

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA**

3003783

**ŠTÚDIUM POTENCIÁLNE TOXINOGENNÝCH DRUHOV
RODU *ASPERGILLUS* A ASOCIOVANÝCH TELEOMORF
IZOLOVANÝCH ZO ZRNA PŠENICE SLOVENSKEHO
PÔVODU**

2010

Mária Dovičičová, Ing.

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA**

**ŠTÚDIUM POTENCIÁLNE TOXINOGENNÝCH DRUHOV
RODU *ASPERGILLUS* A ASOCIOVANÝCH TELEOMORF
IZOLOVANÝCH ZO ZRNA PŠENICE SLOVENSKÉHO
PÔVODU**

Dizertačná práca

Študijný program:	Technológia potravín
Študijný odbor:	6.1.13 Spracovanie poľnohospodárskych produktov
Školiace pracovisko:	Katedra mikrobiológie
Školiteľ:	Dana Tančinová, doc. Ing. PhD.

Čestné vyhlásenie

Podpísaná Mária Dovičičová vyhlasujem, že som záverečnú prácu na tému „Štúdium potenciálne toxínogénnych druhov rodu *Aspergillus* a asociovaných teleomorfov izolovaných zo zrna pšenice slovenského pôvodu“ vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Som si vedomá zákonných dôsledkov v prípade, ak uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Nitre 25. Júna 2010

Mária Dovičičová

Pod'akovanie

Moja vd'aka patri školitel'ke, doc. Ing. Dane Tančinovej, PhD., doc. Ing. Romanovi Labudovi, prof. Jensovi C. Frisvadovi, spoluriešitel'kám výskumných projektov Ing. Zuzane Maškovej, Ing. Soni Felšöciovej, PhD., Ing. Zuzane Barborákovej, kolegynkám (bývalým) študentkám Ing. Veronike Milovej, Ing. Kristíne Štefánikovej, Bc. Lucii Sýkorovej a kolektívu Katedry mikrobiológie.

Tomu a tým, ktorí ma sprevádzali v škole a v laboratóriách v mojom srdci.

Abstrakt

Ciele práce boli: priniesť prehľad o aktuálnom druhovom spektre aspergilov, osídľujúcich zrno obilnín slovenského pôvodu, priniesť informácie o mykotoxinogénnej potencii izolovaných kmeňov aspergilov, zaznamenať nálezy druhov, nových pre územie Slovenska, charakterizovať izolované kmene a uchovať ich v kolekciiach kultúr mikroorganizmov. Zo 73 vyšetrených vzoriek zrna bolo 57 vzoriek pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.), 2 vzorky pšenice špaldovej (*Triticum spelta* L.) a singulárna vzorka jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.), zberaných na najmenej 23 lokalitách Slovenska v rokoch 2006–2008, osídlených minimálne jedným druhom rodu *Aspergillus* Fr.: Fr. a/ alebo asociovaných perfektných rodov *Eurotium* Link: Fr. a *Emericella* Berk. Spolu bolo detegovaných 20 *sensu stricto* a 12 pomocných taxónov s najvyššou frekvenciou výskytu *Eurotium amstelodami* (45,21 %), *Aspergillus flavus* (42,47 %) a *E. repens* (34,25 %). V čistých kultúrach reprezentatívnych izolátov jednotlivých druhov bolo detegovaných 68 rôznych extrolitov, z nich aflatoxín B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, fumigaklavín, fumigaklavín C, fumitremorgín A a B, kyselina cyklopiazonová, kyselina penicilová, ochratoxín A, patulín, sterigmatocystín, verukulogén, viomeleín, vioxantín a xantomegnín sú mykotoxíny *sensu stricto*. Iní autori popísali toxickú, antikarcinogénnu, antibiotickú a antioxidačnú aktivitu ďalších detegovaných extrolitov. Izolácie *Eurotium appendiculatum* Blaser, *E. cristatum* (Raper & Fennell) Malloch & Cain, *Aspergillus tubingensis* Mosseray, *A. tritici* B.S. Mehrotra & M. Basu a *A. westerdijkiae* Frisvad & Samson sú prvými nálezmi druhov na území Slovenska. Izolácia aflatoxinogénneho kmeňa *A. parasiticus* MD 502 zo zrna pšenice slovenského pôvodu je prvým nálezom druhu v potravinárskej komodite slovenského pôvodu. Metódou LC-MS/MS bola stanovená toxinogénna potencia kmeňa na modifikovanom syntetickom tekutom médiu AetM [v mg · l⁻¹]: aflatoxín B₁ 15,7; aflatoxín G₁ 23,4; aflatoxín B₂ 0,52; aflatoxín G₂ 0,68; aflatoxín M₁ 0,18; kyselina kojová 227. Aflatoxinogénna potencia nebola metódou tenkovrstvovej chromatografie zistená pri žiadnom zo 41 izolátov *Aspergillus flavus* z 28 vzoriek. Izoláty diagnostikovaných taxónov sú uchované v Kolekcii kultúr húb na Katedre mikrobiológie Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre a v IBT kolekcii kultúr Dánskej technickej univerzity.

