavnica – Šobov; kambizem kultizemná var. kontaminovaná forma erodovaná; bez vegetácie; pH 3,0; %C _{ox} 0,49; *Al 727–506 mg/kg	AM270051 99,6%	Šimonovičová et al. 2013, 2019
2.		An-N	Nováky; uhoľný prach; pH 3,32; %C _{ox} 39; *As 400 mg/kg; Mn 302,4 mg/kg; *Zn 21,4 mg/kg	AM270051 99,8%	Šimonovičová et al. 2013
3.	3,5 – 4,4 extrémne kyslé	An-Pop 4	Poproč; technozem iniciálna; pH 3,85; %C _{ox} 0,1; *As 25 mg/kg; *Sb 5825 mg/kg; *Zn 150 mg/kg; *Cu 60 mg/kg; Pb 70 mg/kg; Hg 0,5 mg/kg	KX901281 100%	Šimonovičová et al. 2019
4.	4,5 – 5,0 veľmi silne kyslé	An-Pop 1	Poproč; ranker; pH 4,52; %C _{ox} 2,62; *As 25 mg/kg; *Sb 1022 mg/kg; *Zn 150 mg/kg; Cu 60 mg/kg; Pb 70 mg/kg; Hg 0,5 mg/kg	KX253667 100%	Šimonovičová et al. 2019
5.	5,1 – 5,5 silne kyslé	An-P	Pezinok; riečny sediment potoka Blatina; pH 5,25; %C _{ox} 7,2; *As 363 mg/kg; Sb 93 mg/kg; Fe 82,8 mg/kg;	AM270051 99,8%	Šimonovičová et al. 2013
6.		An-Sm	Smolník; riečny sediment; pH 5,4; %C _{ox} 0,7; *Mg 344 mg/l; *Fe 463 mg/l; *Mn 36,5 mg/l; *Al 107 mg/l; *Cu 3263 µg/l; *Zn 12600 µg/l; *Cd 15 µg/l	AM270051 100%	Šimonovičová et al. 2013b, 2019
7.		An-Kmi	kambizem pararendzinová hlinitá na úpätí kopca Kýčera v Belianskych Tatrách; pH 5,4; %C _{ox} 0,4	KY657577 100%	Bedrna et al. 2010
8.	5,6 – 6,0 stredne kyslé	An-Pop 5	Poproč; technosol iniciálna; pH 6,05; %C _{ox} 0,14; *As 200 mg/kg; *Sb 2099 mg/kg; *Zn 200 mg/kg; Cu 70 mg/kg; *Pb 115 mg/kg; Hg 0,75 mg/kg	KY657577 100%	Šimonovičová et al. 2019
6,1 – 6,5 slabokyslé			bez vzorky		
9.	6,6 – 7,3 neutrálna	An-L18	Lagúny Ostrava, ČR; kaly z rafinácie ropy a iného chemického spracovania; pH 6,85; NEL 201 000 mg/kg; PAH C ₁₀ –C ₄₀ 121 000 mg/kg; *Cr 182 mg/kg; *Cu 2 102 mg/kg; *Zn 6 946 mg/kg; *Ba 3 652 mg/kg; *Pb 4 066 mg/kg	KU702453 100%	Šimonovičová et al. 2021 (in press)
10.	7,4 – 7,8 slabo alkalické	An-Pop 3	Poproč; ranker; pH 7,45; %C _{ox} 0,91; *As 25 mg/kg; *Sb 12200 mg/kg; *Zn 150 mg/kg; Cu 60 mg/kg; Pb 70 mg/kg; Hg 0,5 mg/kg	KX426976 100%	Šimonovičová et al. 2019
11.		An-ZK	Zemianske Kostolany; vrstva popola; pH 7,51; %C _{ox} 1,38; *As 634 µg/g; Zn 47 µg/g; Hg 0,47 µg/g	KF031033 100%	Šimonovičová et al. 2019
12.		An-G	fluvizem var. nasýtená z lužného lesa v Gabčíkove; pH 7,7; %C _{ox} 2,7	AM270051 100%	Šimonovičová et al. 2013
13.	7,9 – 8,4 stredne alkalické	An-KD	Kuvajt; pôdna vzorka z púšte; pH 8,25	KX253667 100%	Šimonovičová et al. 2021 (in press)
14.	8,5 – 9,0 silne alkalické	An-KF	Kuvajt; pôdna vzorka z farmy; pH 8,49	KX253667 100%	Šimonovičová et al. 2021 (in press)
15.		An-SI	Slovinky; technozem iniciálna; pH 8,6; %C _{ox} 0,8; *As 511 mg/kg; *Cu 8186 mg/kg; *Zn 25108 mg/kg; *Pb 2964 mg/kg; *Mn 2647 mg/kg; *Cd 8,76 mg/kg	KF031033 100%	Šimonovičová et al. 2019
6,1 – 6,5 slabokyslé			bez vzorky		
16.		An-A	syntetický adamit [Zn ₂ (AsO ₄)(OH)]	KX426976 100%	Kolenčík et al. 2017

Legenda: *prekročenie limitných hodnôt prvkov; NEL = nepolárne extrahovateľné látky; PAH = polyaromatické uhľovodíky, uhľovodíky C₁₀ – C₄₀ sú indikátorom znečistenia ropou a predstavujú množstvo extrahovateľných nepolárnych uhľovodíkov ropy a ropného pôvodu s 10 až 40 uhlíkmi na molekulu obsiahnutých v matici.

Výskyt mikroorganizmov v prostredí environmentálnych záťaží a extrémne stresových podmienok vedie autochtónnu mikrobiotu k výraznej adaptabilite, čo dáva predpoklad k jej následnému využitiu v priemyselí, a tiež rôznych bioremediačných procesoch (JOSHI et al. 2011).

Štúdium environmentálnych kmeňov, v zahraničnej literatúre často označovaných ako tzv. wild type strains (divé kmene), sa často uprednostňuje pred ich modifikáciou v laboratóriu, kedy sa používa napr. pôsobenie UV svetla, prudké zmrazenie a opätovné rozmrazenie, aplikácia vysokých koncentrácií ťažkých kovov a potenciálne toxických prvkov a pod. Mikroskopické vlákňité huby a ich kmene izolované z extrémneho pôdneho prostredia, ako je napr. ultra kyslá pôdna reakcia, alebo naopak, veľmi silne alkalická pôdna reakcia, vysoká koncentrácia ťažkých kovov a pod., môžu byť potenciálni producenti nových biologicky aktívnych látok, ako sú napr. antibiotiká (CHÁVEZ et al. 2015), enzýmy (GUIMARÃES et al. 2007), alebo iné látky, ktoré môžu mať využitie ako molekulové biomarkery na budúcu detekciu *Aspergillus niger* (COSTA et al. 2016).

5.2 Molekulová analýza kmeňov *Aspergillus niger*

Identifikácia a klasifikácia druhu *Aspergillus niger* je založená najmä na fenotypických a mikroskopických znakoch. V posledných desaťročiach sa okrem toho používajú aj molekulové metódy, ako napr. chemotoxická charakterizácia (GUPTA 2016). Molekulové techniky, najmä metóda polymerázovej reťazovej reakcie, spôsobili doslova revolúciu v molekulovej biológii a v molekulovej diagnostike organizmov (GHERBAWY et VOIGT 2010). Polymerázová reťazová reakcia (PCR) je základná metóda molekulovej biológie, ktorá slúži na amplifikáciu (zmnoženie) molekúl DNA v laboratórnych podmienkach využívajúc enzým DNA-polymerázu a synteticky pripravené oligonukleotidy. PCR je exponenciálna reakcia a teoreticky je možné aj z jedinej molekuly DNA vytvoriť ľubovoľné množstvo jej kópií. Vzniknutý PCR-produkt je základom pre nasledujúce molekulovo-genetické analýzy (MULLIS 1990).

Všetky kmene čiernych aspergilov, s ktorými sme pracovali, sme potvrdili PCR analýzou ako *Aspergillus niger*. U kmeňa An-Š sa potvrdila podobnosť 99,6 % (vzorka 1), u kmeňov An-N a An-P 99,8 % (vzorka 2 a 5). U všetkých ostatných kmeňov sa potvrdila zhoda 100 %. Ukážku vyhodnotenia PCR analýzy dokumentuje Tab. 4.

Tabuľka 4. PCR analýza testovaných kmeňov čiernych aspergilov (ukážka vyhodnotenia).

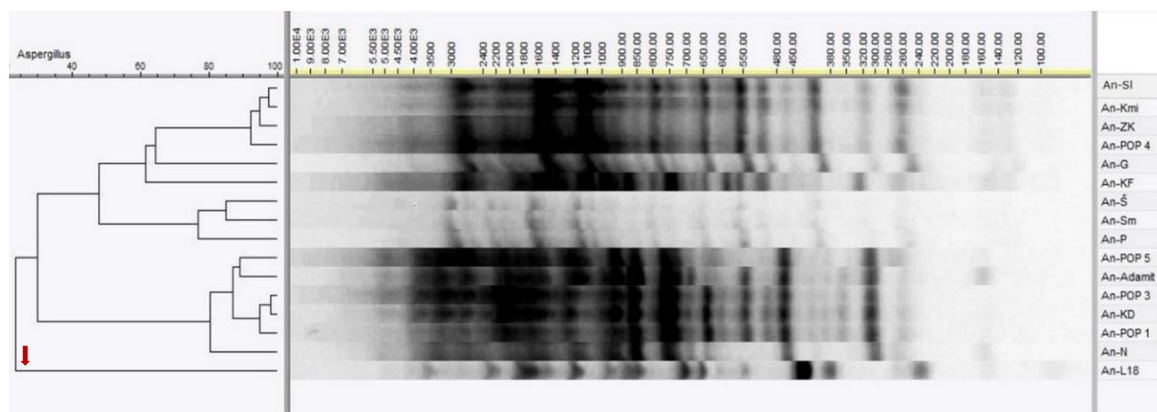
kmeň	podobnosť	Sekvencia nukleotidov
An-Kmi	KY657577.1 <i>Aspergillus niger</i> 524/524 (100%)	CCTCCCATCCGTGTCTATTGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGC CCGCCGCTTGTTCGGCCGCCGGGGGGGGCGCCTCTGCCCCC GGGCCCGTGCCCGCCGAGACCCCAACACGAACACTGTC TGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTA AAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGA AGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGA ATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCC CCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGC TGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCC TCTCCGGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGCGGCACCG CGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACATGCTCT GTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACCATTC TTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA ACTTAA
An-Pop 1	KX253667.1 <i>Aspergillus niger</i> 518/518 (100%)	ATCCGTGTCTATTATACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCC GCTTGTTCGGCCGCCGGGGGGGGCGCCTTTGCCCCCGGGCC CGTGCCCGCCGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAA GCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAACT TTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAAC GCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCA GTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGG TATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCC TCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCC GGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGCGGCACCGCGTCC GATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACATGCTCTGTAGG ATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACCATTTTTTCC AGGTTGACCTCGGATCAGGT AGGGATACCCGCTGAACTTAA
An- Pop 3	KX426976.1 <i>Aspergillus niger</i> 527/527 (100%)	CCACCTCCCATCCGTGTCTATTATACCCTGTTGCTTCGGCG GGCCCGCCGCTTGTTCGGCCGCCGGGGGGGGCGCCTTTGCC CCCGGGCCCGTGCCCGCCGAGACCCCAACACGAACACT GTCTGAAAGCGTGCACTGAGTTGATTGAATGCAATCAG TTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGA TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGC AGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCG CCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAT TGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCC CCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGCGGCA CCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACATGC TCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACCA TTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGC TGAACCTTAA

Legenda: C – cytozín, T – tymín, A – adenín, G - guanín

5.3 PCR – RAMP analýza

Napriek tomu, že PCR analýza potvrdila príslušnosť všetkých posudzovaných kmeňov k druhu *Aspergillus niger*, zaujímala nás ich podobnosť, a to najmä vo vzťahu k prostrediu, ktoré sa odlišuje hodnotou pôdnej reakcie, a tiež kontamináciou. Na toto porovnanie sme

použili PCR – RAMP analýzu. Je to postup založený na PCR, ktorý využíva kombináciu dvoch tried markerov, jednoduchých sekvenčných opakovaní a náhodných amplifikovaných markerov DNA polymorfizmu (SALAZAR et al. 2014).



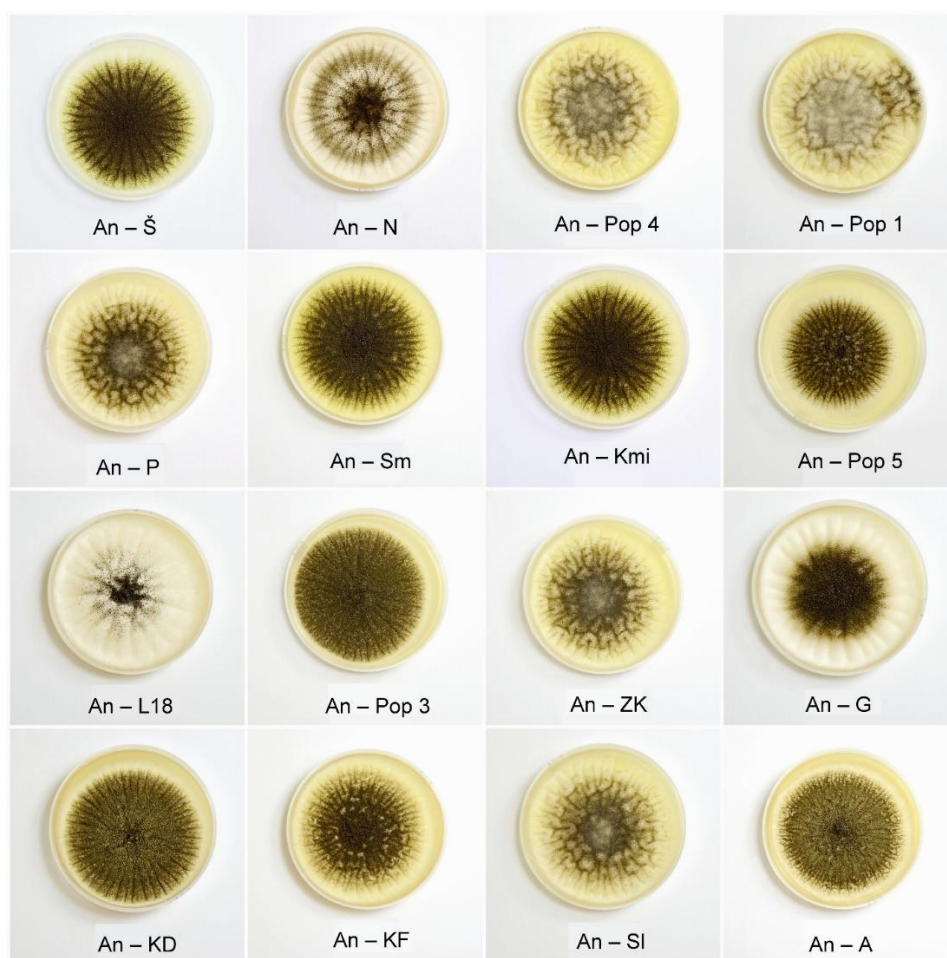
Obr. 15. RAMP analýza kmeňov *Aspergillus niger* vyhodnotená pomocou Pearsonovej korelácie a UPGMA klastrovania (Šimonovičová et al. 2021).

Klastrová RAMP analýza získaných profilov rozdelila kmene *Aspergillus niger* do troch hlavných skupín a niekoľkých jedinečných vetiev (Obr. 15). Prvú skupinu (tzv. klastre) tvoria kmene An-Sl, An-Kmi, An-ZK a An-Pop 4 s podobnosťou viac ako 90 %. Do najväčšieho klastra bolo zahrnutých až šesť kmeňov, a to An-Pop 5, An-A, An-Pop 3, An-KD, An-Pop 1 a An-N) s podobnosťou od 80 do 95 %. Tretí klastre tvoria kmene An-Š, An-Sm a An-P s podobnosťou od 75 do 85 %. Dva kmene, An-G a An-KF mali jedinečné profile RAMP, ale oba boli zoskupené medzi ostatnými izolátmi *Aspergillus niger*. Veľmi zaujímavý je kmeň An-L18 izolovaný z Ostravskej lagúny, ktorému sa podrobnejšie venujeme v podkapitole 5.10. Tento sa od ostatných odlišoval najviac, s podobnosťou menej ako 40 % a bol umiestnený mimo ostatných kmeňov. Zhľukovanie kmeňov do tzv. klastrov však nezodpovedalo hodnotám pH ani kontaminácii prostredia. V ďalších experimentoch sme preto použili biochemické profilovanie na výraznejšie porovnanie analyzovaných kmeňov. Spoločným menovateľom klastrov môžu byť teda iné, tu nesledované, vlastnosti.

5.4 Makromorfologické a mikromorfologické znaky ov *Aspergillus niger*

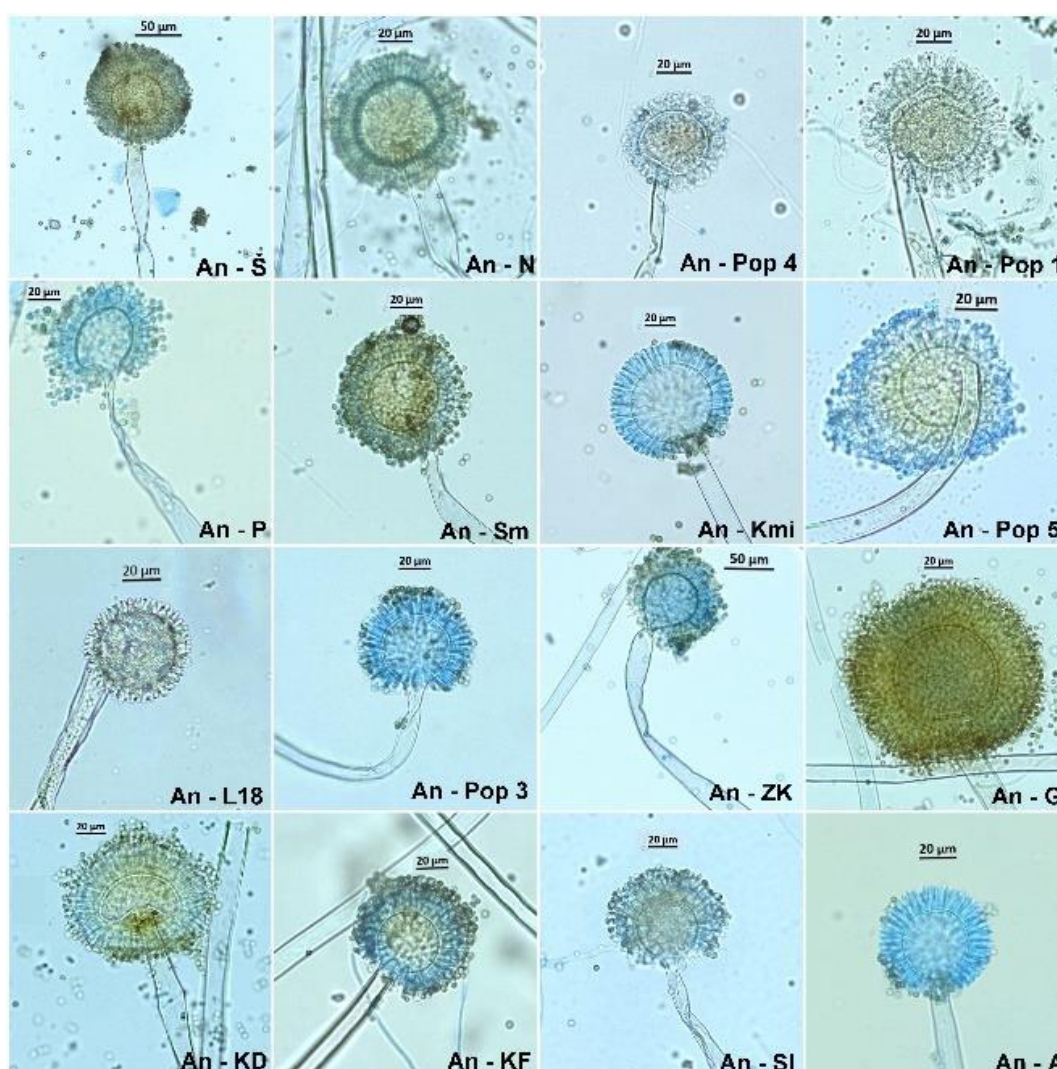
V doterajšej experimentálnej práci so 16 environmentálnymi kmeňmi *Aspergillus niger* sme zaznamenali viaceré rozdiely tak v makromorfologických, ako aj mikromorfologických znakoch. Rozdiely v rýchlosti rastu, t. j. vo veľkosti kolónií a

následnej sporulácii za rovnaké časové obdobie u jednotlivých kmeňov dokumentuje Obr. 16. Najväčšie kolónie s priemerom $4,8 - 5 \pm 0,1$ cm sme zaznamenali u kmeňov An-Š, An-N a An-Pop 4, ktoré pochádzajú z ultra kyslého pôdneho prostredia, An-Pop 1, An-Sm, An-Kmi a An-P (všetky pochádzajúce zo silne kyslého prostredia), An-L18 (z neutrálneho prostredia), An-ZK a An-G (zo slabo alkalického prostredia), An-KF a An-SI (zo silne alkalického prostredia). Kolónie s priemerom $4,6 \pm 0,2$ cm tvoril kmeň An-KD (zo stredne alkalického prostredia). Priemernú hodnotu veľkostí kolónií $4,4 \pm 0,3$ cm sme zaznamenali u kmeňa An-Pop 3 zo slabo alkalického pôdneho prostredia, potom nasledoval kmeň An-A, ktorého kolónie mali priemer $4,3 \pm 0,2$ cm. Najmenšie kolónie s priemerom $3,8 \pm 0,3$ cm tvoril kmeň An-Pop 5, ktorý pochádza zo stredne kyslého prostredia. Keďže rozdiely vo veľkosti kolónií sú minimálne, je možné predpokladať, že vplyv ekologických faktorov sa v tomto prípade neprejavil, resp. je veľmi malý až zanedbateľný.



Obr. 16. Kolónie kmeňov *Aspergillus niger* zaznamenané po päťdňovej kultivácii na SDA, ktoré slúžili ako kontrola k produkcii enzýmu lipáza (priemer Petriho misky je 6 cm) (Nosalj et Šimonovičova 2019; Šimonovičová et al. 2021).

Zaznamenali sme tiež veľké rozdiely v mikromorfologických znakoch (Obr. 17). Najčastejšie je poškodený konidiofór, ktorý je buď zaškrtený (An-Š, An-N, An-ZK, An-SI), veľmi zúžený až nitkovitý (An-Pop 4, An-P) alebo, naopak, zhrubnutý až nafúknutý (An-Pop 1, An-L18, An-KD). Zaznamenali sme tiež deformácie vezikuly, z ktorej vyrastajú fialidy (An-Pop 4, An-Pop 1, An-P, An-KD). Tieto poškodenia, resp. deformácie, sú vo všetkých vzorkách, ktoré pochádzali z kontaminovaného prostredia. Kontrolný kmeň An-G však žiadne známky poškodenia nevykazoval. Na základe uvedených rozdielov, ktoré sme zaznamenali tiež v produkcii enzýmu lipáza, nás zaujímalo, či sa uvedené rozdiely prejavia aj v produkcii iných metabolitov.



Obr. 17. Mikromorfologické znaky environmentálnych kmeňov *Aspergillus niger* z rôznych lokalít. (Šimonovičová et al. 2021).

5.5 Stanovenie biologického profilu systémom Biolog FF Microplate™

Druh *Aspergillus niger* je schopný produkovať látky rôzneho typu, nielen organické kyseliny, enzýmy, ale aj iné produkty a medziprodukty metabolizmu. Mnohé z týchto látok majú veľké využitie v potravinárskom, farmaceutickom a chemickom priemysle, pri výrobe liečiv, ale aj v minerálnych biotechnológiách a pri úprave priemyselných aj odpadových vôd v rámci bioremediácie (ADELEKE et al. 2017, AKHTAR et al. 2014, GULZAR et al. 2017, UTOBO et TEWARI 2015).

Z porovnania získaných biochemických profilov environmentálnych kmeňov *Aspergillus niger* prostredníctvom systému Biolog (Tab. 5) vyplýva, že v oxidácii viacerých substrátov dochádza k pozitívnej reakcii, ktorú sme zaznamenali pri utilizácii týchto substrátov: Tween 80, N-acetyl-D-glukozamín, amygdalín, L-arabinóza, arbutín, dextrín, α -D-glukóza, glycerol, glykogén, D-manóza, D-rafinóza, D-ribóza, salicín, D-sorbitol, D-xyulóza, kyselina chinová, kyselina D-glukárová, L-alanín, L-alanyl-glycín, L-asparagín, kyselina L-glutámová, L-prolín. Zhodnú negatívnu reakciu sme zaznamenali pri utilizácii týchto substrátov: N-acetyl-D-galaktozamín, N-acetyl- β -D-manozamín, adonitol, D-arabinóza, D-arabitol, β -cyklodextrín, L-fruktóza, D-galaktóza, kyselina D-galakturónová, D-glukozamín, glukuronamid, α -D-laktóza, laktulóza, maltitol, palatinóza, sedoheptulóza, D-tagatóza, kyselina brómsukcínová, kyselina β -hydroxymaslová, kyselina α -keto-glutarová, metylester kyseliny D-mliečnej, kyselina L-mliečna, kyselina sebaková, kyselina jantárová, kyselina N-acetyl-L-glutámová, L-alanínamid a adenosín-5'-monofosfát. Uvedené biochemické testy, v ktorých sme zaznamenali zhodné pozitívne alebo negatívne výsledky, a to u všetkých kmeňov *Aspergillus niger*, neboli do fenotypového porovnania kmeňov zaradené.

Vlastnú fenotypovú analýzu kmeňov *Aspergillus niger* sme získali na základe biochemických testov, v ktorých sme zistili rozdielne reakcie medzi kmeňmi. Do tohoto porovnania sme zahrnuli všetky výsledky biochemických testov, v ktorých sa kmene *Aspergillus niger* odlišovali vo výsledku (pozitívna reakcia, negatívna reakcia, nejednoznačná, t. j. variabilná reakcia (Tab. 5).

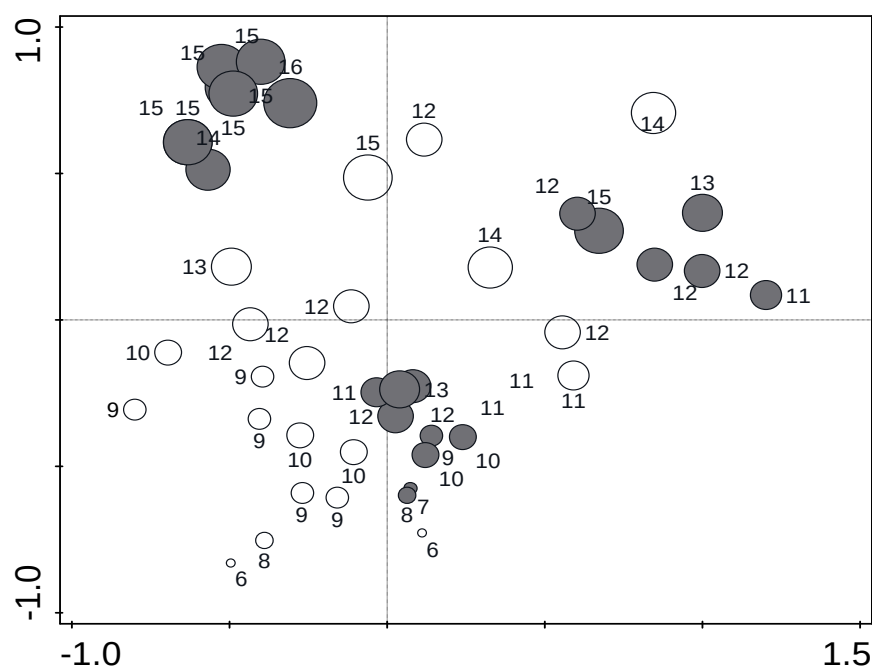
Tabuľka 5. Porovnanie výsledkov fenotypových/biochemických identifikačných profilov kmeňov *Aspergillus niger* získaných systémom Biolog.

Pozitívne reakcie		
(A2) Tween 80	(C4) glycerol	(E12) D-xylóza
(A4) N-acetyl-D-glukozamín	(C5) glykogén	(F12) kyselina chinová
(A7) amygdalín	(D2) D-manóza	(G1) kyselina D-glukárová
(A9) L-arabinóza	(D11) D-rafinóza	(G8) L-alanín
(A11) arbutín	(E1) D-ribóza	(G9) L-alanyl-glycín
(B3) dextrín	(E2) salicín	(G10) L-asparagín
(B12) α -D-glukóza	(E4) D-sorbitol	(G12) kyselina L-glutámová
		(H4) L-prolín
Negatívne reakcie		
(A3) N-acetyl-D-galaktozamín	(B11) D-glukozamín	(F4) kyselina β -hydroxymaslová
(A5) N-acetyl- β -D-manozamín	(C2) glukuronamid	(F7) kyselina α -ketoglutarová
(A6) adonitol	(C8) α -D-laktóza	(F8) metylester kyseliny D-mliečnej
(A8) D-arabinóza	(C9) laktulóza	(F9) kyselina L-mliečna
(A10) D-arabitol	(C10) maltitol	(G2) kyselina sebaková
(B2) β -cyklodextrín	(D9) palatinóza	(G4) kyselina jantárová
(B6) L-fruktóza	(E3) sedoheptulóza	(G6) kyselina N-acetyl-L-glutámová
(B7) D-galaktoza	(E8) D-tagatóza	(G7) L-alaninamid
(B8) kyselina D-galakturónová	(F2) kyselina brómsukcinová	(H12) adenosín-5'-monofosfát
Variabilné reakcie		
(A12) D-celobióza	(D5) α -methyl-D-galaktozid	(F6) kyselina p-hydroxyfenyloctová
(B1) α -cyklodextrín	(D6) β -methyl-D-galactozid	(F10) kyselina D-jablčná
(B4) i-erytritol	(D7) α -methyl-D-glukozid	(F11) kyselina L-jablčná
(B5) D-fruktóza	(D8) β -Methyl-D-glukozid	(G3) kyselina jantárová
(B9) gentiobióza	(D10) D-psikóza	(G5) mono-metylester kyseliny jantárovej
(B10) kyselina D-glukónová	(D12) L-ramnóza	(G11) kyselina L-asparágová
(C1) α -D-glukóza-1-fosfát	(E5) L-sorbóza	(H1) kyselina glycyl-L-glutámová
(C3) kyselina D-glukurónová	(E6) stachyóza	(H2) L-ornitín
(C6) m-inositol	(E7) sacharóza	(H3) L-fenylalanín
(C7) kyselina 2-keto-D-glukónová	(E9) D-trehalóza	(H5) kyselina L-pyroglutámová
(C11) maltóza	(E10) turanóza	(H6) L-serín
(C12) maltotrióza	(E11) xylitol	(H7) L-treonín
(D1) D-manitol	(F1) kyselina γ -amino-maslová	(H8) 2-aminoetanol
(D3) D-melezitóza	(F3) kyselina fumarová	(H9) putrescín
(D4) D-melibióza	(F5) kyselina γ -hydroxy-maslová	(H10) adenosín
		(H11) uridín

Legenda: Čísla v zátvorkách vyjadrujú umiestnenie testov na testovacej platničke FF-Microplate firmy Biolog. Testy sú rozdelené do 3 skupín: testy s pozitívnym výsledkom zhodné pre všetky testované kmene, testy s negatívnym výsledkom zhodné pre všetky kmene a biochemické testy, v ktorých boli zistené variabilné reakcie testovaných kmeňov. Variabilné reakcie jednotlivých kmeňov *Aspergillus niger* sú prejavom genotypových a fenotypových rozdielov medzi testovanými kmeňmi.

Na analýzu fenotypovej rozdielnosti kmeňov na základe biochemických parametrov zo systému Biolog sme použili multikritériálnu analýzu programu Canoco 5 (BRAAK et SMILAUER 2012).

V ordinačnom diagrame (Obr. 18) sú zrejmé zhluky klastre kmeňov *Aspergillus niger*, ktoré vykazujú najvyššiu vzájomnú fenotypovú podobnosť. Najvyššia podobnosť (vľavo hore) je medzi kmeňmi An-KF, An-Sl (oba kmene pochádzajú zo silne alkalického prostredia) a kmeňom An-A, ktorý pochádza z povrchu syntetického adamitu. Pravý horný roh zachytáva podobnosť medzi kmeňmi An-ZK, An-G, An-KD (kmene izolované zo slabo alkalického prostredia) a kmeňom An-Sl, ktorý pochádza zo silne alkalického prostredia). Spodná časť diagramu (vľavo dole) poukazuje na podobnosť medzi kmeňmi An-Kmi (kmeň pochádzajúci zo silne kyslého prostredia), An-Pop 5 (kmeň pochádzajúci zo stredne kyslého prostredia), An-L18 (kmeň izolovaný z neutrálneho prostredia) a An-Pop 3 (kmeň izolovaný zo slabo alkalického prostredia). V pravom dolnom rohu diagram zachytáva podobnosť medzi kmeňmi An-ZK, An-G (obidva kmene boli izolované zo slabo alkalického prostredia) a kmeňom An-KD pochádzajúcim zo stredne alkalického prostredia).

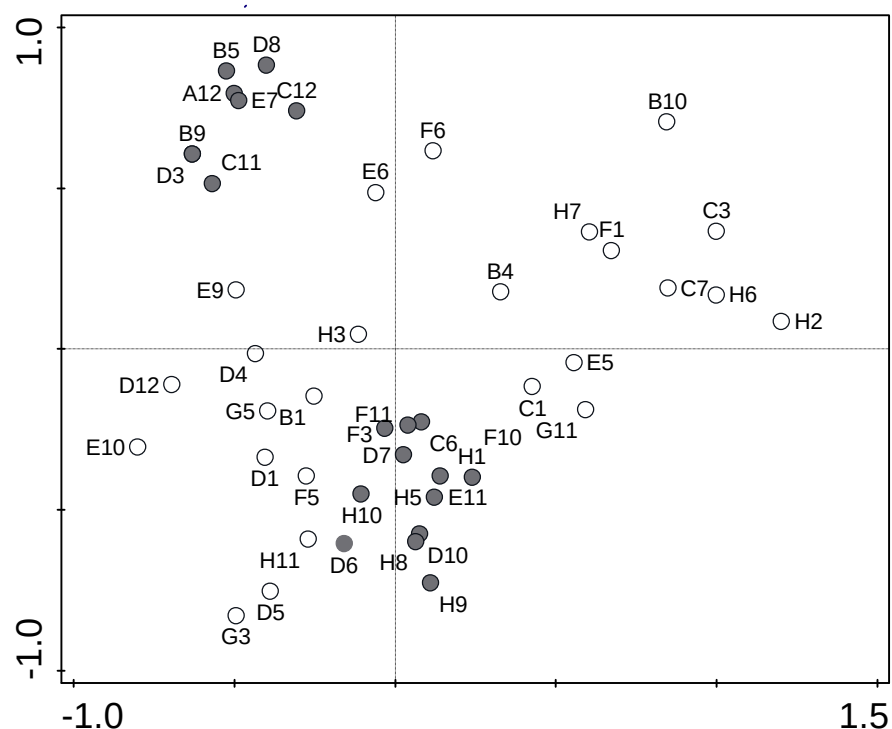


Obr. 18. Ordinačný diagram fenotypovej podobnosti fitovaných kmeňov An. Označenie kmeňov An ako 6 (An-Sm), 7 (An-Kmi), 8 (An-Pop 5), 9 (An-L18), 10 (An-Pop 3), 11 (An-ZK), 12 (An-G), 13 (An-KD), 14 (An-KF), 15 (An-Sl) a 16 (An-A) je podľa Tab. 1. Kmene 1 – 5 ležia mimo ordinačnej osy, a preto nie sú zobrazené (Šimonovičová et al. 2021).

Výsledky ordinačného diagramu (Obr. 18) teda zodpovedajú rozdeleniu environmentálnych kmeňov *Aspergillus niger* podľa pôdnej reakcie prostredia, z ktorého boli izolované (Tab. 3). Najväčšiu fenotypovú podobnosť sme potvrdili medzi kmeňmi, ktoré boli izolované zo silne alkalického prostredia (8,5 – 9,0), potom z prostredia slabo alkalického, stredne alkalického a znova silne alkalického (7,4 – 7,8, 7,9 – 8,8, 8,5 – 9,0). Nasledujú kmene zo silne kyslého (5,1 – 5,5) a slabo alkalického prostredia (7,4 – 7,8). Ordinačný diagram nepotvrdil fenotypovú podobnosť medzi kmeňmi, ktoré pochádzajú z ultra kyslého prostredia (< 3,5), extrémne kyslého prostredia (3,5 – 4,4) a z prostredia veľmi silne kyslého (4,5 – 5,0).

Ak porovnáme Obr. 18 a Obr. 19 zistíme, že vytvorené zhľuky kmeňov *Aspergillus niger*, ktoré vykazujú najvyššiu vzájomnú fenotypovú podobnosť v ordinačnom diagrame (Obr. 18) viac – menej korešpondujú s klastrami RAMP analýzy (Obr. 15). Je zaujímavé, že Obr. 18 vôbec nezobrazuje kmene *Aspergillus niger* označené ako 1 – 5, pretože ležia mimo ordinačnej osy. Osy diagramu totiž tvoria najvýznamnejšie podmienky, ktoré majú najväčší význam vo fenotypovej podobnosti kmeňov *Aspergillus niger*. Kmene, ktoré ležia ďaleko od krivky, alebo majú minimálnu fenotypovú podobnosť (t. j. kmene 1 – 5), sa vo výslednom diagrame nezobrazia. Naopak, RAMP analýza (Obr. 15) zobrazuje určitý vzťah medzi kmeňmi An-Š, An-Sm a An-P, ktorých pH pôvodného prostredia je ultra kyslé a veľmi kyslé (Tab. 2), a to aj napriek ich pomerne nízkej vzájomnej podobnosti, ktorá je od 75 až 85 %. Z uvedeného je zrejmé, že stanoviť podobnosť kmeňov toho istého druhu iba jednou metódou nie je jednoznačné a dostačujúce. Odporúčame preto použiť viacero metód.

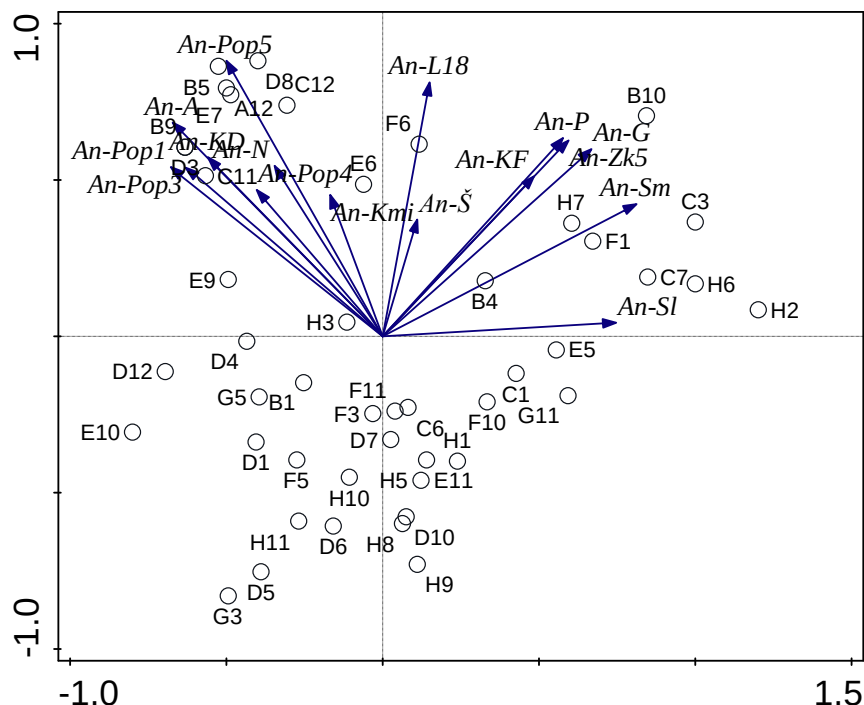
Ordinačný diagram (Obr. 20) vyhodnocuje analýzu biochemických testov zo systému Biolog a ich vhodnosť na stanovenie podobnosti testovaných kmeňov *Aspergillus niger*. Z výsledných dát je zrejmé, že ako najvhodnejšie sa ukázali testy využitia cukrov (A12 – B5 – B9 – C11 – C12 – D3 – D8 – E7), derivátov cukrov (C6 – D7 – D10 – E11), testy stanovenia organických kyselín (F3 – F11 – H1 – H5) a testy stanovenia aminokyselín (H8 – H9 – H10).



Obr. 19. Vizualizácia analýzy vhodnosti FF-biochemických testov systémom Biolog v závislosti na fenotypových vlastnostiach testovaných kmeňov *Aspergillus niger*. Označenie biochemických testov je podľa Tab. 5 (Šimonovičová et al. 2021).

Ordinačný diagram (Obr. 19) zachytáva vhodnosť FF-biochemických testov zo systému Biolog na testovanie fenotypových vlastností kmeňov *Aspergillus niger* vo vzťahu k pH prostredia. Výsledné údaje ukazujú, že najužitočnejšie boli testy využitia cukrov (A12-B5-C12-D8-E7), ktoré sú obzvlášť vhodné pre silné alkalické prostredie. Testy derivátov cukru (C6-D7-E11) a testy organických kyselín (F3-F11-H1-H5) sa prejavili ako najvhodnejšie v neutrálnych až slabo alkalických podmienkach. Významná väzba na stredné a silné kyslé pH sa ukázala v teste na deriváty cukru D10 a v teste na aminokyseliny H8. Podľa týchto výsledkov sa ako fenotypovo najbližšie prejavili kmene An-Pop 3 a An-Pop 1, kedy pri RAMP analýze je podobnosť týchto kmeňov 80 až 95 % (Obr. 15). Potom nasledujú kmene An-Pop 5 a An-Pop 4 (rozdielne pH substrátu, ale zhodná oblasť izolácie u všetkých štyroch kmeňov a to lokalita Poproč). Fenotypová podobnosť sa prejavila tiež medzi kmeňmi An-G and An-ZK (obidva kmene pochádzajú zo slabo alkalického prostredia). Zaujímavou je tiež veľmi vysoká podobnosť medzi kmeňmi An-A and An-N. Spoločným rysom prostredia pôvodu u oboch kmeňov je prítomnosť arzenu. Kmeň An-A bol izolovaný z povrchu syntetického adamitu $[Zn_2(AsO_4)(OH)]$ a kmeň An-N z uhoľného prachu s obsahom As 400 mg/kg of As z bane Nováky. Naopak, ako fenotypovo najvzdialenejšie sa

prejavili kmene An-Sl a An-L18, s miernou podobnosťou ku kmeňu An-Š. Získané výsledky zodpovedajú extrémnym podmienkam a chemickej charakteristike jednotlivých lokalít, z ktorých boli kmene *Aspergillus niger* izolované.



Obr. 20. Analýza biochemickej podobnosti kmeňov *Aspergillus niger* v závislosti na hodnotách pH prostredia. Fenotypovú podobnosť vyjadruje uhol medzi jednotlivými kmeňmi. Smer šípky odpovedá najstrmšiemu nárastu kovariancie, resp. rozptylu kmeňov *Aspergillus niger* vo vzťahu k prostrediu (ŠIMONVIČOVÁ et al. 2021).

Získané výsledky poukazujú na koreláciu pH hodnôt pôd a substrátov, ktoré korelujú predovšetkým s biologickým profilom testovaných kmeňov An. Z hľadiska genotypu sú najmenej podobné kmene An-Sl a An-L18, čo sa tiež potvrdilo ich najnižšou fenotypovou podobnosťou.

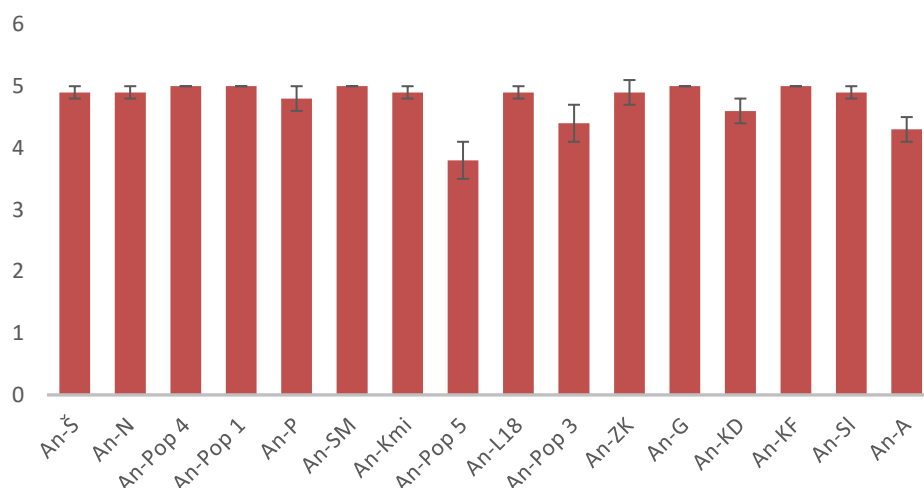
SELVIG et ALSPAUGH (2011) sa zaoberali štúdiom signálnych dráh mikroskopických vláknitých húb reagujúcich na pH prostredia a zistili určitú mieru signálnej špecificity v rámci skúmaných druhov. Vo všeobecnosti však platí, že ak organizmy rastú v širokom rozmedzí pH, potom svojmu prostrediu prispôsobia aj génovú expresiu. Mikroskopické vláknité huby patria medzi mnohostranne adaptabilné organizmy, ktorých podmienkou pre rast v širokom rozmedzí pH je genetický regulačný systém, ktorý prispôsobuje génovú expresiu pH prostredia (ŠIMONVIČOVÁ et al. 2013b). Základom tejto adaptácie je predovšetkým metabolická súvislosť medzi pH a celulárnymi nutričnými enzýmami, ktoré

sú prioritne vylučované pri tých hodnotách pH, pri ktorých môžu účinne fungovať. Medzi kľúčové gény, expresiu ktorých ovplyvňuje pH prostredia, patria gény kódujúce intracelulárne enzýmy, gény kódujúce permeázy a gény, ktoré kódujú enzýmy riadiace syntézu vylučovaných metabolitov (PEÑALVA et al. 2002). Z publikovaných charakteristík genetického regulačného systému druhu *Aspergillus nidulans* vyplýva celý rad mechanizmov regulujúcich pH prostredia, vrátane preukázanej genetickej súvislosti medzi pH a patogenitou (BIGNELL et al. 2005, PEÑALVA et al. 2008).

Nízke pH vplýva tiež na expresiu tzv. „heat shock“ proteínov, ktoré sa uplatňujú pri adaptácii na kyslé prostredie, a zúčastňujú sa tiež na intracelulárnych dráhach metabolizmu kovov (EISENDLE et al. 2004, FREITAS et al. 2011). pH-regulačný systém zaisťuje, že vylučované enzýmy, napr. alkalické a kyslé fosfatázy, xylanázy a ďalšie metabolity, ako napr. antibiotiká, toxíny, membránové proteíny, sú produkované za tých podmienok pH, za ktorých sú fyziologicky plne funkčné. Ako poukazujú KATZ et al. (1994) a van KUYK et al. (2000) zatiaľ, čo sa v rastových podmienkach v kyslom prostredí prednostne vylučujú enzýmy metabolických dráh, ktoré štiepia cukry, ako napr. xylanáza, či arabinofuranozidáza, proteázy sú exprimované prednostne v alkalických podmienkach. Mikroskopické vláknité huby sú teda schopné diferencovane produkovať zmes extracelulárnych enzýmov ako reakciu na pH prostredia a jeho zmeny. To vysvetľuje tiež rozdiely v genotypovej a fenotypovej podobnosti testovaných kmeňov *Aspergillus niger* vo vzťahu k pH pôvodného prostredia.

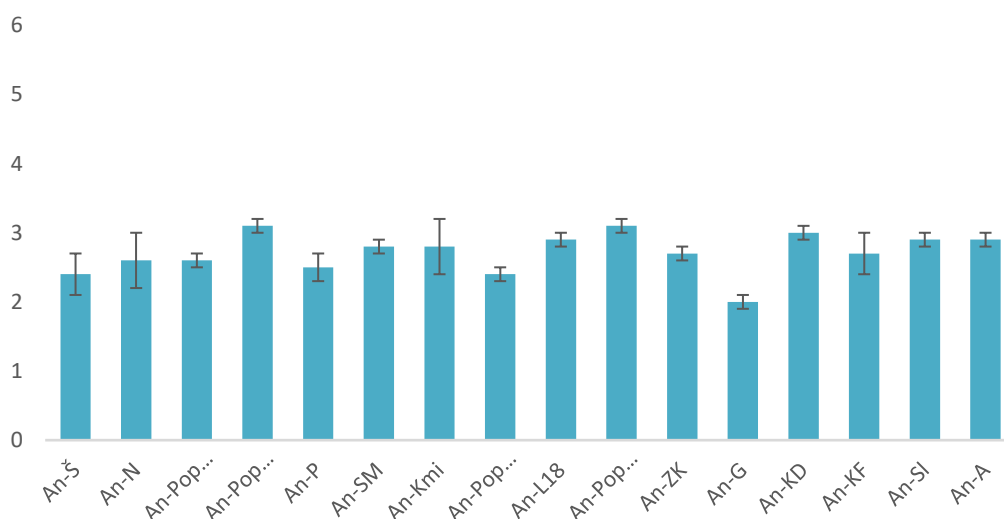
5.6 Produkcia enzýmu lipáza kmeňmi druhu *Aspergillus niger*

Produkciu enzýmu lipáza sme sledovali u všetkých environmentálnych kmeňov *Aspergillus niger*. Počas päťdňovej kultivácie na SDA sa rýchlosť rastu (Obr. 16) a priemerná veľkosť kolónií jednotlivých kmeňov veľmi nelíšili (Obr. 21).



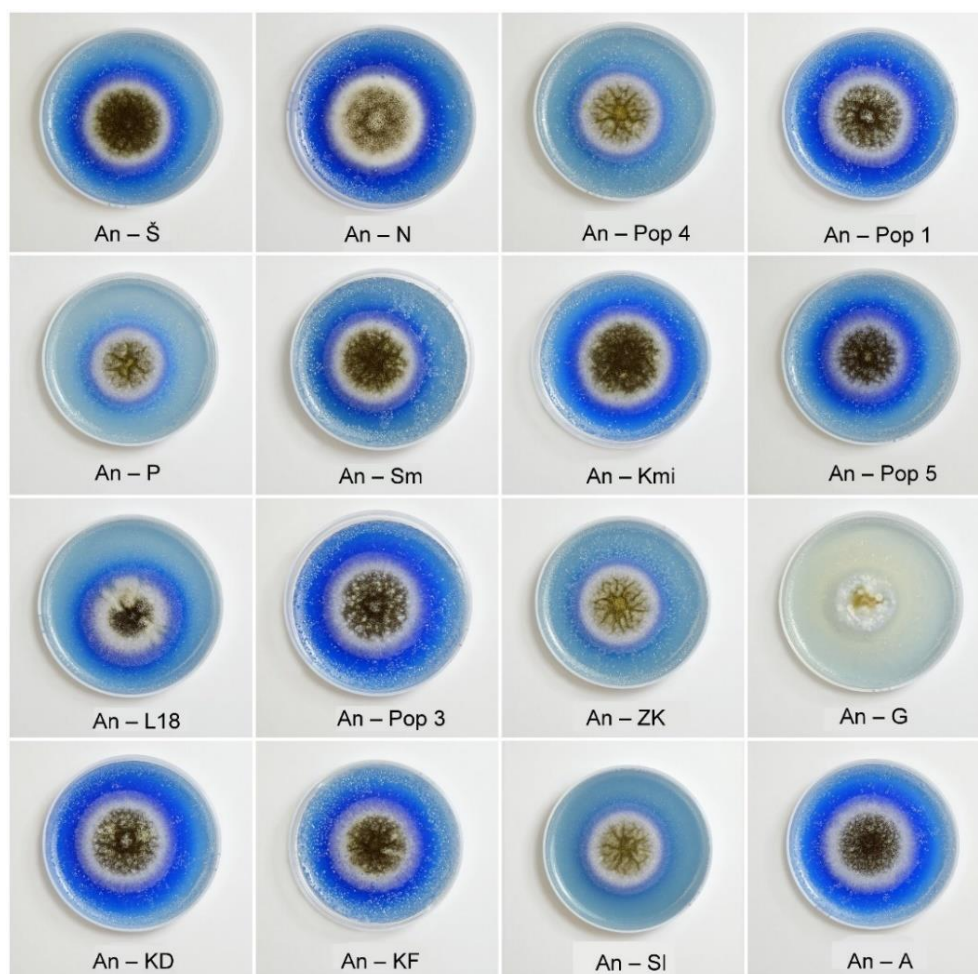
Obr. 21. Priemerná veľkosť kolónií (cm) kmeňov *Aspergillus niger* kultivovaných na SDA, ktoré slúžili ako kontrola k produkcii enzýmu lipáza. Smerodajné odchýlky boli vyhodnotené v exceli za pomoci funkcie STDEV.S.

Pri kultivácii kmeňov na SBA živnej pôde sme najväčšie kolónie $3,1 \pm 0,1$ cm zaznamenali u kmeňov An-Pop 1 a An-Pop 3 a An-KD. Nasledovali kmene An-L18, An-SI a An-N s priemernou veľkosťou kolónií $2,9 \pm 0,1$ cm, ďalej kmene An-Sm ($2,8 \pm 0,1$ cm) a An-Kmi ($2,8 \pm 0,4$ cm). Kolónie menšieho priemeru tvorili kmene An-ZK ($2,7 \pm 0,1$ cm), An-KF ($2,7 \pm 0,3$ cm), An-N ($2,6 \pm 0,4$ cm), An-Pop 4 ($2,6 \pm 0,1$ cm), An-P ($2,5 \pm 0,2$ cm), An-Š ($2,4 \pm 0,3$ cm) a An-Pop 5 ($2,4 \pm 0,1$ cm). Jednoznačne najmenšie kolónie však tvoril kontrolný kmeň An-G a to iba $2 \pm 0,1$ cm. Ich priemerné hodnoty sú znázornené na Obr. 22.



Obr. 22. Priemerná veľkosť kolónií (cm) kmeňov *Aspergillus niger* kultivovaných na sledovanie aktivity lipázy. Smerodajné odchýlky boli vyhodnotené v exceli za pomoci funkcie STDEV.S.

Aj napriek tomu, že u kmeňa An-G sme zaznamenali najmenšiu priemernú veľkosť kolónií, enzymatická aktivita bola veľmi silná. K odfarbeniu média a vytvoreniu tzv. halo efektu došlo veľmi rýchlo (Obr. 23) a táto veľmi silná produkcia enzýmu lipáza predurčuje tento kmeň na komerčné využitie. Kmene An-Pop 4, An-P, An-L18, An-ZK a An-SI vykazovali len veľmi slabú produkciu lipázy, čo znamená, že tieto kmene síce enzým tvorili, ale v oveľa menšom množstve v porovnaní k meňom An-G.



Obr. 23. Odfarbenie živného média po produkcii enzýmu lipáza jednotlivými kmeňmi *Aspergillus niger*. Vznik tzv. „halo efektu“. (Nosalj et Šimonovičova 2019).

Podľa RAMP analýzy kmene An-Pop 4, An-ZK a An-SI patria do skupiny s najvyššou podobnosťou od 90 do 100 %. Fenotypovú podobnosť medzi kmeňmi An-ZK a An-G potvrdzuje aj ordinačný diagram (Obr. 18) a biochemickú podobnosť medzi kmeňmi An-P, An-G a An-ZK ordinačný diagram na Obr. 20. U ostatných kmeňov *Aspergillus niger* sa produkcia lipázy nepotvrdila, čo znamená, že tieto kmene buď enzým netvorí alebo ho je tak málo, že k odfarbeniu diagnostickej pôdy SPA vôbec nedochádza (Tab. 6).