Kľúčové slová: *Aspergillus*, *Eurotium*, zrno pšenice, extrolity, mykotoxíny

Abstract

The aims of the study were: to bring an overview of the current spectrum of the *aspergilli* inhabiting the cereal grains of Slovak origin; to bring the information about the mycotoxigenic potency of isolated strains; to record the findings of new species for Slovakia; to characterize isolated strains; to preserve the isolated strains in cultural collections. From a total of 73 investigated grain samples, 57 samples of *Triticum aestivum* L., 2 samples of *Triticum spelta* L. and a single sample of *Hordeum vulgare* L. harvested in at least 23 localities of Slovakia in the years 2006-2008 were inhabited by at least one species of the genus *Aspergillus* Fr.:Fr. and/or associated perfect genera, namely *Eurotium* Link:Fr. and *Emericella* Berk. Altogether 20 taxa and 12 species groups were detected. *Eurotium amstelodami* (45.21%), *Aspergillus flavus* (42.47%) and *E. repens* (34.25%) were encountered with the highest frequency (given in brackets). Altogether 68 various extrolites were detected in the pure cultures of representative isolates of the species spectrum. Out of these, aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, fumigaclavine, fumigaclavine C, fumitremorgin A & B, cyclopiazonic acid, penicillic acid, ochratoxin A, patulin, sterigmatocystin, verruculogen, viomellein, vioxanthin and xanthomegnins are mycotoxins *sensu stricto*. Other authors reported the toxic, anticancer, antibiotic and antioxidant activity of other detected extrolites. The isolations of *Eurotium appendiculatum* Blaser, *E. cristatum* (Raper & Fennell) Malloch & Cain, *Aspergillus turingensis* Mosseray, *A. tritici* B.S. Mehrotra & M. Basu and *A. westerdijkiae* Frisvad & Samson are the first findings of the species in Slovakia. The endogenous isolation of aflatoxigenic strain *A. parasiticus* MD 502 from the wheat grain is the first finding of the species in food commodity of Slovak origin. The toxigenic potency of the strain on the modified synthetic liquid medium AetM was detected by LC-MS/MS as follows (in mg.L⁻¹): aflatoxin B₁ 15.7, aflatoxin G₁ 23.4, aflatoxin B₂ 0.52, aflatoxin G₂ 0.68, aflatoxin M₁ 0.18, kojic acid 227. The aflatoxigenic potency was not found in any of 41 *Aspergillus flavus* isolates from 28 samples by using the thin layer chromatography. Isolates of diagnosed species are preserved in the Fungal Collection at the Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture in Nitra and in the IBT Culture Collection of the Technical University of Denmark.

Key words: *Aspergillus*, *Eurotium*, wheat grains, extrolites, mycotoxins

Obsah

Obsah	6
Zoznam skratiek a značiek.....	8
Úvod	12
1 Súčasný stav riešenej problematiky doma a v zahraničí.....	14
1.1 Vlákňité mikroskopické huby na obilninách	14
1.1.1 Poľné a skladové huby	14
1.1.2 Faktory ovplyvňujúce rozvoj mikroskopických húb a produkciu mykotoxínov na skladovaných substrátoch.....	15
1.1.3 Aspergily asociované so skladovaným zrnom obilnín v podmienkach mierneho pásma.....	16
1.2 Charakteristika aspergilov	17
1.2.1 Druhovú koncepciu	17
1.2.2 Nomenklatúra.....	17
1.2.3 Taxonómia	18
1.2.4 Reprodukcia	25
1.2.5 Morfológia	28
1.2.6 Výskyt.....	30
1.2.7 Antropocentrický význam.....	30
1.2.8 Extrolity	32
2 Ciele práce.....	38
3 Metodika práce a metódy skúmania	39
3.1 Biologický materiál	39
3.1.1 Vyšetrené vzorky zrna obilnín	39
3.2 Mykologické analýzy	41
3.2.1 Izolácia aspergilov zo zrna obilnín	41
3.2.2 Identifikácia aspergilov do úrovne rodov a druhov	42
3.3 Kultivačné analýzy	44
3.3.1 Detekcia aflatoxín produkujúcich kmeňov	44
3.3.2 Ružové zafarbenie konídií anízaldehydom	44
3.4 Analýzy extrolitov	45
3.4.1 Tenkovrstvová chromatografia (TLC).....	45