Tab. 6. Rast kmeňov druhu *Aspergillus niger* a produkcia enzýmu lipáza (Nosalj et Šimonovičová 2019).

pH	Kmeň	SDA	LA	pH	Kmeň	LA	LA
3,12	An-Š	+++	+	6,85	An-L18	+++	++
3,32	An-N	+++	+	7,45	An-Pop 3	++	+
3,85	An-Pop 4	+++	++	7,51	An-ZK	+++	++
4,52	An-Pop1	+++	+	7,7	An-G	+++	+++
5,25	An-P	+++	++	8,25	An-KD	++	+
5,4	An-Sm	+++	+	8,49	An-KF	+++	+
5,4	An-Kmi	+++	+	8,6	An-Sl	+++	++
6,05	An-Pop 5	++	+	-	An-A	++	+

Legenda: SDA (kontrola rastu), LA (produkcia enzýmu lipáza), +++ veľmi dobrý rast/veľká produkcia enzýmu lipáza, ++ dobrý rast/slabá produkcia enzýmu lipáza, + slabý až veľmi slabý rast/lipáza sa netvorí.

Porovnateľné výsledky enzýmovej aktivity mikroskopických vláknitých húb ako sú *Aspergillus fumigatus*, *A. fischeri*, *Byssochlamys spectabilis*, *Cladosporium pseudocladosporioides*, *Epicoccum nigrum*, *Hamigera avellanea*, *H. insecticola*, *Chaetomium globosum*, *Metharizium carneum*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium chrysogenum* var. *chrysogenum*, *P. citreonigrum*, *P. daleae*, *P. sacculum*, *P. restrictum*, a tiež dva druhy bazídiových húb *Bjerkandera adusta* a *Irpex lacteus* izolovaných z pôdy a kalu v banskej oblasti Poproč zaznamenali aj ŠIMONOVICHOVÁ et ČERNANSKÝ (2016).

Sledovanie enzýmovej aktivity mikroorganizmov potvrdilo inhibičný vplyv potenciálne toxických prvkov, ako je napr. kadmium, olovo, arzén a ortuť, na produkciu rôznych enzýmov, pričom ich vplyv bol takisto rôzny. Produkcia ureázy, dehydrogenázy, katalázy, kyslej a alkalické fosfatázy bola znížená vplyvom olova (BALYAEVA et al. 2005, DIKE et al. 2014). Arzén negatívne ovplyvnil produkciu arylsulfatázy, ale na druhej strane, na produkciu xylanázy, proteázy a alkalické fosfatázy veľký vplyv nemal (LORENZ et al. 2006). Kadmium inhibovalo najmä produkciu fosfatázy, ureázy, arylsulfatázy a proteázy (DIKE et al. 2014, RENELLA et al. 2004).

Produkcia lipázy závisí od viacerých faktorov, napr. pH, teplota a zloženie živného média (ABD EL AAL et al. 2019, NEMA et al. 2019), významnú úlohu však zohrávajú najmä faktory prostredia, z ktorého daný druh mikroskopickej vláknitej huby pochádza (NOSALJ et ŠIMONOVICHOVÁ, 2016). V závislosti od týchto faktorov prostredia sa následne menia aj fyziologické vlastnosti mikroskopických vláknitých húb, čo sa prejaví zmenou enzýmovej činnosti (AKHTAR et al. 2014, CIHANGIR et al. 2007). Produkcia enzýmov je pomerne rýchlou reakciou na zmeny podmienok, čo umožňuje ich využitie na vyhodnotenie stavu pôdnej

mikrobioty, napr. aj vplyvu rôznych potenciálne toxických prvkov (SHEN et al. 2005). Rozdiely v raste a veľkosti kolónií, produkcii lipázy v rámci jedného druhu sú s veľkou pravdepodobnosťou zapríčinené negatívnym vplyvom nadlimitných hodnôt potenciálne toxických prvkov, ktoré sa vyskytovali na väčšine lokalít, odkiaľ sme environmentálne kmene druhu *Aspergillus niger* izolovali.

Sledovanie produkcie enzýmov, ktorá vedie k tvorbe farebných zón okolo kolónií húb, je opísané aj u mikromycét z rôznych umeleckých diel, historických objektov, archivovaných materiálov a pod. (PANGALLO et al. 2015, PUŠKÁROVÁ et al. 2016).

Na základe výsledkov fenotypovej podobnosti (Obr. 18), analýzy biochemických testov (Obr. 19) a biochemickej podobnosti všetkých environmentálnych kmeňov druhu *Aspergillus niger* vo vzťahu k hodnotám pH prostredia (Obr. 20), sme vybrali štyri kmene na ďalšie analýzy. Sú to kmene An-Š z ultra kyslého prostredia, An-P zo silne kyslého prostredia, An-Sl zo silne alkalického prostredia a An-G, ktorý slúžil ako kontrolný kmeň.

5.7. Produkcia mykotoxínov 16 kmeňmi druhu *Aspergillus niger*

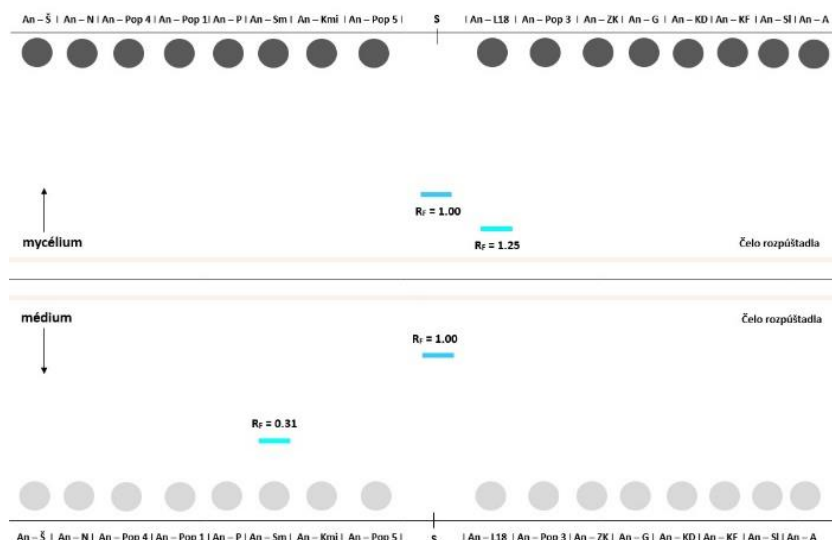
Produkciiu OTA sme potvrdili porovnaním retenčných faktorov škvrn mykotoxínov a štandardu grizeofulvínu ako uvádza FILTENBORG et al. (1989). Pri kmeni An-Sm bol pomer RF škvrny a RF grizeofulvínu (vždy považovaný za rovný 1) 0,31, t. j. dokázaná prítomnosť OTA v biomase (B), pri kmeni An-L18 bol tento pomer = 1,25, čo znamená, že, tento kmeň produkoval OTA do živného média (M) (Tab. 7, Obr. 24).

Ochratoxín A ($C_{20}H_{18}ClNO_6$) je jeden z najnebezpečnejších mykotoxínov pre zdravie človeka a zvierat, bežne sa vyskytujúci v potravinách. Jeho výskyt sa pravidelne sleduje v rôznych komoditách, nakoľko predstavuje vysoké riziko vzhľadom na jeho nefrotoxické a potenciálne karcinogénne vlastnosti (FAO 2006, PERRONE et al. 2017). Druhy rodu *Aspergillus* sp. v produkcii OTA dominujú, no ako uvádza ESTEBAN et al. (2006) produkuje ho iba 6 % kmeňov tohto druhu. Jeho produkcia závisí od viacerých faktorov, ako je napr. typ substrátu, živné médium, dĺžka kultivácie, pH a pod. Vplyv pH na produkciu mykotoxínov sledoval ESTEBAN et al. (2004, 2006), ktorý zaznamenali produkciu OTA v rozmedzí pH 2 – 10. Naše environmentálne kmene sa odlišovali na základe primárneho zdroja pôvodu, ale taktiež na genetickej úrovni (Tab. 3 a Obr. 15). Rozdiely sme zaznamenali aj v produkcii OTA: niektoré z kmeňov produkovali OTA v rozmedzí pH 2 – 10, 3 – 10 a iné zasa od pH 5 – 8.

Tab. 7. Produkcia OTA a FB1 kmeňmi druhu *Aspergillus niger* detegované skriningovou metódou TLC.

Poradie vzoriek	Kmeň	OTA	R _F M/ R _F GM	R _F B/ R _F GB	Fumonizín B1	Neurčené metabolity
1.	An-Š	-	0,70	0,95	-	-
2.	An-N	-	-	0,95	-	-
3.	An-Pop 4	-	-	0,95	-	-
4.	An-Pop 1	-	-	0,95	-	-
5.	An-P	-	-	0,57	-	-
6.	An-Sm	+	0,31	0,31	-	-
7.	An-Kmi	-	0,51	0,96	-	-
8.	An-Pop 5	-	-	0,95	-	-
9.	An-L18	+	1,25	-	-	+
10.	An-Pop 3	-	-	-	-	-
11.	An-ZK	-	-	-	-	-
12.	An-G	-	-	-	-	-
13.	An-KD	-	-	0,95	-	-
14.	An-KF	-	-	-	-	-
15.	An-SI	-	-	0,85	-	+
16.	An-A	-	-	0,85	-	+

Legenda: R_F G – retenčný faktor grizeofulvínu; R_F M – retenčný faktor média kmeňov pri produkcii OTA; R_F B – retenčný faktor mycélia kmeňov pri produkcii OTA. Hodnoty uvedené tučným písmom indikujú OTA pri porovnaní s databázou (FILTENBORG et al. 1989), ostatné môžu predstavovať chemicky iné metabolity.

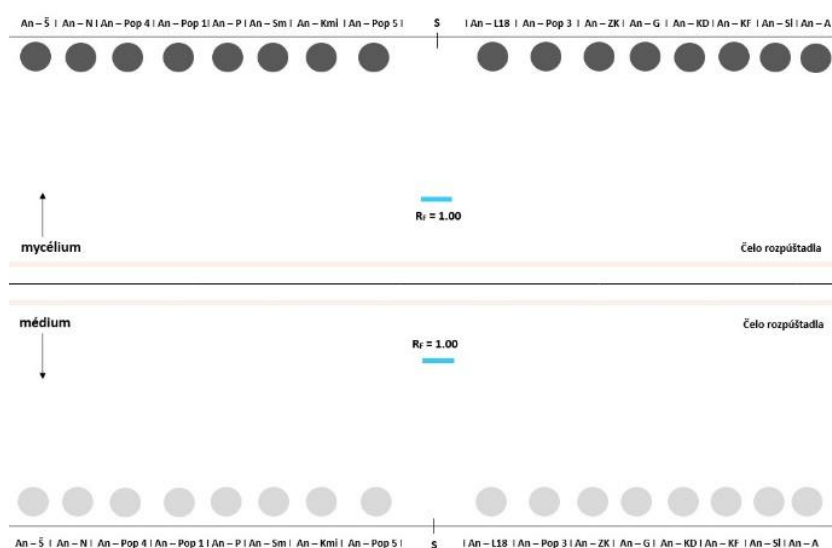


Obr. 24. Dôkaz ochratoxínu. A na TLC platni (modré škvrny štandard – grizeofulvín, tyrkysové škvrny OTA).

BRAGULAT et al. (2001) sledovali produkciu OTA po 7-, 14- a 21-dňovej kultivácii dvoch kmeňov *Aspergillus niger* na živnom médiu YES a CYA pomocou HPLC. Kmene produkovali odlišné koncentrácie OTA tak vo vzájomnom porovnaní, ako aj v porovnaní podľa ich pôvodu. Na živnom médiu YES, produkoval kmeň izolovaný z krmiva OTA

intenzívnejšie, v porovnaní s kmeňom, ktorý bol izolovaný zo sóje. Najvyššie koncentrácie zaznamenali v 21. deň kultivácie, tak pri použití metanolu ako extrakčného činidla, ako aj pri použití roztoku metanolu a kyseliny mravčej v pomere 25 : 1. Pri kultivácii na živnom médiu CYA použili rovnaké extrakčné roztoky, no intenzita produkcie OTA bola u oboch porovnávaných kmeňov počas celej doby kultivácie veľmi nízka.

Produkciu fumonizínu B1 (FB1) sme nezaznamenali u žiadneho z našich testovaných environmentálnych kmeňov *Aspergillus niger* (Tab. 7, Obr. 25).



Obr. 25. Dôkaz fumonizínu B1 metódou TLC.

Za najčastejších producentov fumonizínov sa pokladajú druhy rodu *Fusarium* (FOTSO et al. 2002, BECCARI et al. 2020, STEPIEN 2020). Vo väčšine štúdií sa však potvrdila produkcia fumonizínov aj druhmi rodu *Aspergillus* (MOGENSEN et al. 2009, MIKUŠOVÁ et al. 2020). Fumonizíny, predovšetkým fumonizín B2 (FB2), produkované druhom *Aspergillus niger* sú najčastejšie zaznamenané v potravinách, ako je hrozno, kukurica, káva a iné (NOONIM et al. 2009, MIKUŠOVÁ et al. 2020). V prípade kultivácie kmeňov na analýzu fumonizínov je dôležitým faktorom živné médium. MOGENSEN et al. (2009) sledovali produkciu FB1 druhom *Aspergillus niger* na živnom médiu RCM a CYA, na ktorých produkciu mykotoxínu nezaznamenali. FRISVAD et al. (2007) sledovali produkciu FB1 na viacerých živných médiach, napr. RC, CYA, MEA, OMA a PDA, ale na žiadnom médiu produkciu toto mykotoxínu nezaznamenali. S touto štúdiou korešpondujú aj naše zistenia.

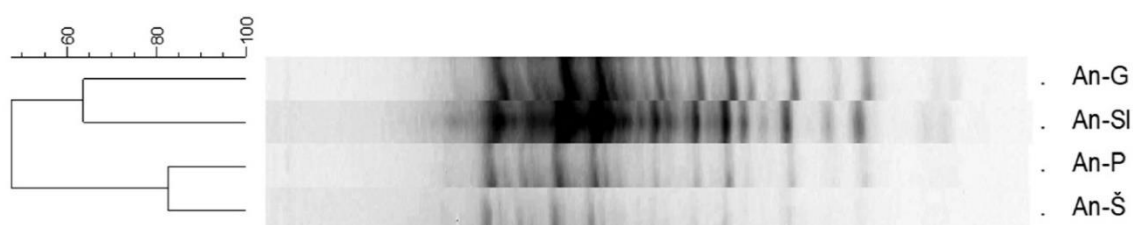
Ako uvádza SUSCA et al. (2016), prítomnosť génov potrebných na syntézu týchto mykotoxínov zohráva významnú úlohu pri produkcii ochratoxínov a fumonizínov. Ich

výsledky ukázali, že kmene *Aspergillus niger*, ktoré neprodukovali fumonizíny mali porušený klaster fumonizínových biosyntetických génov. Rovnako, kmeňom, ktoré neprodukovali OTA, chýbal klaster biosyntetických génov OTA. U týchto kmeňov sa objavilo analýzou sekvencie genómu vyradenie génu OTA. Kmene *Aspergillus niger*, ktoré autori použili v tejto štúdii, pochádzali z rôznych druhov požívatín, napr. hrozno, kešu orechy, mandle, pistácie, kukurica, a tiež z rôznych štátov (Taliansko, Portugalsko, Turecko, Čína). Oba mykotoxíny (OTA a FB2) produkovalo pritom iba 15 kmeňov druhu *Aspergillus niger*, z celkového počtu testovaných 88 kmeňov. Všetky kmene druhu *Aspergillus niger* z kešu orieškov a hrozienok produkovali FB2, kým väčšina kmeňov z kukurice a hrozna tento mykotoxín neprodukovala. Kmene izolované z kešu orieškov, naopak, neprodukovali OTA, no tie izolované z hrozna a hrozienok OTA produkovali. Je tu zrejmý selekčný vplyv dostupných sacharidov na mikroskopické vlákňité huby schopné syntetizovať mykotoxíny pri osídľovaní konkrétnych substrátov. Na základe porovnania viacerých štúdií bola produkcia OTA zaznamenaná u 4 až 31% kmeňov a fumonizíny produkovalo 63 až 76 % druhov *Aspergillus niger* (MASSI et al. 2016, SUSCA et al. 2014, 2016, STORARI et al. 2012). Rozdiely v produkcii týchto mykotoxínov môžu spôsobovať ekologické faktory, ako je napr. druh rastliny, na ktorej sa kmene vyskytovali, ale aj lokalita, prípadne podnebie a poľnohospodárska prax v danej oblasti (SUSCA et al. 2016).

Mikroskopické vlákňité huby, ktoré pochádzajú z prostredia ovplyvneného kontamináciou potenciálne toxickými prvkami, môžu byť pozmenené týmto negatívnym vplyvom až na genetickej úrovni. Takéto zmeny sa následne prejavajú aj na fyziologických vlastnostiach, ako je produkcia rôznych, a to aj sekundárnych metabolitov (SOSAK-ŠWIDERSKA 2010, ŠIMONOVICHOVÁ et al. 2020). Testované environmentálne kmene druhu *Aspergillus niger* sme identifikovali pomocou PCR metódy s maximálnou možnou mierou istoty, ale aj napriek tomu sa medzi sebou jednotlivé kmene odlišujú produkciou rôznych metabolitov, ako sú organické kyseliny, aminokyseliny, enzýmy a pod. U kmeňov, ktoré sme testovali pomocou TLC, sa okrem stanovených mykotoxínov, objavili aj ďalšie metabolity, ktoré danou metódou nebolo možné presnejšie určiť (Tab. 7). S ohľadom na vplyv potenciálne toxických prvkov v prostredí a rozdielnú pôdnu reakciu (Tab. 3), je možné predpokladať, že sa pôjde o metabolity, ktorých produkcia je výsledkom selekčného tlaku extrémnych environmentálnych podmienok na osídľovanie mikroskopickými vlákňitými hubami so špecifickým genómom, resp. aspoň expresiou jeho špecifických génov.

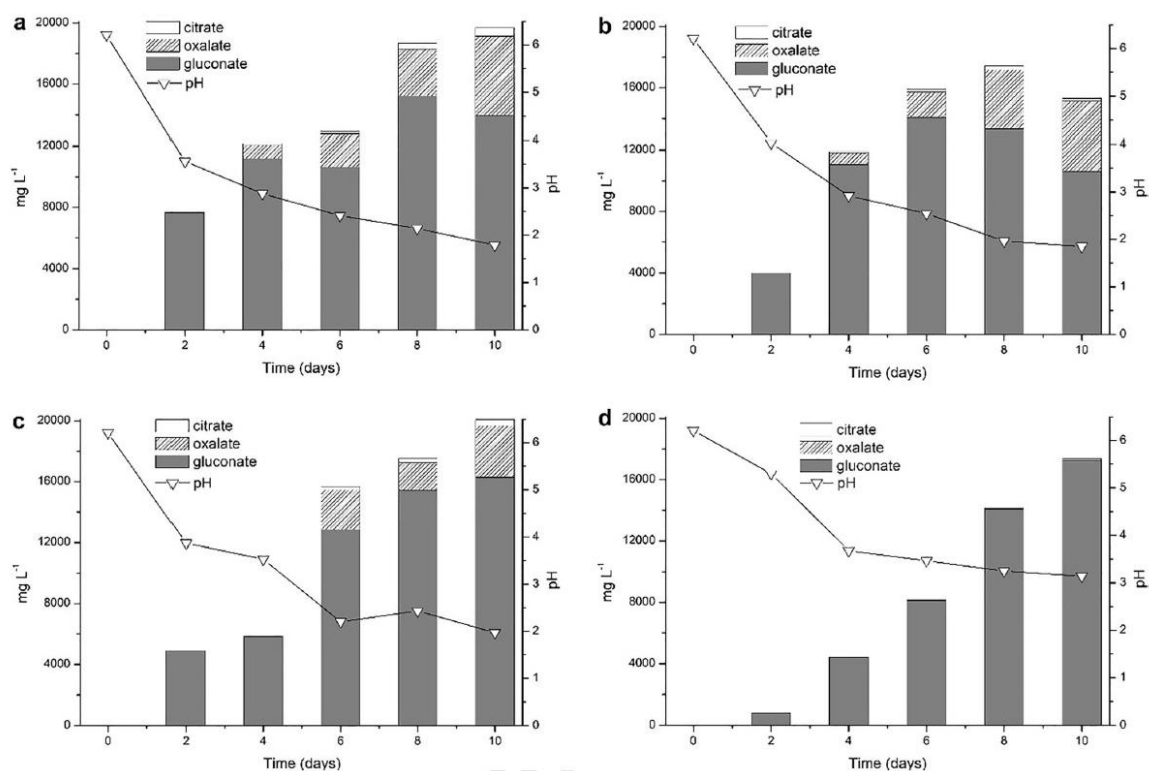
5.8 Produkcia organických kyselín vybranými kmeňmi druhu *Aspergillus niger*

Napriek pomerne širokej škále metabolitov, ktoré sme stanovili systémom Biolog (ŠIMONVIČOVÁ et al. 2021), sme na stanovenie organických kyselín vybrali vyššie uvedené štyri kmene izolované zo substrátov naprieč škálou pH. Ďalším rozhodujúcim kritériom, na základe ktorého sme si tieto kmene zvolili, bola RAMP analýza. Vybrané kmene vytvorili 2 dvojice podobnosti, tie ktoré boli izolované z kyslého prostredia a tie, ktoré boli izolované z alkalického prostredia (Obr. 26). Kmeň An-Š (ultra kyslé pH 3) a An – P (silne kyslé pH 5,25) mali podobnosť 82 %. Kmene An-G (kontrolný kmeň, slabo alkalické pH 7,7) a An-Sl (silne alkalické pH 8,6) sa navzájom podobali na 64 %.



Obr. 26. Podobnosť kmeňov *Aspergillus niger* znázornená RAMP PCR analýzou (Šimonovičová et al. 2020).

Druh *Aspergillus niger* produkuje slabé organické kyseliny, ako je kyselina glukonová, kyselina šťaveľová a kyselina citrónová. Ich akumulácia závisí od pH kultivačného média (YANG et al. 2017).



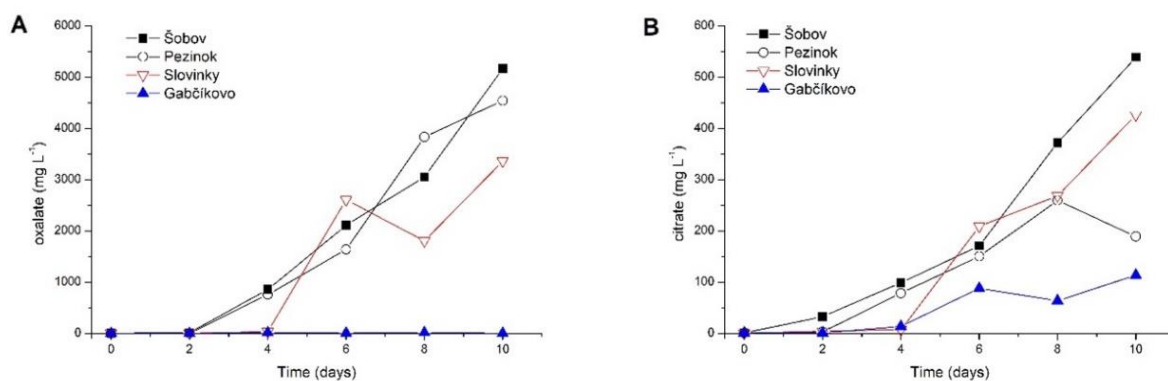
Obr. 27. Kumulatívna produkcia organických kyselín (glukonovej, šťaveľovej a citrónovej) a vývoj pH počas kultivácie kmeňov druhu *Aspergillus niger* z lokality Šobov (a), Pezinok (b), Slovinky (c), Gabčíkovo (d), (Šimonovičová et al. 2020).

Sledovali sme práve tieto kyseliny, pretože majú pomerne široké priemyselné využitie. Kumulatívnu produkciu organických kyselín a vývoj pH počas inkubácie kmeňov druhu *Aspergillus niger* v SDB kvapalnom médiu s počiatočnou koncentráciou glukózy 20 g/l dokumentuje Obr. 27 a-d. Zachytáva postupný pokles pH, ktorý sme zaznamenali v dôsledku akumulácie vodíkových kationov H^+ vo fermentačnej pôde. Živné médiá sa odlišovali v hodnotách pH od slabo kyslého (kontrolné médium s pH 6,21) po extrémne kyslé (2. deň kultivácie) a ultra kyslé (4. až 10. deň kultivácie).

Kyselinu glukonovú produkovali kmene druhu *Aspergillus niger* po celý čas v priebehu desaťdňovej kultivácie. S klesajúcim pH sa produkcia kyseliny glukonovej zvyšovala. Najväčšie množstvo sme však zaznamenali na šiesty deň u kmeňa An-P, na ôsmy deň u kmeňa An-Š a na desiaty deň kultivácie u kmeňov An-Sl a An-G. Najvyššiu koncentráciu kyseliny glukonovej (17,25 g/l) sme zaznamenali u kontrolného kmeňa An-G (Obr. 27 d). Glukózooxidáza je enzým, ktorý sa produkuje na začiatku fermentácie a premieňa významné množstvo glukózy na kyselinu glukonovú (KHURSHID et al. 2013, KURNIATIN et al. 2020). Tvorba enzýmu glukózooxidáza sa indukuje za prítomnosti

vysokých hladín glukózy v médiu, pH okolo 5,5 a zvýšenej hladiny kyslíka (RAMACHANDRAN et al. 2006).

Na rozdiel od tvorby kyseliny glukonovej, syntéza oxalátu a citrátu kmeňmi druhu *Aspergillus niger* vyžaduje na katabolizmus glukózy niekoľkostupňovú enzýmovú reakciu (MANDAL et BANERJEE 2005). Druh *Aspergillus niger* má v cytosole, čo je vnútrobunková tekutina, enzým pyruvátkarboxylázu, ktorý katalyzuje vznik oxalacetátu z pyruvátu a oxidu uhličitého. Glykolytický pyruvát sa metabolizuje na oxalacetát bez toho, aby sa transportoval do mitochondrií (KUBICEK et al. 1988, 1994). Naše pozorovania naznačujú, že tvorba oxalátu začala, keď pH média kleslo pod 3,5 (Obr. 27 a-c). Pri tomto pH kmene druhu *Aspergillus niger* vylučovali súčasne viac organických kyselín, najmä kyselinu glukonovú, šťaveľovú a citrónovú. Kontrolný kmeň (An-G) však oxalát nebol schopný produkovať (Obr. 27 d). Kým oxalát (kyselina šťaveľová) je najsilnejšia organická kyselina produkujúca vodíkové kationy H^+ , ktorá efektívne okysľuje okolité prostredie pri danom pH, syntéza glukonátu na okysľovanie prostredia nemá taký veľký vplyv. Je to zrejme z vývoja pH živného média pri kontrolnom kmeni An-G, u ktorého sme produkciu oxalátu nezaznamenali (Obr. 27 d). Aj napriek pokračujúcej produkcii glukonátu s najvyššou koncentráciou dosiahnutou pri tomto kmeni, pH média nekleslo pod 3. U zvyšných kmeňov sme zaznamenali produkciu kyseliny šťaveľovej s intenzitou v nasledovnom poradí: An-Š > An-P > An-Sl (Obr. 28 a, b).



Obr. 28. Produkcia kyseliny citrónovej a kyseliny šťaveľovej kmeňmi druhu *Aspergillus niger* počas 10-dňovej kultivácie (Šimonovičová et al. 2020).

Ako uvádza GADD et al. (2014), oxalát zohráva významnú úlohu pri mnohých transformáciách minerálov mikroskopickými vláknitými hubami, kde je vnímaný ako kľúčový metabolit. Transformácie kovov a minerálov sú dôležitými súčasťami geomykologických procesov vrátane kolobehu živín a prvkov, biologického zvetrávania a

biominerálnych formácií. Kmeň An-Š, ktorého pôvodným prostredím bola pôda s ultra kyslou reakciou (Tab. 2), produkoval kyselinu šťaveľovú (5,1 g/l) a kyselinu citrónovú (0,52 g/l) v najväčšom množstve. V kyslej pôde sú potenciálne toxické prvky mobilnejšie, čomu napomáha aj produkcia organických kyselín. Tolerancia voči potenciálne toxickým prvkom sa však u mikroskopických vláknitých húb odlišuje. Významnú úlohu zohrávajú napr. vakuoly, ktoré regulujú koncentráciu kovových iónov v cytosole. V pôdach s nadmerným obsahom potenciálne toxických prvkov sa však fyziologická aktivita mikroorganizmov môže výrazne zmeniť (SOSAK - SWIDERSKA, 2010).