3.4.2	Vysokotlaková kvapalinová chromatografia s detekciou sústavou diód (HPLC-DAD)	45
3.4.3	Kvapalinová chromatografia s tandemovou spektrometriou más (LC-MS/MS)	46
4	Výsledky práce a diskusia	47
4.1	Osídlenie vyšetrených vzoriek aspergilmí.....	47
4.2	Potenciálny vplyv detegovaných taxónov na kvalitu a bezpečnosť zrna	53
4.3	Štúdium izolátov jednotlivých taxonomických skupín	59
4.4	Extrolity detegované v metabolickom profile izolátov	103
4.5	Spektrum a územná distribúcia druhov	111
5	Záver.....	117
6	Zoznam použitej literatúry.....	120
7	Prílohy	134

Zoznam skratiek a značiek

%	per cento
<	menší ako
=	rovný
>	väčší ako
±	plus-mínus
≤	menší/ rovný
≥	väčší/ rovný
°C	stupeň Celzia
μl	mikroliter; 10 ⁻⁶ l
μm	mikrometer; 10 ⁻⁶ m
5/2 agar	agar s 5 % V8 džúsu a 2 % agaru
A.	<i>Aspergillus</i>
AetM	médium Adye et Mateles
AFPA	selektívne médium pre <i>Aspergillus flavus</i> / <i>A. parasiticus</i>
angl.	z anglického slova
BSL	stupeň biologickej bezpečnosti
cf.	porovnaj (lat. <i>cōnfer</i>); neistota v diagnostikácii a označenie druhu, na ktorý sa izolát najviac podobá
CO ₂	oxid uhličitý
CREA	agar s kreatínom a sacharózou
CY20S	Czapkov agar s kvasničným extraktom a 20 % sacharózy
CY40S	CY20S, modifikované navýšením sacharózy na 40 %
CYA	Czapkov agar s kvasničným extraktom
CYAS	Czapkov agar s kvasničným extraktom a 5 % NaCl
CYAS20	CYAS, modifikované navýšením NaCl na 20 %
CZ	Czapkov agar (s prídavkom roztoku stopových prvkov)
DCPA	agar s dichlóranom, chloramfenikolom a peptónom
DNA	deoxyribonukleová aminokyselina

DRBC	agar s dichlóranom, Bengálskou červeňou a chloramfenikolom
DTU	Dánska technická univerzita
DYSG	agar s dichlóranom, chloramfenikolom, kvasničným extraktom a glycerolom
<i>E.</i>	<i>Eurotium</i>
<i>Em.</i>	<i>Emericella</i>
Fe ³⁺	železitý katión
g	gram
GRAS	vo všeobecnosti považovaný za bezpečný
<i>H.</i>	<i>Hordeum</i>
hod	hodina
HPLC-DAD	vysokotlaková kvapalinová chromatografia s detekciou sústavou diód
ICBN	Medzinárodný kód botanickej nomenklatury
IFA	Medziuniverzitný výskumný ústav agrárnej biotechnológie
IMS	Medzinárodná spoločnosť pre mykotoxikológiu
<i>in situ</i>	na mieste
<i>in vitro</i>	v skúmavke
Kap.	kapitola
l	liter; dm ³
lat.	z latinského slova
LC-MS/MS	kvapalinová chromatografia s tandemovou spektrometriou más
MBTH	metylbentotiazolum hydrochlorid
MD	kolekcia kultúr mikroorganizmov autorky
MEA	agar so sladínovým extraktom
mg	miligram; 10 ⁻³ g
min	minúta
ml	mililiter; 10 ⁻³ l
mm	milimeter; 10 ⁻³ m
<i>N.</i>	<i>Neosartorya</i>

NaCl	chlorid sodný
nem.	z nemeckého slova
nm	nanometer; 10^{-9} m
NRRL	kolekcia kultúr mikroorganizmov Agricultural Research Service
o-	orto
O ₂	kyslíka
OA	agar s extraktom z ovsených vločiek
Obr.	obrázok
p-	para
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxóniových katiónov
rpm	otáčky za minútu
<i>s. l.</i>	v širšom zmysle (lat. <i>sēnsū lātō</i>)
SEM	skenovací elektrónový mikroskop
<i>sēnsū lātō</i>	v širšom zmysle
<i>sēnsū stricto</i>	v užšom zmysle
skup.	skupina
sp.	druh (lat. <i>speciēs</i>)
spp.	druhy (lat. <i>speciēs</i>)
STN ISO	Slovenská technická norma, isonorma
syn.	synonymum
<i>T.</i>	<i>Triticum</i>
Tab.	tabuľka
TLC	tenkovrstvová chromatografia
USA	Spojené štáty americké
UV	ultrafialové žiarenie
v/v	objem/ objem
v/v/v	objem/ objem/ objem
<i>var.</i>	varieta (lat. <i>varietās</i>)
<i>vs.</i>	verzus (lat. <i>versus</i>)

vz.	vzorka
YES	agar s kvasničným extraktom a sacharózou
ZB	kolekcia kultúr mikroorganizmov Ing. Zuzany Barborákovej
ZSSR	Zväz sovietskych socialistických republík

skratky mien autorov taxónov (Index Fungorum, 2010):