Produkcia organických kyselín mikroorganizmami v extrémnych podmienkach, je často odozvou metabolizmu na svoju obranu a adaptáciu na nepriaznivé, a často až veľmi nepriaznivé podmienky v prostredí, kde sa vyskytujú potenciálne toxické kovy. Produkciou organických kyselín mikroskopické vláknité huby umožňujú uvoľňovanie kovov, v dôsledku čoho ich môžu ľahšie naviazať v procese chelatizácie do komplexných zlúčenín (YE et al. 2020, YIN et al. 2017). Chelatizácia kovov sa uskutočňuje naviazaním týchto prvkov na aniónové funkčné skupiny (karboxylové, hydroxylové), ktoré sa vyskytujú na povrchu bunky (ADELEKE et al. 2017). Práve mikroorganizmy adaptované takýmto spôsobom na nevhodné podmienky, majú veľkú schopnosť odstraňovať kontamináciu z prostredia rôznymi dekontaminačnými procesmi (COLPAERT 2008). Kyselina šťaveľová a kyselina citrónová napr. účinne odstraňujú kovy, ako meď, zinok, hliník, olovo a iné, z kontaminovaných pôd (ADELEKE et al. 2017, KIM et al. 2016).

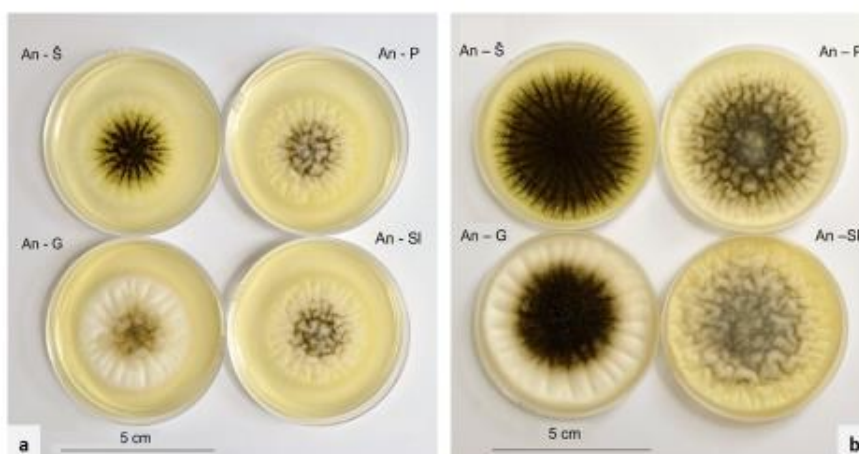
Zaujímavosťou zo získaných výsledkov je, že kontrolný kmeň An-G, ktorý pochádzal z nekontaminovaného prostredia, kyselinu šťaveľovú vôbec neprodukoval (Obr. 28 A). Enzým zodpovedný za tvorbu oxalátu u druhu *Aspergillus niger*, oxalacetát-acetylhydroláza (OAH), štiepi oxalacetát na oxalát a acetát. Počas desaťdňovej kultivácie kmeňov sme acetát v kultivačnom roztoku vôbec nezaznamenali. Keďže acetát sa v roztoku nenachádzal, v živnom médiu rýchlo kleslo pH roztoku, čo uľahčilo syntézu kyseliny citrónovej. Z faktorov prostredia, ktoré spúšťajú akumuláciu kyseliny citrónovej, sa za najdôležitejšie považujú: nadmerná koncentrácia zdroja uhlíka, vysoká hladina rozpusteného kyslíka, nízke pH a optimálna koncentrácia amoniaku, fosfátu a určitých stopových kovov (SHANKAR et SIVAKUMAR 2016). V prípade nášho experimentu začala produkcia kyseliny citrónovej pri $\text{pH} < 3,5$ (Obr. 23 a-d). Za dôležité faktory ovplyvňujúce produkciu organických kyselín mikroskopickými hubami v prírodnom prostredí sú považované fyzikálno-chemické vlastnosti pôdy, vrátane pH, a obsah kovových prvkov (DINH et al. 2017). V laboratórnych podmienkach je, s najväčšou pravdepodobnosťou, hlavným, resp. určujúcim faktorom, pH

kultivačného roztoku, ktoré ovplyvňuje produkciu kyseliny šťaveľovej (WALASZCZYK et al. 2018).

V dôsledku veľkého záujmu o organické kyseliny a ich využitie v priemysle, kde významnú úlohu zohráva práve *Aspergillus niger*, sa sledovala produkcia kyseliny šťaveľovej pod vplyvom rôznych faktorov. S cieľom zabezpečiť čo najefektívnejšiu metódu produkcie z hľadiska ekonomického a praktického, sú kmene *Aspergillus niger* často v laboratóriu geneticky aj fyziologicky modifikované. Na produkciu kyseliny šťaveľovej použili laboratórne zmutovaný kmeň *Aspergillus niger*, ktorému chýbala glukózooxidáza, čo malo zabrániť, aby došlo k ovplyvneniu s produkciou kyseliny glukonovej, napr. RUIJTER et al. (1999). Optimálnu produkciu kyseliny šťaveľovej dosiahli pri pH v rozmedzí od 4 do 6. Hodnota pH nižšia ako 1,5 mala za následok výrazný pokles množstva vyprodukovanej kyseliny šťaveľovej. EMILIANI et BEKES (1964) nedostatok oxalátu pri nižších hodnotách pH vysvetľujú zistením, že keď má kultivačné médium pH pod hodnotu 2,5, syntetizuje sa oxalát dekarboxyláza, čo je enzým degradujúci oxalát na CO₂ a kyselinu mravčiu. MANDAL et BANERJEE (2005) maximálnu produkciu kyseliny šťaveľovej v glukózovom médiu druhom *Aspergillus niger* zaznamenali pri pH hodnote 6.

5.9 Vplyv anorganických práškových látok na veľkosť a morfológiu peliet kmeňov druhu *Aspergillus niger*

Kmene mikroskopických vlákňitých húb môžu mať rozdielne makromorfologické a mikromorfologické vlastnosti aj v rámci jedného druhu. Na experiment s peletami sme použili štyri vybrané kmene druhu *Aspergillus niger*, ktoré sa odlišovali nielen na molekulovej úrovni, ale aj na úrovni makromorfologickej (Obr. 29 a, b).



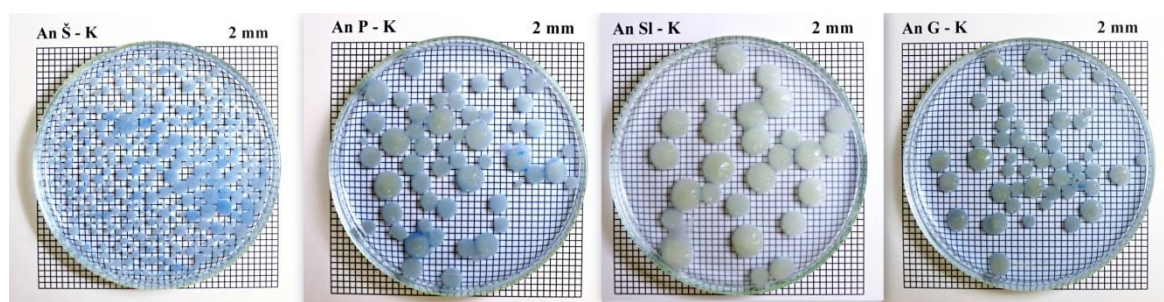
Obr. 29. Sporulácia kmeňov druhu *Aspergillus niger* na tretí (a) a piaty (b) deň kultivácie. (S. Nosalj).

Výrazné rozdiely v sporulácii sme potvrdili aj spočítaním konídií v Bürkerovej komôrke (Tab. 8). Kmeň An-Š mal v porovnaní s ostatnými kmeňmi najväčší, a to viac ako dvojnásobný, počet konídií a kontrolný kmeň An-G najmenší počet konídií. Tieto rozdiely sa premietli aj do počtu vytvorených peliet, kedy sme ich maximum v SBD roztoku bez pridania anorganických práškov zistili u kmeňa An-Š (Tab. 8).

Tab. 8. Priemerný počet konídií kmeňov druhu *Aspergillus niger* stanovený v Bürkerovej komôrke

Kmeň	An-Š	An-P	An-SI	An-G
Počet konídií v 1×10^2	8,07	3,12	3,64	3,02
Počet peliet	235	52	26	51

Peliety testovaných kmeňov druhu *Aspergillus niger* ilustrujú jednak značný rozptyl vo veľkosti navzájom, ale zároveň relatívne malý rozdiel vo veľkosti peliet na jednej Petriho miske, t. j. v rámci jedného kmeňa (Obr. 30).



Obr. 30. Kultivácia peliet kmeňov druhu *Aspergillus niger* bez prídavku anorganických práškov. (Nosalj et al. 2020).

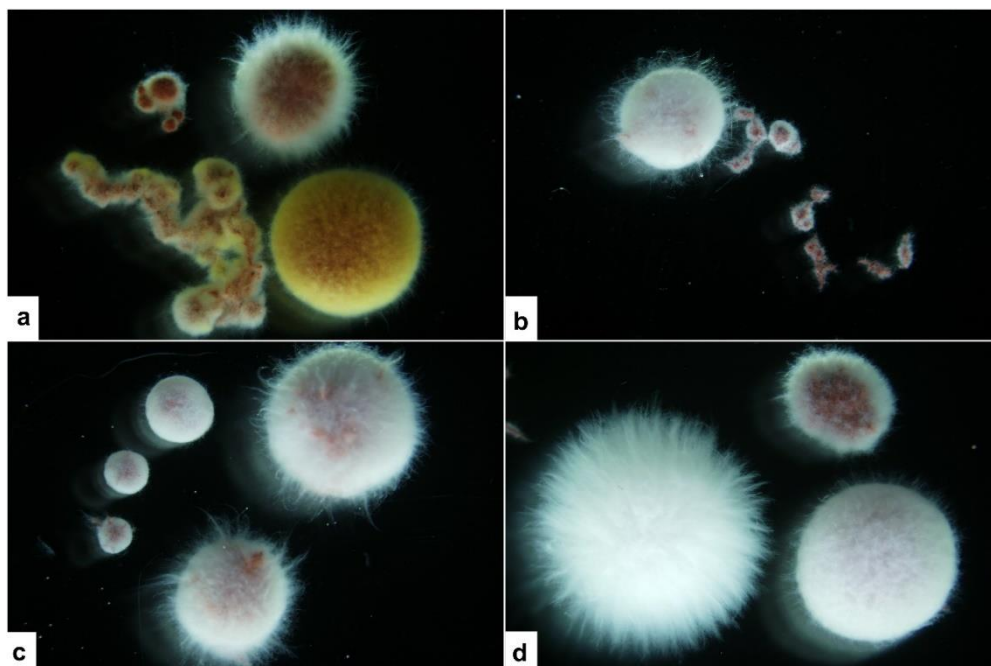
Konečné veľkosti peliet kmeňov druhu *Aspergillus niger* po kultivácii s prídavkom anorganických práškov dokumentuje Tab 9. Z nej je zrejmý značný rozptyl priemerných hodnôt. Pomer priemerných veľkostí najväčších a najmenších je na úrovni 3,34. U peliet získaných kultiváciou s práškovými látkami sa tento pomer pohybuje v rozsahu 1,30 až 4,00. Najmenší (prvá hodnota) je u peliet získaných v prítomnosti montmorillonitu, najväčší (druhá hodnota) v prítomnosti oxidu železitého. S výnimkou peliet získaných v prítomnosti prírodného zeolitu a syntetického oxidu železitého, sa však tieto pomery pohybujú v pomerne úzkom intervale 1,30 až 1,76. Na základe toho je možné predpokladať, že tento typ látok tlmí pôvodné rozdiely pozorované v rámci kontrolnej skupiny peliet.

Tab. 9. Priemerné veľkosti peliet v mm kmeňov druhu *Aspergillus niger* kultivovaných v prítomnosti mikročastíc anorganických látok (Nosalj et al. 2020).

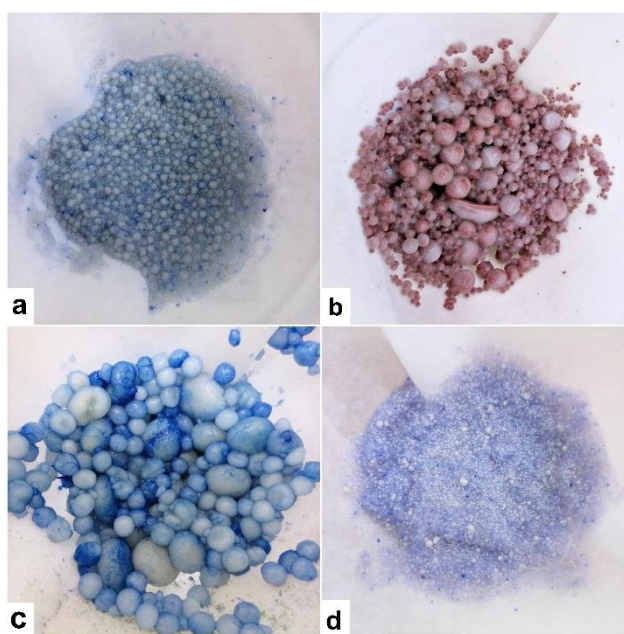
Anorganické látky	Kmene druhu <i>Aspergillus niger</i>			
	An-Š	An-P	An-Sl	An-G
TiO ₂	5,12	6,11	5,16	3,81
Fe ₂ O ₃	4,11	1,21	1,93	2,87
SiO ₂	7,80	13,75	11,21	8,88
Prírodný zeolit	1,68	2,36	1,27	4,96
Na-mordenit	8,27	7,33	12,50	12,00
NaY zeolit	9,62	6,85	6,86	7,10
Na-ZSM-5 zeolit	8,06	6,12	8,20	5,40
Montmorillonit	1,01	1,04	1,04	1,02

Legenda: Na-ZSM-5 (Zeolite Socony Mobil-5) - syntetický zeolitový katalyzátor s vysokým obsahom oxidu kremičitého.

Porovnaním kontrolných vzoriek (bez anorganických častíc) so vzorkami, ktoré sme získali po kultivácii v prítomnosti anorganických látok, sme získali rôzne hodnoty. Znamená to, že na jednej strane vplyvom anorganických častíc dochádzalo k zväčšeniu peliet a na strane druhej tiež k zmenšeniu. Pre porovnanie veľkosti peliet musíme brať do úvahy aj rozptyl ich veľkostí v rámci jednej vzorky. Všeobecne však tento rozptyl nepresahuje jeden rád. Veľkosť najväčších a najmenších častíc však väčšinou nepresahuje pomer 4 : 1. U kontrolných vzoriek sa tento rozptyl pohybuje v rámci intervalu 2,5 až 4,5 k 1. V prípade vzoriek kmeňa An-Š v prítomnosti anorganických častíc je rozptyl pomeru 1,3 až 3,0 k 1, u vzoriek kmeňa An-P 0,86 až 10,0 k 1, u vzoriek kmeňa An-G 2,0 až 6,0 k 1 a u vzoriek kmeňa An-Sl 1,75 až 4,0 k 1. Výnimku z relatívne úzkeho intervalu pomerov predstavuje jediná vzorka, a to kmeň An-Š v prítomnosti Fe₂O₃, u ktorej je tento pomer 10 : 1 (Obr. 31 a-d a 32 a-d).



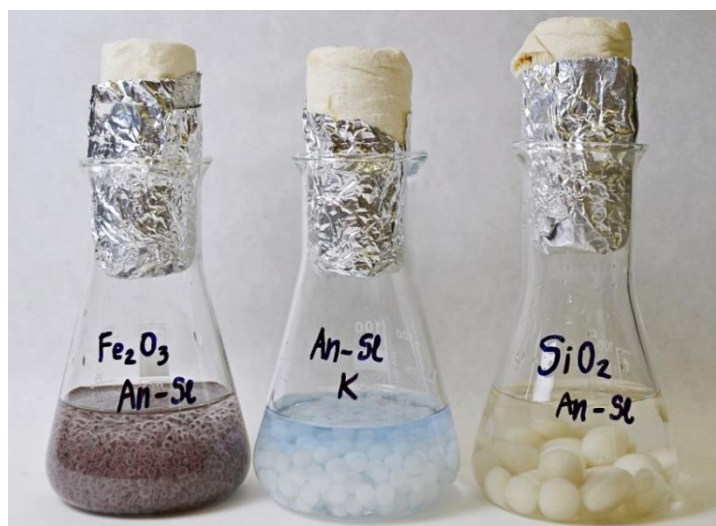
Obr. 31. Variabilita veľkosti peliet kmeňov druhu *Aspergillus niger* An-Š (a), An-P (b), An-G (c) a An-SI (d) v prítomnosti Fe_2O_3 (zv. 0,73x). (Mgr. M. Martinka, PhD.).



Obr. 32. Prefiltrované peliety kmeňov druhu *Aspergillus niger* po kultivácii s anorganickými časticami, kmeň An-Š po kultivácii so zeolitom (a) a Fe_2O_3 (b), kmeň An-G po kultivácii so zeolitom (c) a montmorillonitom (d). (S. Nosalj).

Z hľadiska priemyselného využitia peliet je ich morfológia veľmi dôležitá (DRIOUCH et al. 2011, NAIR et al. 2016, GARCIA-REYES et al. 2017). Veľkosť a tvar peliet závisí od

viacerých faktorov. Je to napr. druh mikroskopickej vláknaitej huby, rýchlosť otáčok, pri ktorých sa pelety formujú počas kultivácie, premiešavanie a prevzdušnenie celého systému, zloženie živného média a jeho pH, ale aj prídavok rôznych mikročastíc, čo dokumentuje aj Obr. 33.



Obr. 33. Kultivácia peliet kmeňa An-Sl s prídavkom Fe_2O_3 a SiO_2 v porovnaní s kontrolnou vzorkou. (S. Nosalj).

Ak zohľadníme hodnoty modusu, mediánu a rozpätia veľkostí peliet (Tab. 10), je zrejmé, že ílový minerál montmorillonit výrazne redukuje veľkosť peliet, a to bez ohľadu na použitý kmeň druhu *Aspergillus niger*. K rovnakým záverom dospeli aj FOMINA et GADD (2002). Podobný, avšak menej výrazný vplyv, má aj prírodný zeolit. Vplyv ostatných anorganických látok je buď nevýrazný, alebo veľmi diferencovaný v závislosti na type anorganickej látky a zdrojovej lokalite uvedeného kmeňa mikroskopickej vláknaitej huby. Veľmi diferencovaný vplyv možno ilustrovať na vzorkách kmeňa An-Š, u ktorých väčšina práškov veľkosť peliet výrazne zväčšuje. Tento nárast predstavuje približne dvoj- až päťnásobok hodnôt modusu a mediánu. Výnimkou je, okrem už spomenutého montmorillonitu, prírodný zeolit, ktorý túto hodnotu nevýrazne znižuje. Vzorky kmeňa An-P väčšinou veľmi nevýrazne zvyšujú tieto hodnoty, u vzoriek An-Sl zväčša dochádza k poklesu veľkosti peliet. Na druhej strane, u vzoriek kmeňa An-G sú tieto zmeny nevýrazné (Tab. 10).

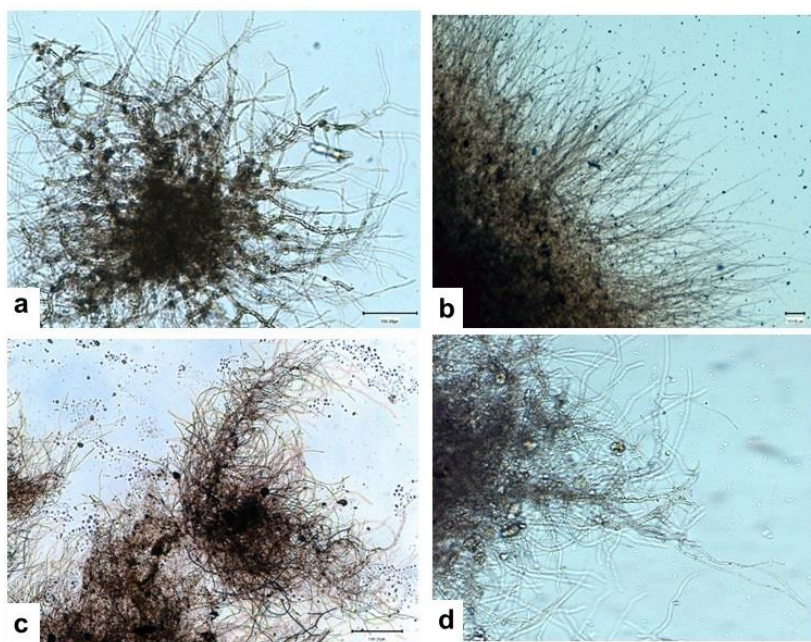
Tab. 10. Charakteristiky veľkosti peliet v mm kmeňov druhu *Aspergillus niger* po kultivácii s anorganickými látkami.

An-Š					
	Priemer	Modus	Medián	Rozpätie veľkosti peliet	Počet peliet
Kontrolná vzorka	2,44	2	2	2 - 6	235
TiO ₂	5,12	5	5	4 - 8	147
Fe ₂ O ₃	4,11	2	2	2 - 6	78
SiO ₂	7,80	4	10	4 - 14	26
Prírodný zeolit	1,68	1	2	1 - 3	742
Na-mordenit	8,27	10	9	6 - 10	11
NaY zeolit	9,62	8	8	8 - 14	16
Na-ZSM-5 zeolit	8,06	8	8	4 - 11	15
Montmorillonit	1,02	1	1	1 - 2	1000
An-P					
Kontrolná vzorka	5,82	6	6	2 - 9	52
TiO ₂	6,11	7	6	3 - 8	42
Fe ₂ O ₃	1,21	1	1	1 - 10	244
SiO ₂	13,75	6	6	6 - 7	4
Prírodný zeolit	2,36	2	2	1 - 4	404
Na-mordenit	7,33	8	8	4 - 10	34
NaY zeolit	6,85	5	5	5 - 13	40
Na-ZSM-5 zeolit	6,12	6	6	4 - 8	49
Montmorillonit	1,04	1	1	1 - 2	1000
An-Sl					
Kontrolná vzorka	8,15	9	85	4 - 10	26
TiO ₂	5,16	5	5	4 - 7	24
Fe ₂ O ₃	1,93	2	2	2 - 8	178
SiO ₂	11,21	8	10	8 - 14	12
Prírodný zeolit	1,27	1	1	1 - 3	574
Na-mordenit	12,50	10	10	6 - 18	12
NaY zeolit	6,86	4	6	4 - 14	42
Na-ZSM-5 zeolit	8,20	8	8	6 - 12	20
Montmorillonit	1,04	1	1	1 - 2	1000
An-G					
Kontrolná vzorka	5,11	5	5	3 - 8	51
TiO ₂	3,81	3	4	2 - 12	134
Fe ₂ O ₃	2,87	2	2	2 - 10	101
SiO ₂	8,88	2	7	2 - 10	9
Prírodný zeolit	4,96	5	5	2 - 12	90
Na-mordenit	12,00	-	-	8 - 28	3
NaY zeolit	7,10	6	6	5 - 11	31
Na-ZSM-5 zeolit	5,40	5	6	1 - 7	5
Montmorillonit	1,02	1	1	1 - 2	1000

Legenda: Na-ZSM-5 (Zeolite Socony Mobil-5) – syntetický zeolitový katalyzátor s vysokým obsahom oxidu kremičitého.

Anorganické látky použité v experimentoch sa výrazne líšia mnohými vlastnosťami. Pravdepodobne však žiadna z nich nezohráva pri tvorbe peliet natoľko významnú úlohu, aby jednosmerne ovplyvnila ich veľkosť buď smerom k zmenšeniu, alebo k zväčšeniu. Pri hľadaní vysvetlenia výnimočného postavenia ílového minerálu montmorillonitu, ktorý veľkosť peliet mikroskopických vláknitých húb vo všetkých prípadoch vo väčšom alebo menšom rozsahu vždy znižuje, sa ponúka jediné, a to súvisiace s veľkosťou častíc tohto minerálu. Na rozdiel od ostatných anorganických práškových látok, sa častice montmorillonitu vo vodných roztokoch rozpadajú na výrazne menšie častice (v porovnaní s primárnou veľkosťou častíc iných skúmaných látok). Zmenšenie veľkosti peliet môže byť preto dôsledkom sférických obmedzení pri raste peliet. Zároveň nie je vylúčené, že určitú úlohu tu zohrávajú aj medzifázové interakcie medzi povrchmi vlákien húb a povrchom častíc ílového minerálu. Tie môžu súvisieť s iónovýmennými vlastnosťami montmorillonitu. Vzhľadom na výrazne menšiu veľkosť jeho častíc v porovnaní so zeolitmi, by mohol byť tento efekt omnoho výraznejší.

Morfológia peliet zahŕňa tvar a hustotu vlákien v jadre a tiež tvar a hustotu difúzneho rozhrania, pričom vonkajšia časť pelety predstavuje oblasť životaschopných vlákien (Obr. 34 a-d).



Obr. 34. Anorganické častice včlenené do časti peliet. Kmeň An-G (a) s montmorillonitom, kmeň An-G (b) s TiO_2 , kmeň An-P (c) so zeolitom a kmeň An-Š (d) s montmorillonitom. (mierka 100 μm). (A. Šimonovičová).

V rámci vykonaných experimentov je variabilita tvarov a veľkosti peliet pomerne široká, a to aj u peliet kultivovaných bez anorganických práškov. Preto je tu pomerne ťažké spozorovať nejaký všeobecný trend. Anorganické častice sú včlenené do všetkých častí peliet, čo znamená, že medzifázové interakcie na rozhraní styku vlákien a častíc sú veľmi pravdepodobné. Tieto interakcie môžu tiež súvisieť s iónovými vlastnosťami montmorillonitu (ŠIMONOVICHOVÁ et al. 2020).

Za pozornosť stojí tiež pomerne výrazný rozdiel medzi veľkosťami peliet kultivovaných v prítomnosti prírodného a syntetických zeolitov, ktorý sme pozorovali u všetkých štyroch kmeňov druhu *Aspergillus niger*. V prípade syntetických zeolitov je táto veľkosť vždy väčšia. Oba typy zeolitov sa vo veľkostiach častíc nelíšia, a navyše si ju na rozdiel od montmorillonitu aj zachovávajú. S najväčšou pravdepodobnosťou bude tento rozdiel súvisieť so zložením kultivačného roztoku v bezprostrednej blízkosti vlákien mikroskopických vláknitých húb, čo je možné vysvetliť výrazným rozdielom špecifického povrchu a pórovitej štruktúry oboch typov zeolitov.

5.10 Kmen *Aspergillus niger* An-L18 a jeho pôvod

Kmen An-L18 bol izolovaný v roku 2018 z kalu laguny R3 v Ostrave (Obr. 35).

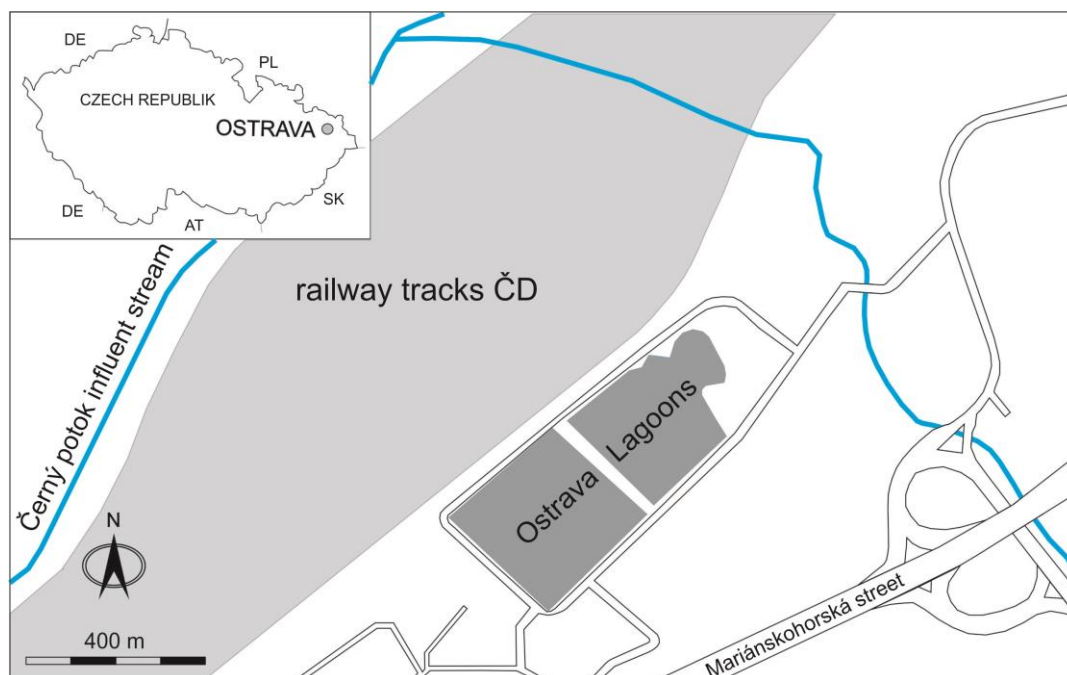


Obr. 35. Odběr vzorků z laguny, ze kterých byly izolovány indigenní mikroorganismy včetně kmene *Aspergillus niger* An-L18 (H. Vojtková).