Ahlb.	Ahlburg, Hermann
B.S. Mehrotra	Mehrotra, Brahma Swarup
Berk.	Berkeley, Miles Joseph
Delacr.	Delacroix, Edouard Georges
Desm.	Desmazières, John Baptiste Henri Joseph
E. Cohn	Cohn, E.
Fr.	Fries, Elias Magnus
Fresen.	Fresenius, Johann Baptist Georg Wolfgang
G. Smith	Smith, George
G. Wilh.	Wilhelm, Gerould
G. Winter	Winter, Heinrich Georg
L. Mangin	Mangin, Louis Alexandre
L.	Linnaeus, Carl
M. Basu	Basu, Monica
Novobr.	Novobranova, T. I.
Sacc.	Saccardo, Pier Andrea
Tiegh.	Tieghem, Phillippe Edouard Leon van
Tirab.	Tiraboschi, Carlo
Vuill.	Vuillemin, (Jean) Paul
W. Bremer	Bremer, Widar

Úvod

Pšenica letná forma ozimná je na území Slovenskej republiky najvýznamnejšou obilninou. Múka získavaná z jej zrna je základnou surovinou na výrobu chleba a ďalších produktov, ktoré sú súčasťou každodenného jedálneho lístka väčšiny obyvateľov. Zrno pšenice je tiež významnou zložkou krmív v živočíšnej výrobe. Zrno obilnín môže byť počas rastu na poli, zberu, skladovania a spracovania z potravinárskeho hľadiska znehodnocované vláknitými mikroskopickými hubami (takzvanými plesňami) a produktmi ich sekundárneho metabolizmu. Súčasťou mykocenózy povrchu a vnútra pšeničného zrna sú zvyčajne aj aspergily, t. j. druhy anamorfného (nepohlavného, imperfektného) rodu *Aspergillus* a druhy asociovaných teleomorfných (pohlavných, perfektných) rodov. K ich rozvoju dochádza najčastejšie pri skladovaní zrna. Aspergily sú vo všeobecnosti potenciálnymi producentmi najsilnejších známych prírodných karcinogénov, aflatoxínov a množstva ďalších mykotoxínov a toxických sekundárnych metabolitov. Tvorba mykotoxínov a/ alebo ďalších toxických látok je druhovo alebo kmeňovo špecifická a kmene rovnakého druhu sa môžu v tomto znaku líšiť. Výskyt jedincov potenciálne toxinogénnych druhov vláknitých mikroskopických húb na pšenici indikuje možné riziko zníženej kvality a bezpečnosti potravín a krmív, získavaných z jej zrna. Problematika výskytu, detekcie a redukcie mykotoxínov a ich producentov v potravinách a krmivách je významná a stále aktuálna, o čom svedčí aj minuloročná septembrová konferencia Medzinárodnej spoločnosti pre mykotoxikológiu (ISM Conference 2009- Worldwide Mycotoxin Reduction in Food and Feed Chains, Tulln, Rakúsko), na ktorej o nej rokovalo niekoľko sto vedcov z celého sveta vrátane autorít z oblasti mikromykológie a mykotoxikológie. Izolácia, presná druhová identifikácia a skrining potencie aspergilov produkovať mykotoxíny a toxické sekundárne metabolity sú súčasťou základného výskumu, ktorý poskytuje bázu pre správny odhad rizika, plynúceho z ich výskytu v konkrétnej komodite v konkrétnej krajine (geograficko-klimatickom regióne). Dôležitejšia ako počet izolátov toho- ktorého druhu, je identita a zistené prítomné spektrum, pretože pri vzniku vhodných podmienok pre germináciu, rast a rozmnožovanie dôjde ku zníženiu kvality zrna, adekvátnemu prítomným mikromycétam. V predkladanej práci boli ako súčasť základného výskumu vykonané mykologické analýzy zrna obilnín, najmä pšenice, dopestovaného v rôznych lokalitách Slovenska. Cieľom tejto časti je priniesť prehľad o druhovom spektre aspergilov, aktuálne osídľujúcich zrno obilnín slovenského pôvodu.