Ostravské laguny byly desítky let rozhodně jednou z největších ekologických zátěží v České republice, podle dostupných údajů v nich bylo uloženo více než 200 000 tun

kontaminovaných kalů, které obsahovaly kromě extrémně vysokého podílu organických polutantů také další toxické kovové prvky, např. arsen, kadmium, měď, rtuť, nikl a olovo.

Laguny v Ostravě, také známé pod názvem „Laguny Ostramo“, se rozkládaly v městské části Moravská Ostrava na ploše téměř 7 ha (Obr. 36 a 37) a tvořily je nebezpečné skládky odpadů, které vznikaly z rafinérské výroby koncem 19. století. Základem pro ukládané odpady byly odpadní látky vznikající z procesu rafinace a separace ropy na petrolej a topný olej, z výroby parafinu a mazacích olejů. Odpadní hmoty byly postupně naváženy do otevřených nádrží se sypanými obvodovými hrázemi. Od roku 1965 zde byl ukládán především odpad vznikající při procesu regenerace upotřeбенých mazacích olejů v podniku OSTRAMO Ostrava. Od konce 70. let bylo zvažováno ukončení provozu především z důvodu opakujících se havarijních úniků látek z lagun a v souvislosti s tím zvyšujícího se negativního vlivu na životní prostředí, avšak v roce 1992 v důsledku změny majitele podniku na soukromou firmu OSTRAMO-Vlček a spol., s. r. o., zde začaly být navíc ukládány odpady pocházející také z dalších průmyslových procesů v Ostravě, a to především z chemické výroby této firmy.



Obr. 36. Laguny Ostrava (H. Vojtková).



Obr. 37. Laguny Ostrava, stav v roce 2018; zachována je již pouze laguna R3. Laguny R1 a R2 byly postupně odtěžovány, v přední části je umístěná skládka zemin (H. Vojtková).

Skládku Laguny Ostrava tvořil původně komplex čtyř lagun, R1, R2, R3 byly odděleny hrázemi se zemními valy o výšce cca 5 m nad okolním terénem a laguna R0 se rozkládala v jámě zemníku bývalé cihelny (Obr. 38 – 40).



Obr. 38. Laguny Ostrava – pohled na obsah lagun (H. Vojtková).



Obr. 39. Laguny Ostrava – laguna R2 (a) a R3 (b). (H. Vojtková).

Provoz skládky byl oficiálně zastaven v roce 1996. Vzhledem k tomu, že rozsah sanačních opatření přerostl technické a finanční možnosti privátní společnosti, vládním usnesením č. 626 z roku 1996 bylo rozhodnuto o převzetí ekologické zátěže státem. Správou, přípravou a zajištěním sanace skládky byl pověřen státní podnik DIAMO (VOJTKOVÁ 2014).



Obr. 40. Odpad ukládaný v lagunách často nebylo možné přesně identifikovat (H. Vojtková).

Existence této laguny byla potvrzena analýzou rizik až v roce 1999. Laguny byly založeny na povodňových náplavových materiálech údolní nivy, resp. na navážkách bez izolace dna a drenážního systému. Dodatečné odizolování lagun bylo provedeno až v letech

1972 – 1992 podzemní těsnicí stěnou. V roce 1994 byla uvedena do provozu čistírna odpadních haldových vod čerpaných z prostoru mezi těsnicími stěnami a v nezbytném rozsahu bylo také zahájeno čerpání volné kapalně fáze ropných látek na hladině podzemní vody vně těsnicí stěny.

V roce 2003 byl vyhlášen projekt k zamezení šíření kontaminace ropných látek vně těsnicích stěn, zahrnující drenážní systém s dekontaminací čerpaných a zapouštěných podzemních vod a monitorovací systém hydrogeologických vrtů na výstupu podzemní vody z této lokality. Drenážní systém byl od roku 2004 uveden do trvalého provozu a jeho provozovatelem se stala firma AQUATEST a.s., člen „Sdružení Čistá Ostrava“, která byla vybraným dodavatelem sanace lagun podle schváleného Realizačního projektu „Nápravná opatření – laguny Ostramo“.

Realizační projekt „Nápravná opatření – laguny Ostramo“ řešil nápravu ekologické zátěže v následujícím rozsahu:

- využití ropných kalů přepracováním na palivové směsi,
- odstranění nebezpečných vlastností kontaminovaných zemin nepřímou termickou desorpčí,
- sanace kontaminovaného okolí lagun ve vymezených prostorech v navážkách technologií promývání horninového prostředí roztokem biotenzidu a ve šterkopískovém kolektoru hydraulickou sanací a technologií biodegradace in situ,
- rekultivace v souladu s územním plánem na les zvláštního určení (VOJTKOVÁ 2014, 2015).

Odtěžování lagun začalo v roce 2004. V roce 2011, kdy bylo vytěženo na 200.000 tun kalů, se odtěžování zastavilo. Ukázalo se, že v lagunách byly uloženy ještě další desítky tisíc tun odpadu v odhadovaném objemu přibližně 91 562 tun. Tyto, tzv. „nadbilanční kaly“, odstraňovala společnost AVE CZ odpadové hospodářství s.r.o. a jejich vytěžování z lagun bylo dokončeno až v roce 2020 (<https://www.ostrava.cz>).

Sanací lagun v Ostravě byla pověřená firma DIAMO, státní podnik, která dohlížela na odtěžbu a vývoz kalů k jejich další likvidaci. Současně tento státní podnik prováděl pravidelný monitoring podzemních vod v prostoru lagun a blízkém okolí. Pilotním pokusem kolmatace saturované zóny včetně zpracování prováděcího projektu provizorního zatěsnění stávající podzemní stěny byl pověřena firma MEGA, a.s., odstraňováním nadbilančních kalů

byla pověřená firma AVE CZ odpadové hospodářství, s.r.o., která v této věci uzavřela smlouvu na energetické využití – odstranění kalů s německou firmou MUEG Mitteldeutsche Umwelt – und Entsorgung GmbH. Nadbilanční kaly byly po úpravě průběžně předávány ke konečnému využití do elektrárny Schwarze Pumpe, kterou provozuje firma LEAG (Lausitz Energie Kraftwerke AG) v Německu.

Aktuální stav plnění zakázky na odstranění nadbilančních kalů dle prováděcí smlouvy bylo pravidelně projednáváno na Zastupitelstvu města Ostravy. Dle informací na portálu www.ostrava.cz bylo k 31. prosinci 2019 společností AVE CZ, odpadové hospodářství s.r.o. odvezeno z areálu lagun 30 755 tun upravených kalů k ekologické likvidaci, zbývající množství kalů do celkového objemu 91 562 tun pak bylo postupně odtěžováno, upravováno a přepravováno ve speciálních kontejnerech v průběhu celého roku 2020.

Co se týče následné sanace zemin, Krajský úřad města Ostravy požádal vládu ČR, aby zadala Ministerstvu životního prostředí ČR změnu stanoviska ke způsobu sanace, aby další způsob sanace probíhal jinak než původně navrhovaným zapouzdřením podlimitně kontaminovaného materiálu do sanančního zařízení, tzv. ekokontejmentu. O uvedeném postupu však dosud nebylo rozhodnuto.

Sanace saturované zóny probíhala na lagunách metodou hydraulické sanace, t. j. odčerpáváním volné fáze ropných uhlovodíků a biodegradací s promýváním horninového prostředí. Čerpané srážkové vody a podzemní vody z prostoru uvnitř podzemní těsnicí stěny byly postupně dekontaminovány na čistírně lagunových vod a čerpané podzemní vody z prostoru vně podzemní těsnicí stěny na dekontaminační stanici. Průběh sanace saturované zóny byl monitorován, v rámci monitorovacích prací byl prováděn monitoring podzemních vod mimo přímý dosah sanačního zásahu, monitoring průběhu procesu a efektivity sanace podzemních vod v místech přímého znečištění, monitoring dekontaminační stanice, technologický monitoring provozu čistírny lagunových vod a hygienický monitoring.

Sanace kontaminovaných zemin probíhala pod dohledem státního podniku DIAMO, který vyhlásil veřejnou soutěž na zakázku „Projekt konečného stavu sanace lagun Ostramo“. Vítězem veřejné zakázky se stala společnost AWT Rekultivace, a.s. Studie proveditelnosti pod názvem „Způsoby sanace nesaturované zóny lokality laguny Ostramo Ostrava“ byla následně projednána v Komisi životního prostředí Rady města Ostravy a ta se rozhodla upřednostnit takové varianty sanace lagun, které zaručí celkovou dekontaminaci předmětné lokality s vyloučením rizika kontaminace okolního prostředí včetně podzemních vod tak, aby v době realizace prací byli co nejméně obtěžováni obyvatelé města Ostravy, a aby sanační práce byly ukončeny nejpozději do konce roku 2019. V průběhu realizace této

rozsáhlé sanační akce docházelo k celé řadě dílčích rozhodnutí a posuzování postupů prací včetně odborných stanovisek a s nimi souvisejících úprav režimů v rozsahu prováděných sanací i souvisejících monitoringů.

Těžba odpadů po rafinérii v Mariánských Horách nakonec skončila v roce 2020 po více než 16 letech. I když ještě pokračují další sanační práce, pro obyvatele města Ostravy je dokončení těžby kalů z ostravských lagun zásadním milníkem v nápravě této desítky let staré ekologické zátěže.

5.11 Aktivita kmene An-L18 v biodegradaci PAHs

Tato studie zahrnovala testování biodegradačních schopností kmene An-L18 vůči vybraným polycyklickým organickým uhlovodíkům, které byly detekovanou součástí organického znečištění kalů z lagun Ostrava – acenafthenu, anthracenu, benzo[*a*]anthracenu, benzo[*b*]fluoranthenu, benzo[*k*]fluoranthenu, benzo[*a*]pyrenu, benzo[*ghi*]perylenu, dibenz[*a,h*]anthracenu, fluoranthenu, fluorenu, chrysene, indeno[1,2,3-*cd*]pyrenu, naftalenu, fenanthrenu, pyrenu.

PAHs vykazují v přírodě nejvyšší strukturální rozmanitost ve srovnání s jakoukoli jinou třídou nehalogenovaných molekul v biosféře. Navíc se předpokládá, že s pokračující těžbou a využíváním ropy bude množství těchto uhlovodíků v životním prostředí stále stoupat (ARUN et al. 2008).

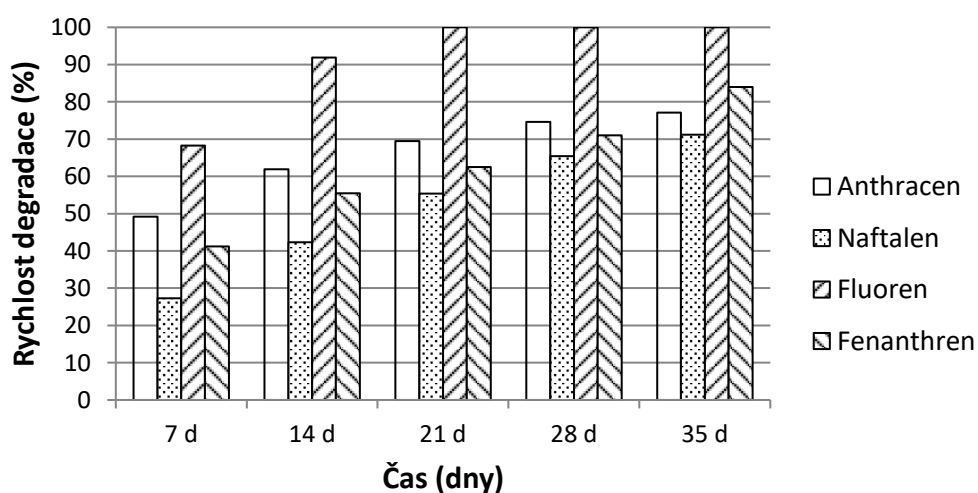
V přírodních matricích jsou tyto látky jen obtížně degradovatelné a jejich vytrvalost se zvyšuje s jejich molekulovou hmotností. Tyto sloučeniny tedy představují vážný problém vzhledem k jejich rozšířené přítomnosti v prostředí, k jejich perzistenci v prostředí, jejich odolnosti vůči biodegradaci, jejich potenciálu k bioakumulaci i vzhledem k jejich mutagenním a karcinogenním účinkům na živé organismy (BELL 2014, HARITASH et KAUSHIK 2009).

K experimentům biodegradace PAHs byly použity experimentální chemikálie (s čistotou > 98 %): acenafthen, anthracen, benzo[*a*]anthracen, benzo[*b*]fluoranthén, benzo[*k*]fluoranthén, benzo[*a*]pyren, benzo[*ghi*]perylen, dibenz[*a,h*]anthracen, fluoranthén, fluoren, chysen, indeno[1,2,3-*cd*]pyren, naftalen, fenanthren, pyren, vše od společnosti Sigma-Aldrich®, USA, analytický standard. Ostatní běžné chemikálie včetně rozpouštědel analytické kvality byly zakoupeny u společnosti Merck KGaA Co., Německo. Zásobní roztoky PAHs (100 mg/l) byly vyrobeny rozpuštěním v dimetylformamidu a roztoky byly sterilizovány membránovou filtrací pomocí mikrofiltrů Millipore o velikosti pórů 0,22 µm a

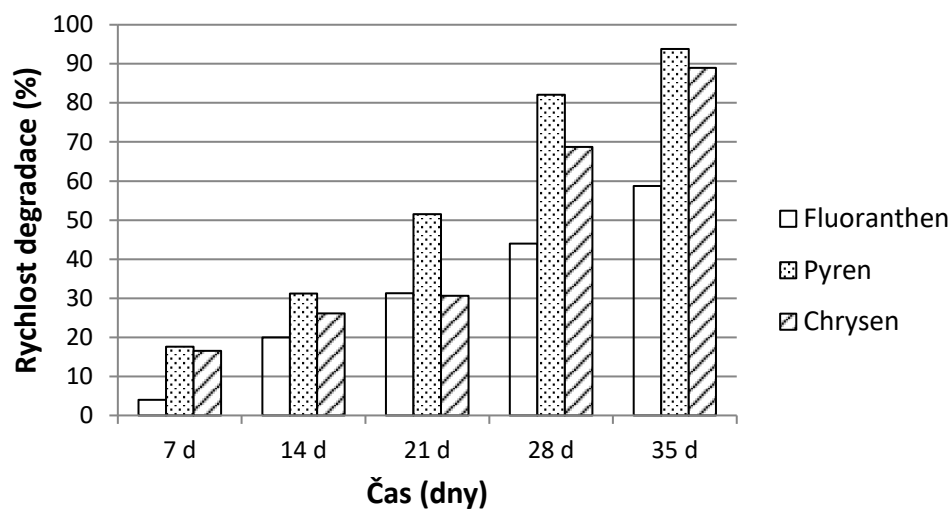
dále byly použity pro přípravu finálního média k testování schopnosti biodegradace PAHs pomocí An-L18.

Na začátku každého biodegradačního experimentu bylo do každé baňky obsahující 90 ml sterilního média s organickou znečišťující látkou naočkováno 10 ml spor hub v tekutém médiu Czapek Dox Broth (HiMedia Laboratories Ltd., Mumbai, India). Biodegradační experimenty probíhaly formou statické kultivace při teplotě 20 °C po dobu 35 dnů. Koncentrace zbytkového PAHs v kulturách byly analyzovány po 0, 1, 2, 3, 4, 5 týdnech růstu pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC) s fluorescenční detekcí. Procento biodegradace bylo vypočteno jako rozdíl mezi zbytkovou koncentrací PAHs v kontrolním vzorku (bez přítomnosti An-L18) a zbytkovou koncentrací PAHs v experimentálním vzorku. Biodegradační proces odbourávání PAHs byl sledován při laboratorní teplotě 20 °C, což odpovídá optimální růstové teplotě, jak bylo ověřeno u standardního kmene *Aspergillus niger* (ATCC 10864), která je uváděna v rozmezí 18 – 21 °C (CHANG et WANG 2018).

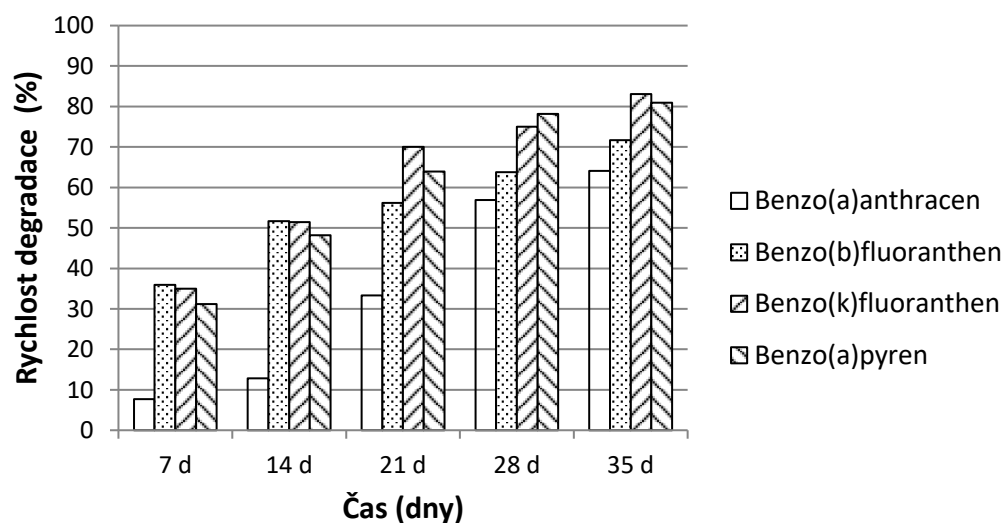
Již po prvním týdnu působení mikroskopických hub bylo zaznamenán výrazný úbytek všech organických kontaminantů v úhrnu na $69,2 \pm 2,6$ %, v druhém týdnu pak množství organických kontaminantů pokleslo na $49,3 \pm 2,8$ %, již ve třetím týdnu biodegradačních experimentů bylo zaznamenáno snížení celkového množství sledovaných organických látek pod poloviční hranici na $35,7 \pm 2,5$ % reziduí, ve čtvrtém týdnu byl zůstatek $25,4 \pm 2,2$ % a po pěti týdnech působení kmene An-L18 obsahovaly testované vzorky jen $17,8 \pm 2,8$ % organických polutantů (Obr. 41 – 44).



Obr. 41. Biodegradace nízkomolekulárních PAHs s využitím kmene An-L18.

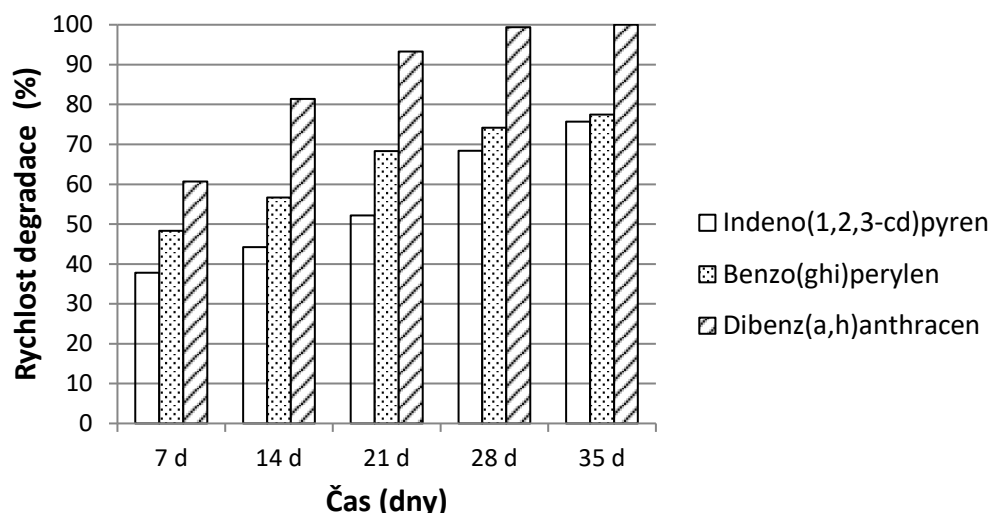


Obr. 42. Biodegradace PAHs – fluoranthen, pyren, chrysen s využitím kmene An-L18.



Obr. 43. Biodegradace vysokomolekulárních PAHs s využitím kmene An-L18: benzo[a]anthracen, benzo[b]fluoranthen, benzo[k]fluoranthen, benzo[a]pyren.

Kmen An-L18 byl pozitivní v odbourávání všech sledovaných organických kontaminantů, přičemž nejlepších výsledků bylo dosaženo u fluorenu (Obr. 41), kde již v třetím týdnu působení mikroskopických hub byla zaznamenána 100 % účinnost odstranění. Naopak, nejpomaleji byl odbouráván fluoranthen a benzo(a)anthracen (Obr. 42 a 43).



Obr. 44. Biodegradace vysokomolekulárních PAHs s využitím kmene An-L18

Ze srovnání výsledků degradace s negativními kontrolami, které byly založeny bez obsahu a působení An-L18, vyplývají zanedbatelné abiotické ztráty u většiny testovaných kontaminantů, jen u fluorenu se projevila abiotická ztráta přibližně 22 %.

I když enzymatická biodegradace polycyklických aromatických uhlovodíků kmeny hub dosud nebyla spolehlivě popsána, bylo ověřeno, že rychlost a biodegradační dráhy PAHs přímo souvisí s podmínkami prostředí pro enzymatickou aktivitu a růst degradujících hub. Rychlost degradace závisí především na systému, kde k degradaci dochází buď *ex-situ* nebo *in-situ*, i na povaze a chemické struktuře znečišťující látky. Rovněž je třeba zdůraznit aktivitu a mechanismy působení enzymů degradujících PAHs. Pro pochopení optimálních podmínek působení intra- i extracelulárních enzymů v metabolismu hub je nutné zvážit interakci celé řady faktorů: dostupnosti živin, pH prostředí, teploty, chemické struktury sloučeniny, vlastnosti buněčného transportu i zastoupení růstových faktorů v prostředí (SINGH et WARD 2004).

Četné výzkumy ukázaly, že klíčovou úlohu v počáteční oxidaci PAHs u hub mají především extracelulární peroxidázy (ACEVEDO et al. 2011, BETTS 2012, KADRI et al. 2017). Velmi významnými enzymy jsou také lakázy, které houby vylučují do okolní půdy. Z dalších biodegradačních enzymů byly u hub potvrzeny hydrolázy, lipázy, proteázy, dio- a monooxygenázy, např. cytochrom P450 (BALAJI et al. 2014). Vysoká produkce lakáz se ukazuje jako charakteristická právě pro rod *Aspergillus* (IQBAL et al. 2018) a zřejmě je klíčová při odbourávání PAHs, zejména fenantrenu, anthracenu, fluoranthenu a pyrenu (OMAKA et KALU 2009).

Mikrobiální degradace se považuje za jeden z hlavních procesů přirozené sanace sedimentů kontaminovaných PAHs (HUGHES et al. 1997). Celá řada studií uvádí, že indigenní mikrobiota může mít značný potenciál v procesech biodegradace organicky kontaminovaných sedimentů (RAMSAY et al. 2000) a odstraňování některých PAHs, např. fenantrenu z tekutých fází (TAM et al. 2003). I když lze předpokládat, že účinnost biodegradace testovaných PAHs je odlišná od reálné účinnosti v kalu z lagun, zkoumání chování kmene při působení na směs PAHs má význam pro ověření jeho fenotypových vlastností ve vztahu k jeho genotypu včetně rezistentních oblastí, které odpovídají adaptačním procesům vlivem původního, organicky kontaminovaného prostředí. Některé studie ukázaly, že biodegradace PAHs může být významně snížena sorpcí na sedimenty (RAMIREZ et al. 2001), protože vysoce lipofilní PAHs mají tendenci těsně sorbovat na pevné částice kalu a tím mohou omezovat jejich dostupnost pro mikroorganismy a bránit tak uvolnění extracelulárních enzymů.

5.12 Aktivita kmene An-L18 v biodegradaci textilních azobarviv

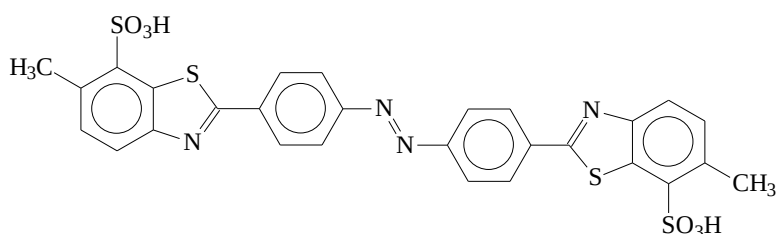
Znečištění vod je jeden z největších problémů současného světa. Textilní odpadní vody obsahují obvykle značné množství barviv, z nichž mnohá jsou azobarviva. Ročně je vyrobeno více než 7 105 tun barviv používaných v textilním průmyslu a odhaduje se, že 15 % z této celkové světové produkce je během procesu barvení vypuštěno zpět do odpadních vod (ZOLLINGER 1987). Azobarviva představují největší a nejdůležitější třídu textilních barviv, která jsou těžko biologicky rozložitelná a jejich stabilita je úměrná složitosti jejich molekulární struktury. Většina těchto barviv je toxických pro mikroorganismy (FORGACS et al. 2004). Tradiční metody čištění odpadních vod s obsahem těchto barviv (jako je srážení, adsorpce a biologický rozklad) jsou v tomto případě často neúčinné.

Testování aktivity kmene An-L18 v biodegradaci textilních azobarviv bylo zaměřeno na využití kmene k biologické degradaci červeného barviva (saturnová červen F3B 200, Direct Red 80), žlutého barviva (saturnová žlut LFF 200, Direct Yellow 28), modrého barviva (saturnová modř LBRR 200, Direct blue 71) a zeleného barviva (saturnová zeleň L5G 150, Direct green 28), vše z firmy Synthesia a.s., Česká republika. Ve všech případech se jedná o známá azobarviva, která se běžně používají pro barvení textilií, a která vykazují velmi dobrou stálost na světle.

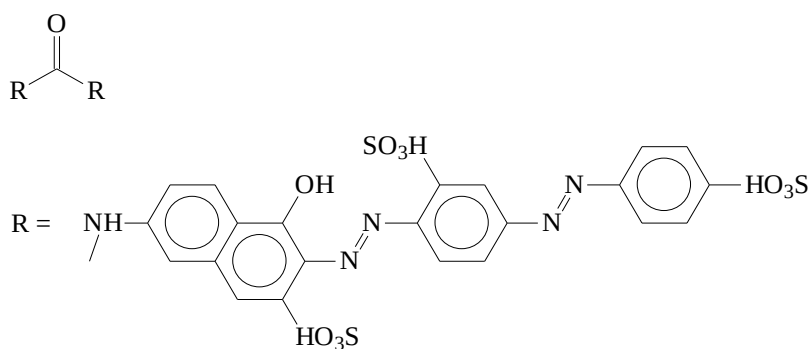
Pro experimentální práci byla uvedená azobarviva (Obr. 45 a-c) rozpuštěna v horkém padesátiprocentním pyridinu a zfiltrována. Po ochlazení se produkty vysrážely přidáním

methanolu a pevné látky se promyly methanolem. Výtěžek rekrystalizace byl asi 25 % a obsah barviv ve vzorcích dosáhl asi 90 % (stanoveno elementární analýzou). Identita vzorků byla testována pomocí tenkovrstvé chromatografie na Silufolu s 254 nm UV filtrem. Po rekrystalizaci nebyly ve vzorcích detekovány žádné nečistoty.