Izoláty relevantných druhov boli *in vitro* testované na produkciu legislatívne sledovaných mykotoxínov, aflatoxínov a ochratoxínu A, a ďalších mykotoxínov a toxických metabolitov, s cieľom priniesť informácie o toxinogénnej potencii slovenských kmeňov aspergilov. Potencia produkovať metabolity s toxickými účinkami na živé bunky a organizmy nemusí byť nevyhnutne malígna; izoláty so silným potenciálom môžu byť využité na výrobu štandard pre skrining bezpečnosti a kvality potravín a surovín a početné metabolity aspergilov sú testované pri hľadaní látok, účinných proti rakovine a iným civilizačným chorobám.

V taxonómii aspergilov prišlo v priebehu posledných 10 rokov ku niekoľkým zmenám a početným deskripciam nových taxónov. Tieto aktualizácie boli reflektované v taxonomických štúdiách s cieľom zaznamenať nálezy druhov nových pre územie Slovenska. Druhovú diagnostikáciu a poznanie životného cyklu mikroskopických húb je základom pre ich ďalší výskum a využitie. Množstvo a variabilita zanalyzovaných vzoriek zrna obilnín poskytli cenný zdroj pre štúdium a izoláciu časti biodiverzity aspergilov na území Slovenska. Reprezentatívne izoláty identifikovaných druhov boli disponované v domácich a zahraničných zbierkach vláknitých mikroskopických húb pre ďalšiu možnú prácu s izolovaným materiálom.

1 Súčasný stav riešenej problematiky doma a v zahraničí

1.1 Vlákňité mikroskopické huby na obilninách

Presné druhové identifikácie ukázali, že každý typ potravinovej a krmivovej komodity má v určitom rozpätí environmentálnych faktorov asociovanú aktívne rastúcu špecifickú saprotrofnú mykocenózu, a to aj pri neextrémnych podmienkach (Frisvad et Filtenborg, 1988. Podľa: Frisvad, 1995).

1.1.1 Poľné a skladové huby

Vlákňité mikroskopické huby, ktoré tvoria súčasť prirodzenej mikrocenózy povrchu a vnútra obilných zŕn, môžu byť z hľadiska ekológie rozdelené na poľné a skladové huby (Jesenská, 1987, Filtenborg et al., 2002).

Do skupiny **poľných húb** zaraďujeme tie, ktoré sa rozvíjajú na povrchu alebo vo vnútri zrna pred jeho uskladnením (Christensen et Sauer, 1982). Sú hydrofilné (Jesenská, 1987), pre svoj rast vyžadujú vysokú relatívnu vlhkosť (20–25 %) (Malíř, Ostrý et al., 2003). Ak sa po žatve zabezpečí správne vysušenie zrna, nie je táto skupina húb schopná ďalej rásť. Len niektoré z nich prežívajú v zrne v dormantnom štádiu a znovu vyklíčia po zasiatí zrna do pôdy, respektíve keď nastanú vhodné podmienky. Stupeň osídlenia obilných zŕn poľnými hubami závisí najmä od klimatických podmienok v čase dozrievania zŕn a počas žatvy, od stupňa napadnutia hmyzom a podobne (Jesenská, 1987). V poľných podmienkach sa na zrnách pšenice bežne môžu vyskytovať druhy rodov *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* a *Claviceps*. Svojím rastom a produkciou mykotoxínov môžu znížiť kvalitu zrna (Filtenborg et al., 2002).

Skladové huby sa nazývajú podľa schopnosti rozvíjať sa aj v podmienkach skladov; sú viac xerofilné a xerotolerantné (Jesenská, 1987), schopné rásť na substrátoch pri nižšej relatívnej vlhkosti (10–18 %) (Malíř, Ostrý et al., 2003) a rozmnožujú sa aj pri vlhkosti 17–20 %. Rastú pri teplotách od 5 do 45 °C, ich teplotné optimum je v rozmedzí od 25 do 30 °C. Huby môžu byť do skladu prinesené na povrchu a vo vnútri obilia, alebo spolu s prachovými časticami, ktoré sa na zrno dostávajú počas žatvy a manipulácie so zrnom po žatve (Lacey, 1989). Flannigan (1978. Podľa: Kozakiewicz, 1989) izoloval aspergily z listov pšenice pred zberom kombajnom v Škótsku; hlavný podiel izolátov tvorili euróciá, menej *Aspergillus candidus* (*sensu lato*; pozn. autorky), *A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor* a *A. tamarii*. *A. candidus* a euróciá boli v štúdiu izolované aj z pôdy. Ďalším zdrojom kontaminácie zŕn skladovými hubami