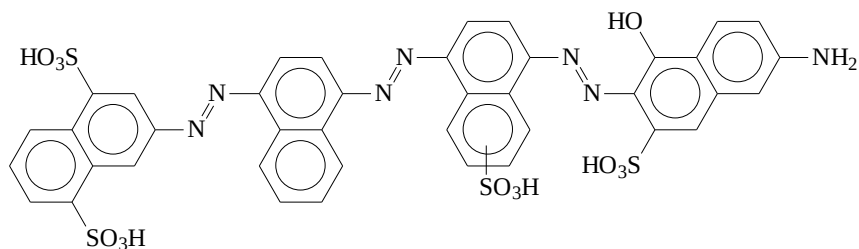
K biodegradačním experimentům byly využity spory kmene An – L18, které byly odebrány z 10-denních kultur kultivovaných v Petriho miskách na SDA (HiMedia Laboratories, Mumbai, India). Spory byly z výrazně sporulujících kolonií hub inokulovány do Erlenmayerových baněk s modelovými roztoky azobarviv. Biodegradační experimenty probíhaly formou statické kultivace vzorků po dobu 10 – 20 dní za občasného protřepání vzorků při teplotě 25 °C.



a



b

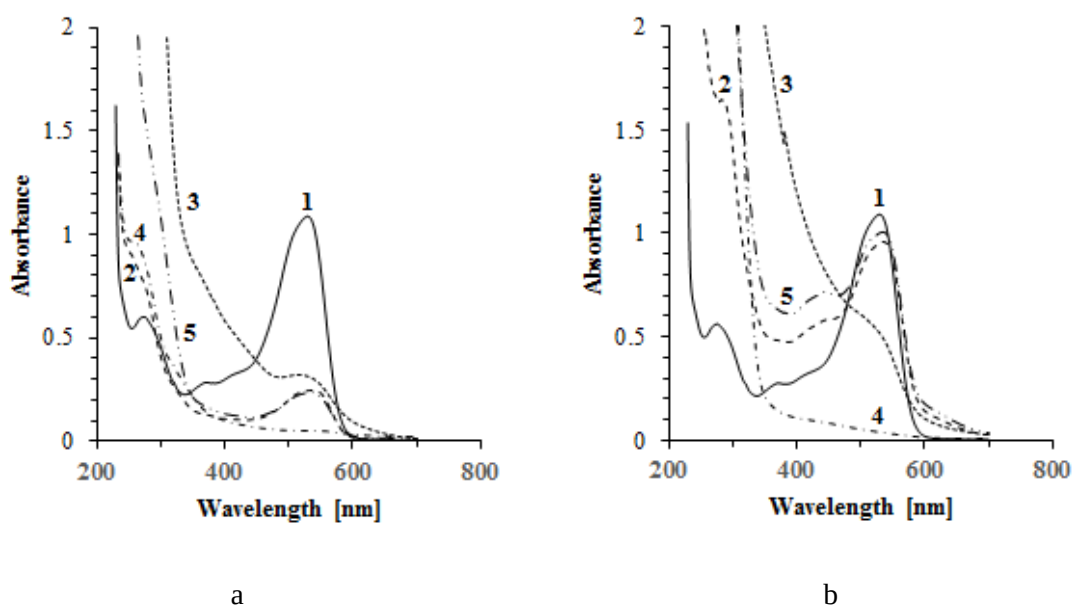


c

Obr. 45. Strukturní vzorce testovaných azobarviv: (a) Direct Yellow 28 M = 637 g.mol⁻¹, (b) Direct Red 80, M = 1241 g.mol⁻¹, (c) Direct Blue 71, M = 942 g.mol⁻¹.

Po 10 a 20 dnech biodegradačních experimentů byly vzorky zfiltrány (KA-3M, Filpap, Česká republika), odstředěny po dobu 15 min při 4400 ot/min a poté byla změřena jejich absorpční spektra. Pro porovnání byl také změřen referenční vzorek roztoku barviva bez přítomnosti hub.

Absorpční spektra byla měřena na UV/vis spektrofotometru Hewlett Packard 8453 (Agilent Technologies) v křemenné kyvetě o tloušťce 1 cm. Molární absorpční koeficienty sledovaných barviv byly stanoveny měřením pěti koncentračních standardů v destilované vodě. ESI-MS spektrum bylo měřeno na hmotnostním spektrometru s hybridním QqTOF analyzátozem (micrOTOF-Q, Bruker Daltonics) v rozsahu 50-1500 m/z při záznamu záporných iontů. Před měřením byl přístroj externě kalibrován na klastry mravenčanu sodného. Barvivo bylo rozpuštěno ve směsi acetonitril/voda (1/1). Napětí na kapiláře bylo 4,5 kV, teplota sušícího plynu 200 °C, průtok a tlak dusíku byly 4 l/min a 0,4 bar.



Obr. 46. Výsledky biodegradace azobarviv po 10 dnech (a) a 20 dnech (b) působením kmene An-L18: (1) biodegradace barviva Direct Red 80, (2) biodegradace barviva Direct Yellow 28, (3) biodegradace barviva Direct Blue 71 (4) biodegradace barviva Direct Green 28, (5) kontrola.

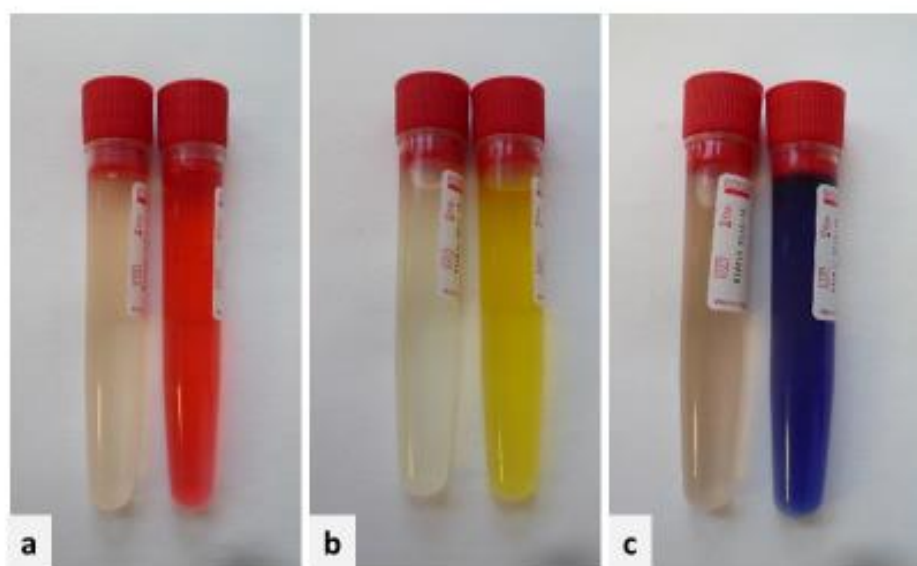
Na Obr. 46 jsou znázorněna UV/vis absorpční spektra vzorků azobarviv na začátku pokusu a po 10 a 20 dnech působením kmene An-L18. Bylo zjištěno, že použitá houba aktivně odbourává azobarviva v prvních 10 dnech, avšak současně produkuje metabolity, jež absorbují i ve viditelné oblasti spektra (Obr. 46 b). Nejvýraznější bylo odbourávání žlutého barviva po 10 dnech, a to o 93,2 %, červené barvivo Direct Red 80 bylo odbouráno

o 77,6 % a modré barvivo Direct Blue 71 bylo degradováno o 70,1 %, jedná se o průměrné hodnoty z laboratorních experimentů v řadě z 5 opakování (Tab. 11).

Tabulka 11. Biodegradace modelových azobarviv [%] kmenem An-L18.

	Direct Yellow 28		Direct Red 80		Direct Blue 71	
	Absorbance – Biodegradace					
Referenční vzorek	1,49986	0	1,09536	0	1,45620	0
An – L18	0,10507	93,2	0,24588	77,6	0,43538	70,1

Již dříve bylo prokázáno, že houby produkují řadu aktivních enzymů degradujících různá textilní barviva díky nespecifickým metabolickým systémům. Od roku 1999 bylo prokázáno, že enzymy významně degradující azobarviva představují především lakázy a azo-reduktázy. Mezi další důležité enzymy patří fenolové oxidázy, peroxidázy, hydroxylázy a další ze skupiny reduktáz (SUDHA et al. 2014).



Obr. 47. Výsledky biodegradace azobarviv působením kmene An-L18: (a) Direct Red 80, (b) Direct Yellow 28, (c) Direct Blue 71. Zkumavka vpravo obsahuje vstupní vzorek, zkumavka vlevo obsahuje výsledek biodegradace (H. Vojtková).

I když bylo publikováno několik prací k ověření aktivity biodegradace různých zástupců mikroskopických vláknitých hub včetně např. *Aspergillus foetidus*, *A. oryzae* a *A. ochraceus* (ALI et al. 2009, BENGHAZI et al. 2014, BIDISHA et al. 2006, CORSO et ALMEIDA 2009, FU et VIRARAGHAVAN 2001, TELKE et al. 2010), aktivita mikroskopických vláknitých hub druhu *Aspergillus niger* při degradaci textilních azobarviv nebyla vzhledem k počtu

zástupců tohoto rodu dostatečně prozkoumána. ALMEIDA et CORSO (2014) zkoumali schopnost biosorpce *A. niger* a *A. terreus* vázat barevné složky a kovy z textilních pigmentů a také jejich odbarvovací schopnosti. Při testování odbarvování barevných roztoků pomocí *Aspergillus niger* bylo zjištěno procento dekolorizace vzorků přibližně 30 %, zatímco v procesu biodegradace s houbami *Aspergillus terreus* došlo po 336 hodinách k zabarvení roztoku až o 98 %. I v dalších studiích se však potvrdilo, že rychlost degradace je nejintenzivnější do 10 dnů (ALI et EL-MOHAMEDY 2012), po 240 hodinách (10 dnech) se významně snižuje. Po 336 hodinách byly v molekulách barviva nalezeny významné spektrální změny vedoucí k toxickým přeměnám, což potvrdily testy akutní toxicity a mutagenity, a to až desetinásobné zvýšení stupně toxicity zbytků barviv (GOTTILIEB et al. 2003; SCHNEIDER et al. 2004).

10-denní biodegradace se také osvědčila v našich experimentech. Ve výsledcích kontroly pokračující biodegradace po 20-ti dnech v modelových vzorcích azobarviv byly zjištěny významné změny barvy sledovaných roztoků (Obr. 47 a-c), které byly způsobeny produkcí metabolitů, především pigmentů jako meziproduktů během jejich růstu (ATALLA et al. 2011). Je známo, že zástupci rodu *Aspergillus* produkují různé barevné pigmenty včetně melaninů (GONCALVES et LISBOA 2012) a již dříve bylo prokázáno, že zvýšená produkce pigmentu úzce souvisí s adaptací hub na stresové podmínky v prostředí (DURÁN et al. 2002). Tmavě hnědý pigment aspergillin kmene An-L18 byl zaznamenán ve filtrátu již po 10 dnech. Významná produkce pak byla zjištěna po 20-ti dnech biodegradace, kdy tvorba tmavých metabolitů výrazně ovlivnila závěrečnou analýzu vzorků.

Kmen An-L18, který byl izolován z kalu ostravských lagun, lze považovat, vzhledem k znečištění původního prostředí, za extremofilní mikroorganismus. Předloženými biodegradními experimenty bylo prokázáno, že tento kmen má jedinečné fyziologické vlastnosti a je vhodným modelem pro výzkum adaptace na extrémní podmínky organického znečištění. Bylo potvrzeno, že kmen An-L18 toleruje vysoké koncentrace toxických aromatických sloučenin ve srovnání s předpoklady ostatních zkoumaných kmenů druhu *Aspergillus niger*. Uvedeným výsledkům odpovídá také RAMP analýza (Obr. 15), která potvrdila podobnost kmene An-L18 na méně než 40 %. Současně se kmen nachází mimo seskupení ostatních kmenů. Genetické rozdíly v genu u všech 16-ti sledovaných kmenů druhu *Aspergillus niger* vedou k předpokladu odlišné reakce těchto kmenů v závislosti na podmínkách původního prostředí. Rozdílné reakce na chemické substance odpovídají fyziologickým změnám, které se projevují například při rozdílné schopnosti využít toxické organické polutanty (PAHs, PCBs) a schopnosti využívat tyto látky jako jediný zdroj

uhlíku a energie pro svůj růst. Odlišné sekvence ve zkoumané oblasti genomu mají za následek odlišnou expresi genů vedoucí k rozdílné produkci enzymů, nutných pro degradaci PAHs a dalších chemikálií, např. testovaných textilních azobarviv.

Předložená podrobná genotypová a fenotypová analýza kmene An-L18 v této studii shrnuje základní charakteristiky kmene vedoucí k upřesnění jeho fylogenetické pozice v rámci příbuzných kmenů. Fyziologické a biologické vlastnosti kmene získané při sledování jeho schopnosti experimentální biodegradace vybraných PAHs a vybraných azobarviv jsou vhodným doplněním biotechnologických vlastností kmene a nabízejí jeho využití jako součásti inokula vhodného k bioaugmentaci znečištěných půd a vod. V případě biotechnologického využití se otevírá další prostor pro testování fyziologických schopností tohoto kmene, zejména sledování jeho schopnosti adaptace a uplatnění v konsorciích aktivních mikroorganismů, nutností však zůstává podrobně otestovat jeho biologická a environmentální rizika.

6. ZÁVER

Pretrvávajúci zvýšený obsah ťažkých kovov a potenciálne toxických prvkov v rôznych zložkách životného prostredia má negatívny dopad na všetky živé organizmy, vrátane mikroorganizmov. Kontamináciou pôdy sa menia jej pôvodné fyzikálno-chemické vlastnosti často až na extrémne, a pre väčšinu mikroorganizmov tak vytvárajú nevhodné existenčné podmienky. Napriek tomu však, niektoré z nich, dokážu tento stres prostredia, v ktorom sa vyskytujú, prekonať a adaptovať sa. Adaptácia na nepriaznivé podmienky prostredia zároveň vedie k výraznej zmene ich fyziologických vlastností. Druh mikroskopickej vláknitej huby *Aspergillus niger* je vhodným modelovým príkladom adaptácie mikroorganizmu na stresové podmienky prostredia.

V práci so 16-timi kmeňmi druhu *Aspergillus niger*, ktoré pochádzali z rôzneho prostredia pôd a pevných substrátov s hodnotou pôdnej reakcie od pH < 3,5 do pH 8,5 – 9,0 a významnou kontamináciou po banskej činnosti, sme zaznamenali výrazne rozdiely v makromorfologických aj mikromorfologických znakoch. PCR metódou sme u všetkých kmeňov na 99,6 až 100 % potvrdili príslušnosť k druhu *Aspergillus niger*. Vzájomná podobnosť RAMP analýzou však vytvorila zoskupenia, tzv. klastre jednotlivých kmeňov. Prvú skupinu s podobnosťou viac ako 90 % tvoria kmene An-Sl, An-Kmi, An-ZK a An-Pop 4. Druhú skupinu s podobnosťou od 80 do 95 % tvoria kmene An-Pop 5, An-A, An-Pop 3, An-KD, An-Pop 1 a An-N. V tretej skupine sú kmene An-Š, An-Sm a An-P s podobnosťou od 75 do 85 %. Kmene An-G a An-KF mali jedinečné profily RAMP a boli umiestnené medzi ostatnými kmeňmi. Kmeň An-L18 vykazoval najmenšiu podobnosť, a to menej ako 40 %, a súčasne sa nachádzal mimo zoskupenia ostatných kmeňov.

Fenotypový profil kmeňov *Aspergillus niger* systémom Biolog FF Microplate™ dopĺňa genotypový profil na základe fyziologických vlastností mikroorganizmu. Týmto spôsobom sme potvrdili najväčšiu fenotypovú podobnosť medzi kmeňmi, ktoré pochádzali zo silne alkalického prostredia (pH 8,5 – 9,0), z prostredia slabo alkalického (pH 7,4 – 7,8) a stredne alkalického (pH 7,9 – 8,4). Nasledujú kmene zo silne kyslého prostredia (pH 5,1 – 5,5) a slabo alkalického prostredia (pH 7,4 – 7,8). Zhluky kmeňov vytvorené ordinačným diagramom však nepotvrdili fenotypovú podobnosť medzi kmeňmi, ktoré pochádzajú z ultra kyslého prostredia (pH < 3,5), extrémne kyslého prostredia (pH 3,5 – 4,4) a z prostredia

veľmi silne kyslého (pH 4,5 – 5,0). Vysokú podobnosť sme zaznamenali medzi kmeňmi An-A a An-N, ktorých substrát obsahuje arzén.

V produkcii enzýmu lipáza sme zaznamenali veľmi silnú aktivitu u kmeňa An-G, kedy došlo k veľmi rýchlemu odfarbeniu živnej pôdy, a to aj napriek najpomalšiemu rastu (priemer kolónie bol najmenší, $2 \pm 0,1$ cm) zo všetkých sledovaných kmeňov. Na základe týchto vlastností je možné odporučiť kmeň An-G na priemyselné využitie. Ostatné kmene mali slabú alebo takmer žiadnu lipolytickú aktivitu.

V skríningu produkcie mykotoxínov sme zo 16-tich testovaných zaznamenali iba dva kmene produkujúce ochratoxín A, a to An-Sm a An-Kmi a iné tri kmene (An-L18, An-Sl a An-A), ktoré produkovali iné, metódou bližšie nešpecifikovateľné metabolity.

Pri testovaní produkcie organických kyselín sme u štyroch kmeňov (An-Š, An-P, An-Sl a An-G) zistili syntézu kyseliny glukonovej, citrónovej a šťaveľovej. Kmeň An-Š, ktorého pôvodným prostredím bola pôda s ultra kyslou reakciou (pH 3), produkoval kyselinu šťaveľovú (5,1 g/l) a kyselinu citrónovú (0,52 g/l) v najväčšom množstve. Kmeň An-G, ktorý pochádzal z nekontaminovaného prostredia a slúžil ako kontrolný v rámci všetkých experimentov, kyselinu šťaveľovú neprodukoval vôbec. Enzým zodpovedný za tvorbu oxalátu, t. j. oxalacetát acetylhydroláza, sme v kultivačnom roztoku nezaznamenali.

Kmeň An-Š sporuloval najintenzívnejšie, čo sme potvrdili aj spočítaním konídií v Bürkerovej komôrke v ďalšom experimente – štúdiu tvorby peliet v prítomnosti anorganických látok. Z použitých látok iba ílový minerál montmorillonit vo väčšej alebo menšej miere veľkosť peliet znižoval. Súvisí to s veľkosťou častíc tohto minerálu, ktoré sa vo vodných roztokoch rozpadajú na výrazne menšie častice, a priestorovo tak obmedzujú rast väčších peliet. Pelety druhu *Aspergillus niger* však majú významné miesto a využitie v biotechnológiách, a to či už samostatne alebo spolu a inými anorganickými práškovými látkami.

Genotypová a fenotypová analýza kmeňa An-L18 potvrdila jeho výnimočnosť medzi 16-timi testovanými kmeňmi *Aspergillus niger*. Fyziologické a biologické vlastnosti tohto kmeňa potvrdené pri sledovaní experimentálnej biodegradácie vybraných PAH a azofarbív dopĺňajú jeho biotechnologické vlastnosti. Je tu zároveň možnosť využitia tohto kmeňa ako súčasť inokula vhodného k bioaugmentácii znečistených pôd a vôd, tiež pri jeho uplatnení v konzorciu aktívnych mikroorganizmov v rámci adaptácie na kontaminované prostredie.

7. LITERATÚRA

- ABDEL-KADER M.I.A., ABDEL-HAFEZ A.I.I, ABDEL-HAZEF S.I.I. 1983: Composition of the fungal flora of Syrian soils. II Cellulase decomposition fungi. Mycopathol. 81, 167–171.
- ABD EL AAL R.A., SHETAIA Y.M., SHAFEI M.S., GOMAA S.K., EL MENOIFY H.A., EL-REFAI H.A. 2019: Optimalization of parameters for lipase production by *Aspergillus niger* NRRL-599 using response surface methodology. Egypt. Pharm. J. 18, 165–171.
- ABDEL-AZEEM, A.M. 2003: Ecological and taxonomical studies on ascospore-producing fungi in Egypt. PhD Thesis, Faculty of Science, Suez Canal University, Egypt.
- ABDEL-AZEM A.M., EL-MORSLY E.M., EL-DEIN N., RASHAD H.M. 2015: Occurrence and diversity of mycobiota in heavy metal contaminated sediments of Mediterranean coastal lagoon El-Manzala, Egypt. Mycosphere 6, 228–240.
- ABDULLAH S.K., MONFORT E., ASENSIO L., SALINAS L.V., LOPEZ LLORCA L.V., JANSSON H.B. 2010: Soil mycobiota of date palm plantations in Elche, SE Spain. Czech Mycol. 61, 149–162.
- ABIRAMI V., MEENAKSHI S.A., KANTHYMATHY K., BHARATHIDASAN R., MAHALINGAM R., PANNEERSELVAM A. 2011. Partial purification and characterization of an extracellular protease from *Penicillium janthinellum* and *Neurospora crassa*. Eur. J. Exp. Biol. 1, 114–123.
- ACEVEDO F., PIZZUL L., CASTILLO M.D., CUEVAS R., DIEZ M.C. 2011: Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthrachyllum discolor*. J. Hazard. Mater. 185, 212–219, 10.1016/j.jhazmat.2010.09.020.
- ACOSTA-RODRIGUEZ I., CÁRDENAS-GONZÁLES J.F., PÉREZ A.S.R., OVIEDO J.T., MARTÍNEZ-JUÁREZ V.M. 2018: Bioremoval of different heavy metals by the resistant fungal strain *Aspergillus niger*. Hindawi Bioinorg. Chem. Appl. Article ID3457196. doi.org/10.1155/2018/3457196.
- ADELEKE R., NWANGBURUKA C., OBOIRIEN B. 2017: Origins, roles and fate of organic acids in soils: a review. S. Afr. J. Bot. 108, 393–406.
- ADELEKE R.A., CLOETE T.E., BERTRAND A., KHASA, D.P. 2010: Iron ore weathering potentials of ectomycorrhizal plants. Mycorrhiza 22, 535–544.
- AHMAD I., ANSARI M.I., AQIL F. 2006: Biosorption of Ni, Cr and Cd by metal tolerant *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. using single and multi-metal solution. Indian J. Exp. Biol. 44, 73–76.

- AKHTAR N., SHOAIB A., KHURSHID S. 2014: Isolation, identification and enzyme production profile of *A. niger*. J. Anim. Plant Sci. 25, 1438–1443.
- ALI N.F., EL-MOHAMEDY R.S.R. 2012: Microbial decolourization of textile waste water. J. Saudi Chem. Soc. 16, 117–123.
- ALI N., HAMEED A., SIDDIQUI M.F., GHUMRO P.B., AHMED S. 2009: Application of *Aspergillus niger* SA1 for the enhanced bioremoval of azo dyes in simulated textile effluent. Afr. J. Biotechnol. 8, 3839–3845.
- ALMEIDA E.J., CORSO C.R. 2014: Comparative study of toxicity of azo dye Procion Red MX-5B following biosorption and biodegradation treatments with the fungi *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*. Chemosphere. 112, 317–322.
- ALWAKEEL S.S. 2017: Molecular identification of fungi isolated from coastal regions of Red Sea, Jeddah, Saudi Arabia. J. Assoc. Arab Univ. Basic Appl. Sci. 24, 115–119.
- ANJUM F., BHATTI H.N., ASGHER M., SHAHID M. 2010: Leaching of metal ions from black shale by organic acids produced by *Aspergillus niger*. Appl. Clay Sci. 47, 356–361.
- ARINZE A.E., YUBEDEE A.G. 2000: Effect of fungicides on *Fusarium* grain rot and enzyme production in maize (*Zea mays* L.). Global J. Appl. Sci. 6, 629–634.
- ARUN A., RAJA P.P., ARTHI R., ANANTHI M., KUMAR K.S., EYINI M. 2008: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation by Basidiomycetes fungi, *Pseudomonas* isolate, and their cocultures: comparative in vivo and in silico approach. Appl. Biochem. Biotechnol. 151, 132–142.
- ASAN A. 2004: *Aspergillus*, *Penicillium* and related species reported from Turkey. Mycotaxon 89, 155–157.
- ASKUN T., ELTEM R., TASKIN E. 2007: Comparison of rose-bengal chloramphenicol agar and dichloran glycerol agar (DG18) for enumeration and isolation of moulds from raisins. J. Appl. Biol. Sci. 1, 71–75.
- ATALLA M.M., EL-KHRISY E.M., ASEM M.A. 2011: Production of textile reddish brown dyes by fungi. Malays. J. Microbiol. 7, 33–40.
- AZIZ H., ZAINOL, N. 2018: Isolation and Identification of soil fungi isolates from forest soil for flooded soil recovery. IOP Conf. Series: Mater. Sci. Eng. 342 pp. doi:10.1088/1757-899X/342/1/012028.
- BAHOBI A., BAYOUMI R.A., ATTA H.M., EL-SEHRAWAY M.M. 2017: Fungal biosorption for cadmium and mercury heavy metal ions isolated from some polluted localities in KSA. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 6, 2138–2154.

- BAKER S.E. 2006: *Aspergillus niger* genomics. Past, present and into the future. *Med. Mycol.* 44, 17–21.
- BALAJI V., ARULAZHAGAN P., EBENEZER P. 2014: Enzymatic bioremediation of polyaromatic hydrocarbons by fungal consortia enriched from petroleum contaminated soil and oil seeds. *J. Environ. Biol. India* 35, 521–529.
- BALOGH-BRUNSTAD Z., KELLER C.K., DICKINSON J.T., STEVENS F., LI, C.Y., BORMANN B.T. 2008: Biotite weathering and nutrient uptake by ectomycorrhizal fungus, *Suillus tomentosus*, in liquid-culture experiments. *Geochim Cosmochim AC J.* 72, 2601–2618.
- BALYAEVA O.N., HAYNES R.J, BIRUKOVA O.A. 2005: Barley yield and soil microbial and enzyme activities as affected by contamination of two soils with lead, zinc or copper. *Biol. Fertil. Soils* 41, 85–94.
- BAO H., LI, E., MANSFIELD S.D., CRONK Q.C., EL-KASSABY Y.A., DOUGLAS C.J. 2013: The developing xylem transcriptome and genome-wide analysis of alternative splicing in *Populus trichocarpa* (black cottonwood) populations. *BioMed Central Genomics* 14, 359.
- BECCARI G., STĘPIEŃ Ł., ONOFRI A., LATTNZIO V.M., CIASCA B., ABD-EL FATAH S.I., VALENTE F., URBANIAK M., COVARELLI L. 2020: *In Vitro* fumonisin biosynthesis and genetic structure of *Fusarium verticillioides* strains from five mediterranean countries. *Microorg.* 8, 241 pp.
- BEDRNA Z., DLAPA P., ŠIMKOVIC I., ŠIMONOVÍČOVÁ A. 2010: Pôdy s umbrickým horizontom na Slovensku. 1. vyd. Univerzita Komenského v Bratislave, 230 pp.
- BELL M.R. 2014: Endocrine-disrupting actions of PCBs on brain development and social and reproductive behaviors. *Curr. Opin. Pharmacol.* 19, 134–144. doi:10.1016/j.coph.2014.09.020.
- BENGHAZI L., RECORD E., SUÁREZ A., GOMEZ-VIDAL J.A., MARTÍNEZ J., DE LA RUBIA T. 2014. Production of the Phanerochaete flavido-alba laccase in *Aspergillus niger* for synthetic dyes decolorization and biotransformation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 201–211.
- BENNETT J.W. 2010: An overview of the genus *Aspergillus*. 1-17. In: Machida, M., Gomi, K. (eds.). *Molecular Biology and Genomic*: Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- BETTS W.B. 2012 *Biodegradation: Natural and Synthetic Materials*. Springer Science & Business Media.

- BIDISHA C., SREERANJANI R., SHAIK A.S., CHAUDARI S., SUMATHI S. 2006: Bioaccumulation and biosorption of drimarene red dye by *Aspergillus foetidus*. Int. J. Environ. Pollut. 28, 517–533.
- BIGNELL E., NEGRETE-URTASUN S., CALCAGNO A.M., HAYNES K., ARST H.N., ROGERS T. 2005: The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. Mol. Microbiol. 55, 1072–1084.
- BLAHOVCOVÁ F. 2016: Priestorová distribúcia autochtónnej mikrobiocenzy v pôdach kontaminovaných arzénom a antimónom na lokalite Poproč. Diplomová práca. Prírodovedecká fakulta, 66 pp.
- BOCHNER B.R. 2009: Global phenotypic characterization of bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 33, 191–205.
- BRAAK T.C., ŠMILAUER P. 2012: Canoco 5, Windows Release (5.00). [Software for Canonical Community Ordination]. Microcomputer Power, Ithaca.
- BRAGULAT M.R., ABARCA M.L., CABAÑES F.J. 2001: An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. Int. J. Food Microbiol. 71, 139–141.
- BRANDL J., AGUILAR-PONTES M.V., SCHÄPE P., NOERREGAARD A., ARVAS M., RAM A.F.J., MEYER V., TSANG A., DE VRIES R.P., ANDERSEN M.R. 2018: A community-driven reconstruction of the *Aspergillus niger* metabolic network. Fungal Biol. Biotechnol. 5, 16. doi.org/10.1186/s40694-018-0060-7.
- BUTINAR L., FRISVAD J.C., GUNDE-CIMERMAN, N. 2011: Hypersaline waters - a potential source of foodborne toxigenic aspergilli and penicillia. FEMS Microbiol. Ecol. 77, 186–99.
- CALAÇA F.J.S., DA SILVA N.C., XAVIER-SANTOS S. 2014: A checklist of coprophilous fungi and other fungi recorded on dung from Brazil. Mycotaxon link page 128, 205.
- CANTRELL A.S., CASILLAS-MARTÍNEZ L., MOLINA M. 2006: Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. Mycol. Res. 110, 962–970.
- CARRANZA C.S., BARBERIS C.L., CHIACCHIERA S.M., MANGOLI C.E. 2017: Assessment of growth of *Aspergillus* spp. From agricultural soils in the presence of glyphosate. Rev. Argent. Microbiol. 49, 384–393.
- CHI-CHING T., TANG J.Y.M., LAU S.K.P., WOO P.C.Y. 2018: Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era – Past, present and future. CSBJ 16, 197–210.

- CIHANGIR N., SARIKAYA E. 2004. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. World J. Microbiol. Biotechnol. 20, 193–197.
- COLPAERT J. 2008: Heavy metal pollution and genetic adaptations in ectomycorrhizal fungi. British Mycol. Soc. Symposia Series 27, 157–173.
- COSTA C.P., SILVA D.G., RUDNITSKAYA A., ALMEIDA A., ROCHA S.M. 2016: Shedding light on *Aspergillus niger* volatile exometabolome. Sci. Rep. /6.27441/doi:10.1038/srep27441.
- CORSO C.R., ALMIDA A.C.M. 2009: Bioremediation of dyes in textile effluents by *Aspergillus oryzae*. Microb. Ecol. 57, 384–390.
- COURI S., PINTO G.A.S., SENNA L.F., MARTELLI H.I. 2003: Influence of metal ions on pellet morphology and polygalacturonase synthesis by *Aspergillus niger* 3T5B8. Braz. J. Microbiol. 34, 16–21.
- CREPPY E.E. 2002: Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicol. Lett. 127, 19–28.
- DAS S. K., VARMA A. 2010: Role of Enzymes in Maintaining Soil Health. Soil Enzymology. Soil Biol. 22, 25–42.
- DE HOOG G.S., GUARRO J., GENÉ J., AHMED S.A., AL-HATMI A.M.S., FIGUERAS M.J., VITALE R.G. 2020: Atlas of Clinical Fungi the ultimate benchtool for diagnostics 4th edition. Part α : Introductions, lower fungi, basidiomycetes, yeasts, filamentous ascomycetes A-B. Published by Foundation Atlas of Clinical Fungi, Hilversum.
- DELGADO G. 2011: Nicaraguan fungi: a checklist of hyphomycetes. Mycotaxon Link Page 115, 534.
- DEVI L.S., JOSHI S.R. 2012: Antimicrobial and synergistic effects of silver nanoparticles synthesized using soil fungi of high altitudes of eastern Himalaya. Mycobiol. 40, 27–34.
- DIJKSTERHUIS J., WÖSTEN H. 2013: Development of *Aspergillus niger*. Stud. Mycol. 74, 85 pp.
- DIKE S.K., OBIUKWU E.C., EKWEALOR A.I. 2014: Optimization of nutritional parameters for the production of L-methionine from newly isolated *Bacillus cereus* strain. Microbiol. Res. J. Int. 4, 1248–1261.
- DIMAROGONA M., TOPAKAS E. 2016: Regulation and heterologous expression of lignocellulosic enzymes in *Aspergillus*. New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering. *Aspergillus* system properties and applications., 171–190. doi: 10.1016/B978-0-444-63505-1.00012-9.
- DINH Q.T., LI Z., TRAN T.A.T., WANG D., LIANG D. 2017: Role of organic acids on the bioavailability of selenium in soil: A review. Chemosphere 184, 618–635.

- DOKU T.E., BELFORD E.J.D. 2015: The potential of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger* in bioaccumulation of heavy metals from the Chemu Lagoon, Ghana. J. Appl. Biosci. 94, 8907–8914.
- DOMSCH K.H., GAMS W., ANDERSON T.H. 2007: Compendium of soil fungi. Second edition, taxonomically revised by Walter Gams. IHW - Verlag, Eching, 672 pp.
- DRIOUCH H., HANSCH R., WUCHERPFFENNING T., KRULL R., WITTMANN CH. 2011: Improved enzyme production by bio-pellets of *Aspergillus niger*: Targeted morphology engineering using titanate microparticles. Biotechnol. Bioeng. 109, 465–471.
- DURÁN N., TEIXEIRA M.F., DE CONTI R., ESPOSITO E. 2002: Ecological-friendly pigments from fungi. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 42: 53–66.
- EISENDLE M., OBEREGGER H., BUTTINGER R., ILLMER P., HAAS H. 2004: Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*. Eukaryot. Cell 3, 561–575.
- EL-SAID A.H.M., SALEEM A. 2008: Ecological and physiological studies on soil fungi at western region, Lybia. Mycobiol. 109 pp.
- EMILIANI E., BEKES P. 1964: Enzymatic oxalate decarboxylation in *Aspergillus niger*. Arch. Biochem. Biophys. 105, 488–493.
- ESTEBAN A., ABARCA M.L., BRAGULAT, M.R., CABAÑES, F.J. 2004: Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. Res. Microbiol. 155, 861–866.
- ESTEBAN A., ABARCA M.L., BRAGULAT M.R., CABAÑES, F.J. 2006: Influence of pH and incubation time on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in culture media. J. Food Prot. 68, 1435–1440.
- EVDOKIMOVA G.A., KORNEYKOVA M.V. 2010: Microfungal communities in soil polluted with fluoride. Natur. Sci. 2, 1022–1029. <http://www.scirp.org/journal/NS/>.
- FAKHRUNNISA M.H. HASMI, GHAFAR A. 2006: Seed-borne mycoflora of wheat, sorghum and barley. Pak. J. Bot. 38, 185–192.
- FAO 2006: Commission Regulation (EC) No 1881/2006 Setting maximum levels for certain contaminants in food stuffs. Rome.
- FEKETOVÁ Z., ŠIMONOVÍČOVÁ A., SCHWARZKOPFOVÁ K., VOJTKOVÁ H. 2017: Mikrobiálne indikátory a mikroorganizmy v substrátoch environmentálnych záťaží. Vysoká škola báňská – Technická univerzita, Ostrava, CD-ROM, 128 pp.

- FILTENBORG O., FRISVAD J., THRANE U. 1989: Analysis and screening for mycotoxins and other secondary metabolites in fungal cultures by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 3, 331 pp.
- FOMINA M.A., GADD M.G. 2002: Influence of clay minerals on the morphology of fungal pellets. *Mycol. Res.* 106, 107–117.
- FOMINA M.A., KADOSHINKOV V.M., ZLOBENKO B.P. 1999: Fungal biomass grown on media containing clay as a sorbent of radionuclides. *Process Metallurgy* 9, 245–254.
- FORGACS E., CSERHÁTI T., OROS G. 2004: Removal of synthetic dyes from wastewaters: A review. *Environ. Int.* 30, 953–971.
- FOTSO J., LESLIE J.F., SMITHS. 2002: Production of beauvericin, moniliformin, fusaproliferin, and fumonisins B1, B2, and B3 by fifteen ex-type strains of *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5195–5197.
- FOX E.M., HOWLETT B.J. 2008: Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 481–487.
- FRANKOVSKÁ J., KORDÍK J., SLANINKA I. 2010: Atlas sanačných metod environmentálních záťaží. Štátny geologický ústav Dionýza Štúra. 360 pp.
- FREITAS J.S., SILVA E.M., LEAL J., GRAS D.E., MARTINEZ-ROSSI N.M., DOS SANTOS L.D., PALMA M.S., ROSSI A. 2011: Transcription of the Hsp30, Hsp70, and Hsp90 heat shock protein genes is modulated by the PalA protein in response to acid pH-sensing in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Cell Stress and Chaperones* 16, 565–572.
- FRISVAD J.C., SMEDSGAARD J., SAMSON R.A., LARSEN T.O., THRANE U. 2007: Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *J. Agric. Food Chem.* 55, 9727–9732.
- FU Y., VIRARAGHAVAN T. 2001: Fungal decolorization of dye wastewaters: A review. *Biores. Technol.* 79, 251–262.
- GACEM M.A., OULD EL HADJ-KHELIL A., BOUDJEMAA B., GACEM H., 2020: Mycotoxins occurrence, toxicity and detection methods. In: Lichtfouse, E. (eds) *Sustainable Agriculture Reviews* 40. Springer, Cham. doi.org/10.1007/978-3-030-33281-5_1.
- GADD G.M., BAHRI-ESFAHANI J., LI Q., RHEE Y.J., WEI Z., FOMINA M., LIANG X. 2014: Oxalate production by fungi: significance in geomycology, biodeterioration and bioremediation. *Fungal Biol. Rev* 28, 36–55.
- GARCIA-REYES M., HERNANDEZ R.I.B., VASQUEZ-RODRIGUEZ G.A., OLIVARES-CORONE, C., MEDINO-MORENO S.A., SANTILLAN-JUAREZ L.F., LUCHO-CONSTANTINO C.A. 2017: Formation, Morphology and Biotechnological Applications of Filamentous Fungal Pellets: A Review. *Rev. Mex. Ing. Quim.* 16, 703–720.

- GAUTAM K.A., SHARMA S., AVASTHI S., BHADAURIA R. 2011: Diversity, pathogenicity and toxicology of *A. niger*: An important spoilage fungi. Res. J. Microbiol. 6, 270–280.
- GHERBAWY, Y., VOIGT, K. 2010: Molecular identification of fungi. Springer, Berlin, 297 pp.
- GHOLAMI R.M., BORGHEI S.M., MOUSAVI S.M. 2011: Fungal leaching of hazardous heavy metals from a spent hydrotreating catalyst. WASET 5, 659–663.
- GONCALVES, R.C.R., LISBOA H.C.F., POMBEIRO-SPONCHIADO S.R. 2012: Characterization of melanin pigment produced by *Aspergillus nidulans*. World J. Microbiol. Biotechnol. 28, 1467–1474.
- GOTTLIEB A., SHAW C., SMITH A., WHEATLEY A., FORSYTHE S. 2003: The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourization. J. Biotechnol. 101, 49–56.
- GOYAL S., RAMAWAT K.G., MÉRILLON J.M. 2016: Different shades of fungal metabolites: An overview. 1-22. doi: 10.1007/978-3-319-19456-1_34-1.
- GRISHKAN I., NEVO E., WASSER S.P. 2003: Soil micromycete diversity in the hypersaline Dead Sea coastal area, Israel. Mycol. Prog. 2, 19–28.
- GRISHKAN, I., RONG-LIANG, J., KIDRON, G.J., XIN-RONG, L. 2015: Cultivable microfungi communities inhabiting biological soil crust in the Tengger Desert, China. Pedosphere 25, 351–363.
- GRYTA, A., FRAC, M., OSZUST, K. 2014: The Application of the Biolog EcoPlate Approach in Ecotoxicological Evaluation of Dairy Sewage Sludge. Appl. Biochem. Biotechnol. 174, 1434–1443.
- GUIMARÃES L.H.S., TERENCE H.F., POLIZELI M.L.T.M., JORGE, J. A. 2007: Production and characterisation of a thermostable extracellular β -D-Fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. Enzyme Microb. Tech. 42, 52–57.
- GULUMBE B.H., ALIYU B., ABUBAKAR B., SAMBO K.H., USMAN N.I., MUHAMMAD W.N. 2017: Occurrence of pathogenic fungi in soil from pre-primary school playgrounds in Birnin Kebbi. UMYU J. Microbiol. Res. 2, 174–177.
- GULZAR T., HUMA T., JALAL F., IQBAL S., ABRAR S., KIRAN S., NOSHEEN S., HUSSAIN W., RAFIQUE M.A. 2017: Bioremediation of synthetic and industrial effluents by *Aspergillus niger* isolated from contaminated soil following a sequential strategy. Molecules 22, 2244, doi:10.3390/molecules22122244.
- GUPTA V.K. 2016: New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering (*Aspergillus* system properties and applications). Elsevier, 301 pp.

- HAFEZ W.A. 2012: Comparative ecological studies on soil and rhizospheric fungi of maize and wheat plants in different areas in Minia Governorate Egypt. M.S. Thesis, Faculty of Science, El-Minia University.
- HALWAGY R., MUSTAFA A.F., KAMEL S.M. 1982: Ecology of the soil mycoflora in the desert soil of Kuwait. *J. Arid Environ.* 5, 109–125.
- HARITASH A.K., KAUSHIK C.P. 2009: Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *J. Hazard. Mater.* 169, 1–15.
- HINDERSAH R., ASDA K.R., HERDIYANTORO D., KAMALUDDIN N.N. 2018: Isolation of mercury-resistant fungi from mercury-contaminated agricultural soil. *Agriculture* 8, 33. doi: 10.3390/agriculture8030033.
- HOLUB M., BALINTOVA M., DEMCAK S., HURAKOVA M. 2016: Characterization of natural zeolite and determination its adsorption properties. *JCCEE* 63, 113–122.
- HRONČEK P., HERČKO I. 2014: Ložiská a lokálne výskyty uhlia na Slovensku a ich geologický prieskum a výskum. *Quaestiones rerum naturalium* 1, 88–177.
- HRUŠKOVIČ S. 1971: Ložiská kremencov na Slovensku. *Mineralia Slovaca* 12-13, 575–586.
- HSU N.J., AGRORAMOORTHY G. 2001: Occurrence and diversity of thermophilous soil microfungi in forest and cave ecosystems of Taiwan. *Fungal Divers.* 7, 27–33.
- HUGHES J.B., BECKLES D.M., CHANDRA S.D., WARD CH. 1997: Utilization of bioremediation processes for the treatment of PAH-contaminated sediments. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 18 152–160.
- HUSSEIN N.A., YOUSEF N.M.H. 2011: Microbila population of soil contaminated with petroleum derivates and molekular identification of *Aspergillus niger*. *Egypt J. Exp. Biol. (Bot).* 7, 25–34.
- CHANG Y.L., WANG J.H. 2018: Optimal condition for the growth of *Aspergillus niger* (BCRC 31494, ATCC 10864). *Conf. Int. Symp. Biotechnol. Bioeng.* doi: 10.13140/RG.2.2.16695.16804
- CHAUDHRY S., LUHACH J., SHARMA V., SHARMA CH. 2012: Assesment of diesel degrading potential of fungal isolats from sludge contaminated soil of pretroleum refinery, Haryana. *Res. J. Microbiol.* 7, 182–190.
- CHÁVEZ R., FIERRO F., GARCIA-RICO R., VACA I. 2015: Filamentous fungi from extreme environments as a promising source of novel bioactive secondary metabolities. *Front. Microbiol.* 6, 903. doi:10.3389/fmicb.2015.00903.

- CHO B.H., CHINO H., TSUJI H., KUNITO T., NAGAOKA K., OTSUKA S., YAMASHITA K., MATSUMOTO S., OYAIZU H. 1997: Laboratory-scale bioremediation of oil-contaminated soil of Kuwait with soil amendment materials. *Chemosphere* 35, 1599–1611.
- IRAM S., ZAMAN A., IQBAL Z., SHABBIR R. 2013a: Heavy metal tolerance of fungus isolated from soil contaminated with sewage and industrial wastewater. *Pol. J. Environ. Stud.* 22, 691–697.
- IRAM S., PERVEEN K., SHUJE N., WAGAR K., AKHTA, I., AHMADI. 2013b: Tolerance potential of different species of *Aspergillus* as bioremediation tool – Comparative analysis. *E3 J. Microbiol. Res.* 1, 001-008. <http://www.e3journals.org>.
- IRAM S., AHMAD I., JAVED B., YAQOOB S., AKHTAR K., KAZMI M.R., BADAR-UZ-ZAMAN 2009: Fungal tolerance to heavy metals. *Pak. J. Bot.* 41, 2583–2594.
- IQBAL H.M.N., KYAZZE G., TRON T., KESHAVARZ T. 2018: Laccase from *Aspergillus niger*: A novel tool to graft multifunctional materials of interests and their characterization. *Saudi J. Biol. Sci.* 25, 545-550. doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.027.
- JENA S.K., TAYUNG K., RATH CH.C., PARIDA D. 2015: Occurrence of culturable fungi in a tropical moist deciduous forest Similipal Biosphere Reserve, Odisha, India. *Braz. J. Microbiol.* 46, 85–96.
- JESENÁK K. 1994: Laboratory device for sedimentation separation of powders. *Ceramics-Silikáty* 38, 35–36.
- JESENÁK K. 2005: Environmentálna anorganická chémia. Prírodovedecká fakulta, UK, Bratislava. 189 pp.
- JESENÁK K. 2010: Exkurzia po miestach ťažby a spracovania anorganických surovín na Slovensku, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Bratislava, Vydavateľstvo UK, 797 pp.
- JESENÁK K., HLAVATÝ V. 2000: Laboratory device for sedimentation of fine bentonite fractions. *Scripta Facultatis Scientiarum Naturalium Universitatis Masarykianae Brunensis* 28, 33–36.
- JESENÁK K., ŠIMONOVICHOVÁ A., ČERŇANSKÝ S. 2015. Influence of fine-grained montmorillonite on microfungus pellets growth in aqueous suspensions. *Nova Biotechnol. et Chim.* 14, 38–44.
- JIA J., YANG X., WU Z., LIN Z., GUO H., LIN K. S. C., WANG J., WANG Y. 2015: Optimization of fermentation medium for extracellular lipase production from *Aspergillus niger* using response surface methodology. *Biomed. Res. Int.* Article ID 497462. [doi: 10.1155/2015/497462](https://doi.org/10.1155/2015/497462).

- JIANG H., LI T., HAN X., YANG X., HE Z., 2012: Effects of pH and low molecular weight organic acids in competitive adsorption and desorption of cadmium and lead in paddy soils. *Environ. Monit. Assess.* 84, 6325–6335.
- JOSHI P.K., SWARUP A., MAHESWARI S., KUMAR R., SINGH N. 2011: Bioremediation of heavy metals in liquid media through fungi isolated from contaminated sources. *Indian J. Microbiol.* 51, 482–487.
- JUHASOVÁ J., ČERNÁNSKÝ S., ŠIMONOVÍČOVÁ A. 2017: Porovnanie schopnosti rôznych kmeňov *Aspergillus niger* a autochtónnej mikrofóry odstraňovať As a Sb z kontaminovaných pôd v laboratórnych podmienkach. ŠVK, zborník abstraktov, 1507–1512.
- KADRI T., ROUISSI T., BRAR S.K., CLEDON M., SARMA S., VERMA M. 2017: Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. *J. Environ. Sci.* 51, 52–74.
- KALYONCU F., EKMEKCI S. 2008: Culturable airborne fungi in outdoor environments in Manisa, Turkey. *Fresenius Environ. Bull.* 17, 844–848.
- KALYONCU F., TAMER A.U., OSKAY M. 2005: Determination of fungi associated with tomatoes (*Lycopersicum esculentum* M.) and tomato pastes. *Plant Pathol. J.* 4, 146–149.
- KAPOOR A., VIRARAGHAVAN T., CULLIMORE R.D. 1999: Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. *Biores. Technol.* 70, 95–104.
- KARKLOVSKY P. 2008: Secondary metabolites In: Karlovsky P. (ed.) *Secondary Metabolites in Soil Ecology*. *Soil Bio.* 14. Springer, Berlin, Heidelberg 1–19.
- KATZ M.E., RICE R.N., CHEETHAM B.F. 1994: Isolation and characterization of an *Aspergillus nidulans* gene encoding an alkaline protease. *Gene* 150, 287–292.
- KHURSHID S., KAFIAT T., HANIF U., ULFAT M., QUERSHI M.Z., BASHIR T., SAJID A., ISHATIAG S., ISMAYIL T. 2013: Application of glucose oxidase for the production of metal gluconates by fermentation. *Afr. J. Biotechnol.* 12, 6766–6775.
- KIM M., SEO J., CHOI Y., KIM G. 2016: Bioleaching of spent Zn-Mn or Ni-Cd batteries by *Aspergillus* species. *Waste Manage.* 51, 168–173.
- KIRTSIDELI I.YU., VLASOV D.YU., BARANTSEVICH E.P., KRYLENKOV V.A., SOKOLOV V.T. 2014: Microfungi from soil of polar Island Izvestia tsik (Kara Sea). *Mikol. Fitopatol.* 6, 365–371.
- KLICH M.A. 2002: Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands 116 pp.

- KLINGLER J.M, STOWE, R, OENHUBER D.C, GROVES T.O, MISHRAM S.K, PIERSON D.L. 1992: Evaluation of the Biolog automated microbial identification system. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2089–2092.
- KOLENČÍK M., ŠEVC J., ČERNÁNSKÝ S., ÚRIK M., LITTERA P. 2007: Mikrobiálne procesy na povrchu tuhých látok. Geochémia, ŠGÚDŠ, Bratislava. 13–16.
- KOLENČÍK M., VOJTKOVÁ H., URÍK M., ČAPLOVIČOVÁ M., PIŠTORA J., CADA M., BABIČOVÁ A., FENG H., QIAN Y., RAMAKANTH I. 2017: Heterotrophic bacterial leaching of zinc and arsenic from artificial adamite. WASP 228, 224, doi.org/10.1007/s11270-017-3400-y.
- KOŽURKOVÁ M. 2011: Cvičenia z biochémie mikroorganizmov. Vysokoškolské učebné texty. Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Košice. 102 pp.
- KRAKOVÁ L., CHOVANOVÁ K., PUŠKAROVÁ A., BUČKOVÁ M., PANGALLO D. 2012: A novel PCR-based approach for the detection and classification of potential cellulolytic fungal strains isolated from museum items and surrounding indoor environment. Lett. Appl. Microbiol. 54, 433–440.
- KUBÁT J., NOVÁKOVÁ J., CERHANOVÁ D. 2002: Výskyt a aktivita pôdných mikroorganizmů ve dlouhodobých polních pokusech na orné půdě. Biologické indikátory kvality půd. Brno, MZLU, 18–25.
- KUBICEK C.P., SCHREFERL-KUNAR G., WÖHRER W., RÖHR M. 1988: Evidence for a cytoplasmic pathway of oxalate biosynthesis in *Aspergillus niger*. Appl. Environ. Microbiol. 54, 633.
- KUBICEK C.P, WITTEVEEN C.F.B., VISSER J. 1994: Regulation of organic acid production by aspergilli. In: Powell KA, Renwick A, Peberdy JF (Eds.). The genus *Aspergillus*: From taxonomy and genetics to industrial application. Springer US, Boston, MA, 135–145.
- KURNIATIN, P., AMBARSARI L., KHANZA A.D., SETYAWATI I., DJAROT SASONGKO HAMI SENO D.S.H., WARAS NURCHOLIS W. 2020: Characteristics of glucose oxidase gene (GGOx) from *Aspergillus niger* IPBCC 08.610. Jurnal Kimia Valensi 6, 10–19.
- LEE Y.M., KIM M.J., LI H., ZHANG P., BAO B., LEE K.J., JUNG J.H. 2013: Marine-derived *Aspergillus* species as a source of bioactive secondary metabolites. Marine Biotechnol. 15, 499–519.
- LEITÃO A.L., ENGUITA F.J. 2016: Editorial: Secondary metabolisms. An unlimited foundation for synthetic biology. Front. Microbiol. 6, 1562. doi: 10.3389/fmicb.2015.01562.

- LIAUD N., GINIÉS CH., NAVARRO D., FABRE N., CRAPAT S., HERPOËL-GIMBERT I., LEVASSEUR A., RAOUCHE S., SIGOILLOT J.C. 2014: Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi, 10 pp.
- LIMA M.A.S., OLIVERIA M., PIMENTA A.T.A, UCHOA P.K.S. 2019: *Aspergillus niger*: A hundred years of contribution to the natural products chemistry. J. Braz. Chem. Soc. 30, 2029–2059.
- LORENZ N., HINTEMANN T., KRAMAREWA T., KATAYAMA A., YASUTA T., MARSCHNER P., KANDELER E. 2006: Response of microbial activity and microbial community composition, in soils to long-term arsenic and cadmium exposure. Soil Biol. Biochem. 38, 1430–1437.
- MAGGI O., CASADO M., PINEDA F.D. 2005: Effects of elevation, slope position and livestock exclusion on microfungi isolated from soils on Mediterranean grasslands. Mycol. 97, 984–995.
- MAHARANI V., REETA D., SUNDARAMANICKAM A., VIJAYALAKSHMAI S., BALASUBRAMIAN T. 2014: Isolation and characterization of citric acid producing *Aspergillus niger* from spoiled coconut. Int J. Curr. Microbio. Appl. Sci. 3, 700–705.
- MAJCHRZAK B., KUROWSKI T.P., WACHOWSKA U., JAŻWIŃSKA E. 2010: Changes in soil microbial communities as a results of growing Brassicaceae crop. Acta Bot. 63, 161–169.
- MANDAL S., BANERJEE P.C. 2005: Submerged production of oxalic acid from glucose by immobilized *Aspergillus niger*. Process Biochem. 40, 1605–1610.
- MASSI F.P., SARTORI D., DE SOUZA FERANTI, L., IAMANAKA B.T., TANIKAWI M.H., VIERA M.L., PELEGRINELLI FUNGARO M.H. 2016: Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. Ind. J. Food Microbiol. 16, 19–28.
- MIGAHEH F.F. 2003: Distribution of fungi in the sandy soil of Egyptian beaches. Mycobiol. 31, 61–67.
- MIKUŠOVÁ P., CABOŇ M., MELICHÁRKOVÁ A., URÍK M., RITIENI A., SLOVÁK M. 2020: Genetic diversity, ochratoxin A and fumonisin profiles of strains of *Aspergillus* section Nigri isolated from dried vine fruits. Toxins 12, 592. doi: 10.3390/toxins12090592.
- MOGENSEN J.M., FRISVAD J.C., THRANE U., NIELSEN K.F. 2009: Production of fumonisin B2 and B4 by *Aspergillus niger* on grapes and raisins. J. Agric. Food Chem. 58, 954–958.
- MORGAN J.A.W., BENDING G.D., WHITE P.J. 2005: Biological costs and benefits to plant–microbe interaction in the rhizosphere. J. Exp. Bot. 56, 1729–1739.