sú rastlinné zvyšky vo vreciach, skladových priestoroch, silách a podobne (Jesenská, 1987). V podmienkach mierneho podnebného pásma patria medzi najrozšírenejšie skladové huby druhy rodov *Penicillium* a *Aspergillus* (Jesenská, 1987, Filtenborg et al., 1996, Filtenborg et al., 2002 a ďalší). Znehodnocovanie skladovaných obilnín hubami a produkcia mykotoxínov patria medzi najvýraznejšie známky nízkej kvality zrna (Frisvad, 1995). Citovaná štúdia je venovaná problematike mykotoxinogénnych húb a mykotoxínov v obilninových skladoch. Výsledky štúdia mikroskopických húb v slovenských obilninách priniesla Jesenská (1987). Novšie štúdie mykotického osídlenia obilnín slovenskej proveniencie so zameraním na potenciálne toxínogénne rody priniesli autori Tančinová et al. (2001), Piecková et Jesenská (2001), Labuda et Tančinová (2006), Tančinová et al. (2006), Tančinová et Labuda (2006) a ďalší.

1.1.2 Faktory ovplyvňujúce rozvoj mikroskopických húb a produkciu mykotoxínov na skladovaných substrátoch

Ekológii vláknitých mikroskopických húb na skladovaných obilninách je venovaných niekoľko štúdií. Odkazy na niektoré z nich sa nachádzajú v práci Frisvad (1995). Každá mikroskopická huba má iné požiadavky na podmienky prostredia, v ktorom rastie a tieto podmienky sa líšia aj medzi druhmi v rámci jedného rodu (Diekman et Green, 1992). Neexistujú žiadne špecifické podmienky, ktoré by mohli byť považované za bežné pre rast všetkých vláknitých mikroskopických húb a následnú tvorbu mykotoxínov, pretože existuje množstvo druhov s odlišnými biochemickými, ekologickými a morfológickými charakteristikami (CAST, 2003). Rast húb a produkcia mykotoxínov sú výsledkom interakcií medzi hubou, hostiteľom a prostredím. Vhodná kombinácia týchto faktorov podmieňuje rozsah kolonizácie substrátu, typ a množstvo produkovaného mykotoxínu. Syntéza akéhokoľvek mykotoxínu závisí nielen od druhu, ale aj od kmeňa vláknitej mikroskopickej huby (Pitt et al., 2000). Tvorba mykotoxínov je ovplyvnená rôznymi biologickými, fyzikálnymi a chemickými faktormi (D'Mello et al., 1997). Počas skladovania obilných zŕn je rast vláknitých mikroskopických húb a produkcia mykotoxínov výsledkom kombinácie viacerých faktorov: teplota, vlhkosť (podmienky sušenia a znovu nadobudnutá vlhkosť), plyny (kyslík a oxid uhličitý), veľkosť inokula, doba skladovania, prítomnosť iných mikroorganizmov, poškodenie rastlinného materiálu (hmyz, mechanické poškodenie a i.; Ominski et al., 1994, Abramson, 1998). Pre rast húb je dôležitá voda vo vnútri zrna, ako aj vodná para okolo zrna a prítomnosť oxidu uhličitého (FAO, 2001). Taktiež hmyz a článkonožce

môžu poškodiť zrna, zvýšiť vnútornú teplotu a vodnú aktivitu a umožniť prienik a rast húb (FAO, 2001, Miller, 2002).

1.1.3 Aspergily asociované so skladovaným zrnom obilnín v podmienkach mierneho pásma

Medzi skladové aspergily, schopné znehodnocovať obilniny a niekedy aj tvoriť mykotoxíny, patria druhy rodu *Eurotium*, *Aspergillus restrictus*, *A. penicillioides*, *A. candidus* a *A. flavus*. Menej dominantnými druhmi sú *A. versicolor*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* a *Emericella nidulans* (Christensen, 1991, Lacey et al., 1991, Frisvad et Samson, 1991a, b. Podľa: Frisvad, 1995). Obr. 1 zobrazuje príklad kontaminácie zrna aspergilom.



Obr. 1 SEM záber zárodku jačmenného zrna, atakovaného druhom *Eurotium repens* (Kozakiewicz, 1989)

Štúdie obilnín z Dánska, Nórska, Švédska, Británie a Kanady (Frisvad, nepublikovné. Podľa: Frisvad, 1995) ukazujú, že dominantnými hubami skladovaných obilnín v podmienkach mierneho podnebného pásma sú *Eurotium* spp., druhy zo sekcie *Restricti*, *Aspergillus flavus* a *A. candidus*. Druhy zo sekcie *Restricti* budú dominovať pri cereáliách, skladovaných dlhšiu dobu pri nízkej vodnej aktivite ($< 0,75$) a môžu vytvárať cestu pre rozvoj eurócií (*Eurotium repens*, *E. rubrum*, *E. herbariorum*, *E. amstelodami*, *E. chevalieri*), ktoré vyžadujú vodnú aktivitu v rozpätí 0,75–0,85. Pri vysokých teplotách, alebo v prípade zahriatia obilnín, budú dominovať *Aspergillus*

candidus, *A. flavus*, *A. fumigatus* a *Emericella nidulans* (Lacey et al., 1991. Podľa: Frisvad, 1995). V podmienkach modifikovaných atmosfér, zvlášť pri nízkom obsahu kyslíka, patria medzi najvýznamnejšie huby *Aspergillus terreus* a *A. candidus* (Ceynova, 1986, Clarke et Hill, 1981, Hocking, 1991b. Podľa: Frisvad, 1995).