- MOSINA V., CHUPANKHINA G.N., MASLENNIKOV P.V., ZHANDAROVA J.A., DOVLETYAROVA E.A. 2020: Municipal solid waste landfills as a source of mycotoxins contamination in soil. IOP Conference Series: Earth Environ. Sci. 548, 022063.
- MOUBASCHER A.H., MUSTAFA A.F. 1970: A survey of Egyptian soil fungi with special reference to *Aspergillus*, *Penicillium* and *Penicillium* related genera. Trans. Brit. Mycol. Soc. 54, 35–44.
- MULLIS K.B. 1990: The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci. Am. 4, 56–65.
- NAIR R.B., LENNARTSSON P.P., TAHERZADES J. M. 2016: Mycelial pellet formation by edible acomycete filamentous fungi, *Neurospora intermedia*. AMB Express 6, 31.
- NELSON P.E., DESJARDINS A.E., PLATTNER R.D. 1993: Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. Annu. Rev. Phytopathol. 31, 233–252.
- NEMA A., PATNALA S.H., MANDAR, V., KOTA S., DEVARAI S.K. 2019. Production and optimalization of lipase using *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid-state fermentation. Bull. Natl. Res. Cen. 43, 82. doi.org/10.1186/s42269-019-0125-7.
- NIELSEN K.F., MORGENSEN J.M., JOHANSEN M., LARSEN T.O. 2020: Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. Anal. Bioanal. Chem. 395, 1225–1242.
- NIEVES-RIVERA A.M., SANTOS-FLORES C.J., DUGAN F.M., MILLER T.E. 2009: Guanophilic fungi in three caves of southwestern Puerto Rico. Int. J. Speleol. 38, 61–70.
- NJOROGE S.M., KANENGA K., SIAMBI M., WALIYAR F., MONYO E.S. 2016: Identification and toxigenicity of *Aspergillus* spp. From soils planted to peanuts in Eastern Zambia. Peanut Sci. 43, 148–156.
- NOONIM P., MAHAKARNCHANAKUL W., NIELSEN K.F., FRISVAD J.C., SAMSON R.A. 2009: Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger* in thai coffee beans. Food Addit. Contam. 6, 94–100.
- NOSALJ S., ŠIMONVIČOVÁ A. 2016. Vplyv prostredia na rast a enzymatickú aktivitu kmeňov druhu *Aspergillus niger*. Phytopedon 15, 29–32.
- NOSALJ S., ŠIMONVIČOVÁ A. 2019: Produkcia lipázy divých kmeňov druhu *Aspergillus niger* izolovaných z rôzneho prostredia. Phytopedon 18, 15–21.
- NOSALJ S., ŠIMONVIČOVÁ A., JESENÁK K., HUDEC P. 2020: Impact of inorganic powder additives on the size and morphology of pellets of the microscopic filamentous fungus *Aspergillus niger* (in press - NBCh).

- NOVÁKOVÁ J. 1989. Vliv jílových minerálů na biotické procesy v půdě. 1. vyd., Vysoká škola zemědělská, Praha. 168 pp.
- NOVÁKOVÁ A., ŠIMONVIČOVÁ A., KUBÁTOVÁ A. 2012: List of cultivable microfungi recorded from soils, soil related substrates and underground environment of the Czech and Slovak Republics. Ling page – Mycotaxon 119, 593.
- ODONI D.I., VAN GAAL M.P., SCHONEWILLE T., TAMAYO-RAMOS J.A., MARTINS DOS SANTOS V.A.P., SUAREZ-DIESZ M., SCHAAP P. 2017: *Aspergillus niger* secretes citrate to increase iron bioavailability. Front. Microbiol 8, 1424.
- OGUNMWONYI I.N., IGBINOSA O.E., AIYEGORO O.A., ODJADJARE E.E. 2008: Microbial analysis of different top soil samples of selected site in Obafemi Awolowo University, Nigeria. Sci. Res. Essays 3, 120–124.
- OKORSKI A., MAJCHRYAK B. 2007: Fungi isolated from soil before the seeding and after harvest of pea (*Pisum sativum* L.) after application of bio-control product EM 1. Acta Agrobot. 60, 113–121.
- OLUKUNLE O.F., OYEGOKE T.S. 2016: Biodegradation of crude-oil by fungi isolated from cow dung contaminated soils. Nig. J. Biotech. 31, 46-58. doi:dx.doi.org/10.4314/njb.v31i1.7.
- OMAKA E., KALU A. 2016: Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated environment: Laccase activity of *Penicillium freii* and *Aspergillus niger* at different pH. GJBAH 5, 135–138.
- OZKAN V.K., MUFTUOGLU N.M., GOCMEN H., TURKMEN C. 2001: The microfungi flora of some agricultural areas in the Ezine (Canakkale) Vicinity. Ot-Sist Bot Derg. The Herb. J. Syst. Bot. 8, 119–131.
- OZKARA A., OCAK I., KORCAN S.E., KONUK M. 2007: Determination of fungal air spora in Afyonkarahisar, Turkey. Mycotaxon 102, 199–202.
- PANDA T., PANI P.K., MISHRA N., MOHANTY R.B. 2010: A comparative account of the diversity and distribution of fungi in tropical forest soils and sand dunes of Orissa, India. J. Biodiv. 1, 27–41.
- PANGALLO D., BUČKOVÁ M., KRAKOVÁ L., PUŠKÁROVÁ A., ŠAKOVÁ N., GRIVALSKÝ T., CHOVANOVÁ K., ZEMÁNKOVÁ M. 2015: Biodeterioration of epoxy resin: a microbial survey through culture-independent and culture-dependent approaches. Environ. Microbiol. 17, 462–479.
- PAPAGIANNI M. 2014: Characterization of fungal morphology using digital image analysis techniques. Microb. Biochem. Technol. 6, 189–194.

- PATYSHAKULIYEVA A., ARENTSHORST M., ALLIJN I.E., RAM A.F.J., DE VRIES R.P., GELBER I.B. 2016. Improving cellulase production by *Aspergillus niger* using adaptive evolution. *Biotechnol. Lett.* 38, 969–974.
- PEÑALVA M.A., ARST H.N. JR. 2002: Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 426–446.
- PEÑALVA M.A., TILBURN J., BIGNELL E., ARST H.N.JR. 2008: Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol.* 16, 291–300.
- PERRONE G., LOGRIECO A.F., FRISVAD J.C. 2017: Comments on “Screening and identification of novel ochratoxin A producing fungi from grapes. *Toxins* 2016, 8, 333“. In *Reporting Ochratoxin A Production from Strains of Aspergillus, Penicillium and Talaromyces*. *Toxins* (Basel) 9, 65 pp. doi: 10.3390/toxins9020065.
- PEŤKOVÁ K., JURKOVICĽ., ŠIMONOVICĽOVÁ A., ČERŇANSKÝ S. 2014. Bioremediačný potenciál odstraňovania anorganických polutantov použitím *Aspergillus niger*. *Waste Forum* 1, 25.
- PITT J.I., HOCKING A.D. 2009: *Fungi and food spoilage*. Boston, USA. 591 pp.
- PFLIEGER W.P., PÓCSI I., GYORI Z., PUSZTAHELYI T. 2020: The *Aspergilli* and their mycotoxins: Metabolic interactions with plants and the soil biota. *Front. Microbiol.* 10, 2921. doi.org/10.3389/fmicb.2019.02921.
- POTYSZ A., GRYBOS M., KIERCZAK J., GUIBAUD G., FONDANECHÉ P., LENS P.N.L., VAN HULLEBUSCH E.D. 2017: Metal mobilization from metallurgical wastes by soil organic acids. *Chemosphere* 178, 197–211.
- PRASAD M.N.V., FREITAS H., FRAENZLE S., WUENSCHMANN S., MARKERT B. 2010: Knowledge explosion in phytotechnologies for environmental solutions. *Environ. Pollut.* 158, 18–23.
- PUŠKÁROVÁ A., BUČKOVÁ M., HABALOVÁ B., KRAKOVÁ L., MAKOVÁ A., PANGALLO D., 2016: Microbial communities affecting albumen photography heritage: a methodological survey. *Sci. Rep.* 6, 20810.
- RAAMN N., RAJITHA N., JAYSHREE A., JEGADEESH R. 2012: Biodegradation of plastic by *Aspergillus* spp. Isolated from polythene polluted sites around Chennai. *J. Acad. Ind. Res.* 1, 313–316.
- RAJU N.M., GOLLA, M., VENGATAMPALLI R. 2017: *Soil Enzymes. Influence of sugar industry effluents on soil enzyme activities*. Springer, Switzerland. 51 pp. ISSN 2191-5547. doi:10.1007/978-3-319-42655-6.

- RAGHUNATH R., RADHAKRISHNA A., ANGAYARKANNI J., PALANISWAMY M. 2012: Production and cytotoxicity studies of lovastatin from *Aspergillus niger* PN2 an endophytic fungi isolated from *Taxus baccata*. Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol. 3, 342–351.
- RAMACHANDRAN S., FONTANILLE P., PANDEY A., LARROCHE C. 2006: Gluconic acid: properties, applications and microbial production. J. Food Technol. Biotechnol. 44, 185–195.
- RAMIREZ N., CUTRIGHT T., JU L.K. 2001: Pyrene biodegradation in aqueous solutions and soil slurries by *Mycobacterium* PYR-1 and enriched consortium. Chemosphere 44, 1079–1086.
- RAMSAY M.A., SWANNELL R.P.J., SHIPTON W.A., DUKE N.C., HILL R.T. 2000: Effect of bioremediation community in oiled mangrove sediments. Mar. Pollut. Bull. 41, 413–419.
- RAO CH.S., GROVER M., KUNDU, S., DESAI S. 2017: Soil Enzymes. Encyclopedia of Soil Science. 3. Hyderabad, India. doi: 10.1081/E-ESS3-120052906.
- RASMUSSEN T.B., SKINDERSOE M.E., BJARNSHOLT T., PHIPPS R.K., CHRISTENSEN K.B., JENSEN P.O. 2005: Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. Microbiol. 151, 1325–1340.
- RASOULNIA P., MOUSAVI S.M. 2016: Maximalization of organic acids production by *Aspergillus niger* in a bubble column bioreactor for V a Ni recovery enhancement from power plant residual ash in spent-medium bioleaching experiments. Biores. Technol. 216, 729–736.
- REN W.X., LI P.J., GENG Y., LI X.J. 2009. Biological leaching of heavy metals from a contaminated soil by *Aspergillus niger*. J. Hazard. Mater. 167, 164–169.
- RENELLA G., LANDI L., NANNIPIERI P. 2004. Degradation of low-molecular weight organic acids complexed with heavy metals in soil. Geoderma 122, 311–315.
- RICE A.V., CURRAH R.S. 2005: *Oidiodendron*: A survey of the named species and relate anamorphs of *Myxotrichum*. Stud. Mycol. 53, 83–120.
- ROHLFS M., CHURCHILL A.C.L. 2011: Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. Fungal Genet. Biol. 48, 23–34.
- ROHLFS M., KÜRCHNER L. 2010: Saprophagous insect larvae, *Drosophila melanogaster*, profit from increased species richness in beneficial microbes. J. Appl. Entomol. 134, 667–671.
- ROHLFS M., ALBERT M., KELLER N.P., KEMPKEN F. 2007: Secondary chemicals protect mould from fungivory. Biol. Lett. 3, 523–525.

- ROLA B., PAWLIK A., FRAC M., MALEK W., TARGONSKI Z., ROGALSKI J., JANUSZ G. 2015: The Phenotypic and genomic diversity of *Aspergillus* strains producing glucose dehydrogenase. *J. Pol. Biochem. Soc. Pol. Acad. Sci.* 62, 747–755.
- RUIJTER G.J.G, VAN DE VONDERVOORT P.J.I, VISSER, J. 1999: Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: an oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH 5 and in the presence of manganese. *Microbiol.* 145, 2569–2576.
- SAMSON R.A., NOONIM, P., MEIJER, M., HOUBRAKEN, J., FRISVAD, J.C., VARGA, J. 2007: Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Stud. Mycol.* 59, 129–145.
- SAMSON R.A., VISAGIE C.M., HOUBRAKEN J., HONG S.B., HUBKA V., KLASSEN C.H.W., PERRONE G., SEIFERT K.A., SUSCA A., TANNEY J.B., VARGA J., KOCSUBÉ S., SZIGETI G., YAGUCHI T., FRISVAD J.C. 2014: Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* 78, 141–173.
- SAMUEL P., PRABAKAN P.P. 2011: Biodiversity of marine fungi recorded from Adirampattinam costal environs, south east coast of Tamilnadu. *World J. Sci. Technol.* 1, 78–82.
- SANTHI R., JAGADEESWARI S. 2015: Study of lead (II) biosorption using *Aspergillus niger* and its optimization studies. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 2, 102–108.
- SALAZAR J.A., RASOULI M., MARTÍNEZ - GÓMEZ P. 2014: Random amplified microsatellite polymorphism (RAMP) amplification in *Prunus* characterization and mapping. *Acta Hortic.* 1028, 61–64.
- SELVIG K., ALSPAUCH J.A. 2011: pH Response Pathways in Fungi: Adapting to host-derived and environmental signals. *Mycobiol.* 39, 249–256.
- SCHNEIDER K., HAFNER C., JÄGER I. 2004: Mutagenicity of textile dye products. *J. Appl. Toxicol.* 24, 83–91.
- SHANKAR T., SIVAKUMAR T. 2016: Optimization of Citric Acid Production Using *Aspergillus niger* Isolated from the Leaf Litter Soil of Sathuragiri Hill. *Univ. J. Microbiol. Res.* 4, 79–87.
- SHARMA G., PANDEY R.R., SINGH M.S. 2011: Microfungi associated with surface soil and decaying leaf litter of *Quercus serrata* in a subtropical natural oak forest and managed plantation in Northeastern India. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5, 777–787.
- SHEN G., LU Y., ZHOU Q., HONG J. 2005: Interaction of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals on soil enzymes. *Chemosphere* 61, 1175–1182.

- SHOW P.L., OLADELE K.O., SIEW Q.Y., ZYKRY F.A.A., LAN J.CH.-W., LING T.CH. 2015: Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. Front. Life Sci. 8, 271-283. <http://dx.doi.org/10.1080/21553769.2015.1033653>.
- SINGH A., WARD O.P. 2004: Biodegradation and Bioremediation. Springer Science & Business Media.
- SINGH S. M., SINGH S.K., YADAV L. S., SINGH P. N., RAVINDRA R. 2012: Filamentous soil fungi from Ny-Ålesund, Spitzberg, and screening from extracellular enzymes. Arctic 65, 45–55.
- SINGH M., SRIVASTAVA P.K., VERMA P.C., KHARWAR R.N., SINGH N., TRIPATHI R.D. 2015: Soil fungi for mycoremediation of arsenic pollution in agriculture soils. J. Appl. Microbiol. 119, 1278–1290.
- SOCIETAS PEDOLOGICA SLOVACA 2014: Morfogenetický klasifikačný systém pôd Slovenska. Bazálna referenčná taxonómia. Druhé upravené vydanie. Bratislava: NPPC – VÚPOP Bratislava, 96 pp. ISBN: 978-80-8163-005-7.
- SOSAK-SWIDERSKA B. 2010: The soil fungi communities and risk assessment of heavy metal contaminated soils management. Geophys. Res. Abstr. 12, 14357.
- SRIVASTAVA S., THAKUR I.S. 2006: Evaluation of bioremediation and detoxification potentiality of *Aspergillus niger* for removal of hexavalent chromium in soil microcosm. Soil Biol. Biochem. 38, 1904–1911.
- STEFANOWICZ A.M. 2006: The Biolog Technique as a Tool in Ecological Studies of Microbial Communities. Pol. J. Environ. Stud. 15, 669–676.
- STEIMAN R., FORD L., DUCROS V., LAFOND J.L., GUIRAUD P. 2004: First survey of fungi in hypersaline soil and water of Mono Lake area (California). Antonie van Leeuwenhoek 85, 69–83.
- STĘPIEŃ Ł. 2020: *Fusarium*: Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity. Microorg. 8, 1404. doi.org/10.3390/microorganisms8091404.
- STORARI M., DENNERT F.G., BIGLER L., GESSLER C., BROGGINI G.A.L. 2012: Isolation of mycotoxins producing black aspergilli in herbal teas available on the Swiss market. Food Control 26, 157–161.
- SUDHA M., SARANYA A., SELVAKUMAR G., SIVAKUMAR N. 2014: Microbial degradation of azo dyes: A review. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 3, 670–690.
- SUHAIL M., IRUM F., JATT T., KOREJO F., ABRO H. 2007: *Aspergillus* mycoflora isolated from soils of Kotri Barrage Sindh, Pakistan. Pak. J. Bot. 39, 981–984.

- SUSCA A., PROCTOR R.H., BUTCHKO R.A., HAIDUKOWSKI M., STEA G., LOGRIECO A.F. 2014: Variation in the fumonisin biosynthetic gene cluster in fumonisin-producing and non-producing black aspergilli. *Fungal Genet. Biol.* 73, 39–52.
- SUSCA A., PROCTOR R.H., MORELLI M., HAIDUKOWSKI M., GALLO A., LOGRIECO A.F., MORETTI A. 2016: Variation in fumonisin and ochratoxin production associated with differences in biosynthetic gene content in *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* isolates from multiple crop and geographic origins. *Front. Microbiol.* 7, 1412. doi: 10.3389/fmicb.2016.01412.
- ŠARAPATKA B. 2002: Možnosti využítí aktivity enzymů jako indikátorů produktivity a kvality systémů. In: *Biologické indikátory kvality půd*. Brno: MZLU, 26–31.
- ŠIMONVIČOVÁ A. 2013: Biodiverzita mikroskopických húb v pôdnych typoch Slovenska. 1.vyd. Univerzita Komenského v Bratislave, 80 pp.
- ŠIMONVIČOVÁ A., ĎUGOVÁ O. 2008: Mykocenóza vybraných lokalít lužného lesa v regióne Gabčíkovo. *Acta Environ. Univ. Comen. (Bratislava)* 16, 79–86.
- ŠIMONVIČOVÁ A., ČERNÁNSKÝ S. 2016: Mikroskopické vlákňité huby izolované z pôdy a z odkaliska opusteného antimonového ložiska na lokalite Poproč a ich enzymatická aktivita. *Geochémia*. 147–148.
- ŠIMONVIČOVÁ A., ŠEVC J., IRÓ S. 2002: *Trichoderma viride* Pers. ex Gray as biosorbent of heavy metals. *Ekológia, Bratislava* 21, 298–306.
- ŠIMONVIČOVÁ A., HLINKOVÁ E., CHOVANOVÁ K., PANGALLO D. 2013b: Influence of the environment on the morphological and biochemical characteristics of different *Aspergillus niger* wild type strains. *Indian J. Microbiol.* 53, 187–193.
- ŠIMONVIČOVÁ A., JESENÁK K., NOSALJ S., HUDEC P. 2020: Vplyv anorganických práškových látok na veľkosť peliet mikroskopickej vlákňitej huby *Aspergillus niger*. *Phytopedon, Bratislava*, 19, 1–9.
- ŠIMONVIČOVÁ A., KRAKOVÁ L., PAUDITŠOVÁ E., PANGALLO D. 2019: Occurrence and diversity of cultivable autochthonous microscopic fungi in substrates of old environmental loads from mining activities in Slovakia. *Ecotoxicol. Environ Saf.* 172, 194–202.
- ŠIMONVIČOVÁ A., PANGALLO D., CHOVANOVÁ K., KRAKOVÁ L. 2013c: Mikroskopické huby v riečnych sedimentoch potoka Smolník. *Acta Environ. Univ. Comen. (Bratislava)*, 21, 60–68.
- ŠIMONVIČOVÁ A., PIECKOVÁ E., FERIANC P., HANAJÍK P., HORVÁTH R. 2013a: *Environmentálna mikrobiológia*. 1.vyd. Univerzita Komenského v Bratislave, 276 pp.

- ŠIMONOVICHOVÁ A., MACHARIKOVÁ M., PELECHOVÁ DRONGOVÁ Z., TAKÁČOVÁ A., MIŠÍKOVÁ K., GUTTOVÁ A. 2016a: Biodiverzita mikroskopických vláknitých húb a nižších rastlín. Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava, 194 pp.
- ŠIMONOVICHOVÁ A., FERIANC P., VOJTKOVÁ H., PANGALLO D., HANAJÍK P., KRAKOVÁ L., FEKETEHOVÁ Z., ČERŇANSKÝ S., OKENICOVÁ L., ŽEMBERYOVÁ M., BUJDOŠ M. 2017: Alkaline technosol contaminated by former mining activity and its culturable autochthonous microbiota. *Chemosphere* 171, 89–96.
- ŠIMONOVICHOVÁ A., PEŤKOVÁ K., JURKOVIC L., FERIANC P., VOJTKOVÁ H., REMENÁR M., KRAKOVÁ L., PANGALLO D., HILLER E., ČERŇANSKÝ, S. 2016b: Autochthonous microbiota in arsenic-bearing technosols from Zemianske Kostolany (Slovakia) and its potential for bioleaching and biovolatilization of arsenic. *Water Air Soil Pollut.* 227, 336. doi. 10.1007/s11270-016-3038-1.
- ŠIMONOVICHOVÁ A., KUPKA D., NOSALJ S., KRAKOVÁ L., DRAHOVSKÁ H., BARTOVÁ Z., VOJTKOVÁ H., BOTUROVÁ K., PANGALLO D. 2020. Differences in metabolites production using the Biolog FF Microplate™ system with an emphasis on some organic acids of *Aspergillus niger* wild type strains. *Biologia* 75, 1537–1546. doi.org/10.2478/s11756-020-00521-y.
- ŠIMONOVICHOVÁ A., VOJTKOVÁ H., NOSALJ S., ŠVEHLÁKOVÁ H., KRAKOVÁ L., DRAHOVSKÁ H., BOTUROVÁ K., VAŠINKOVÁ M., PANGALLO D. 2021: Application of the Biolog FF Microplate™ system for determining the biological profile of *Aspergillus niger* wild type strains isolated from different environments (in press).
- TAM N.F.Y., GUO C.L., YAU C., KE L., WONG Y.S. 2003: Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortium enriched from mangrove sediments. *Water Sci. Technol.* 48, 177–183.
- TANNEY J.B., VISAGIE C.M., YILMAZ N., SEIFERT K.K. 2017: *Aspergillus* subgenus *Polypaecilum* from the built environment. *Stud. Mycol.* 88, 237–267.
- TELKE A.A., KADAM A.A., JAGTAP S.S., JADHAV J.P., GOVINDWAR S.P. 2010: Biochemical characterization and potential for textile dye degradation of blue laccase from *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15, 696–703.
- TONG Z., ZHENG X., TONG Y., SHI Y.-CH., SUN J. 2019: Systems metabolic engineering for citric acid production by *Aspergillus niger* in the post-genomic era. *Microb. Cell Factories* 18, 28. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1064-6>.
- TÓTH R., ŠKULTÉTYOVÁ S., HILLER E., JURKOVIC L., ŠOTTNÍK P., VOZÁR J., TATARKOVÁ V. 2014: Mobilita potenciálne toxických prvkov v sedimentoch odkaliska Slovinky a ich

transport do okoliťého životného prostredia.

www.ekomonitor.eu/sites/default/files/soubory/2013/toth_ft.pdf.

- UPTON D.J., MCQUEEN-MASON S.J., WOOD A.J. 2017: An accurate description of *Aspergillus niger* organic acid batch fermentation through dynamic metabolic modelling. *Biotechnol. Biofuels*. 10, 258. Doi: 10.1186/s13068-017-0950-6.
- URÍK M., BUJDOŠ M., MILOVÁ-ŽIAKOVÁ B., MIKUŠOVÁ P., SLOVÁK M., MATÚŠ P. 2015: Aluminium leaching from red mud by filamentous fungi. *J. Inorg. Biochem.* 152, 154–159.
- URZI C., DE LEO F., KRAKOVA L., PANGALLO D., BRUNO L. 2016: Effects of biocide treatments on the biofilm community in Domitilla's catacombs in Rome. *Sci. Tot. Environ.* 572, 252–262.
- UZTAN H.A., ATEŞ M., GUVENSEN A., ABACI O. 2005: Potentially allergic fungi and pollen grains of a atmosphere of Izmir. *Avrupa ekoloji kongresi* 8–13.
- UTOBO E., B., TEWARI L. 2015: Soil enzymes as bioindicators of soil ecosystem status. *Appl. Ecol. Environ. Res* 13, 147–169.
- VAN KUYKP.A., CHEETHAM B.F., KATZ M.E. 2000: Analysis of two *Aspergillus nidulans* genes encoding extracellular proteases. *Fungal Genet. Biol.* 29, 201–210.
- VEITER L., RAJAMANICKAM V., HERWIG CH. 2018: The filamentous fungal pellet – relationship between morphology and productivity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 2997–3006.
- VISHWANATHA K.S., RAO A.G., SINGH S.A.J. 2010: Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization process parameters. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37, 129–138.
- VOJTKOVÁ H. 2014: *Pseudomonas*: new isolates of metal resistant bacteria from the anthropogenic sediment of settling basins. Košice: Technická univerzita v Košiciach. ISBN 978-80-553-1839-4.
- VOJTKOVÁ H. 2015: Biodiversity of *Pseudomonas* bacterial strains isolated from Ostrava Lagoons, Czech Republic. 15th International Multidisciplinary Scientific GeoConference Surveying Geology and Mining Ecology Management SGEM 1, 6, 291–296. doi:10.5593/SGEM2015/B61/S25.040.
- WALASZCZYK E., PODGÓRSKI W., JANCZAR-SMUGA M., DYAMARSKA E. 2018: Effect of pH on chemical selectivity of oxalic acid synthesis by *Aspergillus niger* W78C in submerged batch cultures with sucrose as a carbon source. *Chem. Pap.* 72, 1089-1093. doi.org/10.1007/s11696-017-0354-x.

- WANG Y.D., LI G.Y., DING D.X., ZHOU Z.X., DENG Q.W., HU N., TAN Y. 2013: Uranium leaching using mixed organic acids produced by *Aspergillus niger*. J. Radioanal. Nucl. Chem. 298, 769–773.
- WANG R., ZHU K., GANG L., WANG J., LI B., XIU M.W., LIU H.F., ZHAO J.N., YANG D.L. 2018: Metabolic characteristics of responses of soil fungi to land-use changes in the hilly regions of northeast China. J. Agro-Environ. Sci. 37, 154–169.
- XINHUI D., RUNHUA CH., YAN S., SHENGNAN Z. 2018: preliminary bioleaching of heavy metals from contaminated soil applying *Aspergillus niger* F2. AJESE 2, 72–78.
- YANG L., LÜBECK M., LÜBECK P.S. 2017: *Aspergillus* as a versatile cell factory for organic acid production. Fungal Biol. Rev. 31, 33–49.
- YE F., GONG D., PANG C., LUO J., SHANG CH. 2020: Analysis of fungal composition in mine-contaminated soils in Hechi City. Curr. Microbiol. 77, 2685–2693. doi: 10.1007/s00284-020-02044-w.
- YE J.S., YIN H., QIANG J., PENG H., QIN H.M., ZHANG N., HE B.Y. 2011: Biodegradation of anthracene by *Aspergillus fumigatus*. J. Hazard. Mater. 185, 174–181, doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.015.
- YIN X., SHIN H.D., LI J., DU G., LIU L., CHEN J. 2017: Comparative genomics and transcriptome analysis of *Aspergillus niger* and metabolic engineering for citrate production. Sci. Rep. 7, 1–14.
- ZBIERKA ZÁKONOV 2004: Č. 220 Zákon o ochrane a využívaní poľnohospodárskej pôdy a zmene zákona č. 245/2003 Z. z. o integrovanej prevencii a kontrole znečisťovania životného prostredia a o zmene a doplnení niektorých zákonov 2278–2315.
- ZOLLINGER H. 1987: Color Chemistry – Syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments. New York, VCH, 92–102.
- ZENG X., WEI S., SUN L., JACQUES A.D., TANG J., LIAN M., JI Z., WANG J., ZHU J., XU Z. 2015: Bioleaching of heavy metals from contaminated sediments by the *Aspergillus niger* strain SY1. J. Soils Sediments 15, 1029–1038.
- ZHEN L., TONGSHUO B., LETIAN D., FUWEI W., SHITING M., YUNXIAO H., WANG S., SHUJIN H. 2016: A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. Sci. Rep. 6, 1–8.
- ŽNIDARŠČIČ P., PAVKO A. 2001: The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. Foot Technol. Biotechnol. 39, 237–252.

Nosalj, S. a kol.

Environmentálne kmene mikroskopickéj vláknitej huby *Aspergillus niger* a ich fenotypová a molekulárna charakteristika

Vydala Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava

Korigovali autorky

Rozsah 109 strán; 7,96 AH; 1. Vydanie

Náklad 200, CD.ROM

ISBN 978-80-248-4506-7