1.2 Charakteristika aspergilov

Súhrnným názvom „aspergily“ sa označujú druhy anamorfného (nepohlavného, imperfektného) rodu *Aspergillus* a druhy s ním asociovaných teleomorfných (pohlavných, perfektných) rodov (Samson et al., 2002a).

1.2.1 Druhovú koncepciu

Biologická koncepcia druhu, populárna v evolučnej biológii, má pre aspergily limitovanú hodnotu, pretože môže byť aplikovaná len na heterotalické druhy (Samson et Varga, 2009). Tých je však známych len nízky počet: citovaní autori sumarizujú 7, O’Gorman et al. (2008) popísali 1 a Horn et al. (2009a, b) 2 druhy. Väčšina druhov aspergilov bola popísaná na základe morfolologickej (fenotypickej) koncepcie, založenej na podobnosti pozorovateľných morfologických (a zvyčajne aj fyziologických) vlastností; napr. veľkosti a tvaru spór, charakteristík kolónie. Je dôležité poznamenať, že väčšina druhov aspergilov, popísaných pred desaťročiami, ostáva platných aj po preskúmaní druhových delimitácií aplikáciou ďalších prístupov (Samson et Varga, 2009).

1.2.2 Nomenklatura

Nomenklatura aspergilov bola vždy dôležitá, pretože výskumní pracovníci v oblastiach aplikovanej mykológie neradi vidia nové mená alebo zmeny názvov, zvlášť tých najbežnejších. Pomenovávanie aspergilov sa riadi pravidlami Medzinárodného kódu botanickej nomenklatúry (ICBN, McNeill et al., 2006. Podľa: Samson et Varga, 2009). V taxonómii aspergilov sa uplatňuje duálna nomenklatura, existencia dvoch platných názvov pre jeden organizmus, zavedená do ICBN v roku 1910 pre huby s pleomorfným životným cyklom (Cline, 2005. Podľa: Samson et Varga, 2009). Aspergily so známou teleomorfou majú teda dve platné mená. V praxi je odporúčané používať jedno, príslušné štádiu, v ktorom sa huba nachádza a v nevyhnutných prípadoch obe. V špecifickej oblasti má určitý názov určitý význam. Napr. mnohí užívatelia taxonómie v priemysle sú zvyknutí na skutočnosť, že huba označená názvom teleomorfy znamená prítomnosť askospór. Ak by sa zrušila duálna nomenklatura

a zaviedlo by sa používanie len teleomorfného názvu, mohlo by dôjsť ku strate informácií (Samson et Varga, 2009). Odporúčania pre delimitáciu, deskripciu a identifikáciu aspergilov sumarizujú Samson et Varga (2009).

1.2.3 Taxonómia

Rod *Aspergillus* Fries ex Fries (Pitt et Hocking, 1999, Index Fungorum, 2010) bol prvý krát popísaný v roku 1729 talianskym kňazom a mykológom Pierom Antoniom Michelim v diele *Nova Plantarum Genera* (Klich, 2002, Samson et Varga, 2007). Vzhľadom na jeho význam (druhy využívané v priemysle, druhy významné zo zdravotného hľadiska) bolo tomuto rodu venovaných viacero prác, zaoberajúcich sa problematikou identifikácie a vymedzenia taxonomických skupín a jednotiek. Prehľad najvýznamnejších je uvedený v štúdií Geiser et al. (2007). *Aspergillus* je názov rodu vláknitej mikroskopickéj huby, rozmnožujúcej sa nepohlavnými spórmi-fialokonídiami, ktoré vznikajú na fruktifičných orgánoch charakteristickej štruktúry (Obr. 5; Klich, 2002). *Eurotium* Link ex Fries, *Emericella* Berkeley (Pitt et Hocking, 1999, Index Fungorum, 2010) a ďalšie (Tab. 1) sú asociované teleomorfné rody, rozmnožujúce sa pohlavnými spórmi- askospórmi. Nepohlavné štádium týchto druhov patrí do rodu *Aspergillus*. Rod v súčasnosti obsahuje približne 250 druhov a ako ďalej uvádzajú Geiser et al. (2007), toto číslo bude postupne narastať s objasňovaním druhových koncepcií a objavovaním nových druhov. V systéme organizmov sú imperfektný rod *Aspergillus* Fr.: Fr. a s ním asociované perfektné rody začlenené nasledovne (Kirk et al., 2001):

doména: *Eucarya*
ríša: *Fungi*
oddelenie: *Ascomycota*
trieda: *Ascomycetes*
rad: *Eurotiales*
čeľaď: *Trichocomaceae*.

Rod je vnútorne rozdelený na podrody a sekcie (Tab. 1). Klich (2002) a Samson et al. (2002a) čerpajú z Gams et al. (1985) a uvádzajú zhodné vnútorodové rozdelenie, výnimkou je uvedenie podrodu *Stilbothamnium*, zoskupujúceho druhy, tvoriace synematy (Klich). Ako ďalej uvádza Klich (2002), zoskupenie druhov do podrodov a sekcií reflektuje farbu konídií, veľkosť a tvar vezikula, prítomnosť sexuálneho štádia a podobne. Podľa Frisvad et al. (2004) je hodnota farby konídií ako hlavného

odlišujúceho kritéria limitovaná. Napríklad okrové alebo žlté konídie majú okrem druhov sekcie *Circumdati* aj niektoré druhy zo sekcií *Flavi*, *Candidi* a bývalej sekcie *Wentii*.

Tab. 1 Vnútorne členenie rodu *Aspergillus* (Peterson, 2008)

podrod	sekcia	asociované perfektné rody
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> <i>Restricti</i>	<i>Eurotium</i> , * <i>Dichlaena</i>
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i> <i>Clavati</i> <i>Cervini</i>	<i>Neosartorya</i> <i>Neocarpenteles</i> , <i>Dichotomomyces</i>
<i>Ornati</i>	<i>Ornati</i>	<i>Sclerocleista</i>
<i>Circumdati</i>	<i>Circumdati</i> <i>Candidi</i> <i>Cremeri</i> <i>Flavi</i> <i>Flavipedes</i> <i>Nigri</i> <i>Terrei</i>	<i>Neopetromyces</i> <i>Chaetosartorya</i> <i>Petromyces</i> <i>Fennellia</i> <i>Fennellia</i>
<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i> <i>Ochraceorosei</i> <i>Usti</i> <i>Sparsi</i>	<i>Emericella</i>
?	?	<i>Warcupiella</i>
?	?	<i>Hemicarpenteles</i>

*Samson et al., 2002a; ?- taxón v súčasnosti neexistuje

Peterson (2008; Tab. 1) na základe štúdia fylogenetických vzťahov potvrdzuje opodstatnenosť existencie väčšiny zoskupení vo vnútorrodovom členení a v porovnaní s vyššie uvedenými autormi uvádza nasledovné odlišnosti:

- ❖ zrušenie podrodu *Clavati* a premiestnenie rovnomennej sekcie do podrodu *Fumigati*,
- ❖ preradenie sekcie *Terrei* z podrodu *Nidulantes* do podrodu *Circumdati*,
- ❖ sekcia *Wentii* je prebytočná, *A. wentii* je zaradený v sekcii *Cremeri*,
- ❖ preradenie druhov *A. versicolor* a *A. sydowii* z nadbytočnej sekcie *Versicolores* do sekcie *Nidulantes*.

1.2.3.1 Vnútorodové taxóny, relevantné pre skladované obilniny

Podrod *Aspergillus*

Uniseriátne, xerofilné druhy, lepšie rastúce na CY20S (Czapkov agar s kvasničným extraktom a 20 % sacharózy) ako na CYA 25 (Czapkov agar s kvasničným extraktom, kultivácia pri teplote 25 °C). Farba konídií šedo zelená (Klich, 2002). **Sekcia *Aspergillus***- pre skladované obilniny je v sekcii relevantný pohlavný rod *Eurotium* Link: Fr. (pôvodný, už neplatný názov sekcie bol *Aspergillus glaucus* skupina). Pohlavné spóry vznikajú v plodniciach typu kleistotécium- globózne, subglobózne, bez špecializovanej otváracej morfoštruktúry (Samson et al., 2002a), so stenou tvorenou jednoduchou vrstvou polygonálnych pseudoparenchymatických buniek (Klich, 2002), môžu byť obklopené sieťou hýf. Jednobunkové elipsoidné hyalínne askospóry majú charakteristickú ornamentiku (Obr. 3; Samson et al., 2002a). Webster et Weber (2007) uvádzajú počet druhov, patriacich do rodu *Eurotium*, 24. Jednou z komplexných prác, prinášajúcich množstvo informácií zo štúdia eurócií, toho času označovaných ako *Aspergillus glaucus* skupina, je Manuál aspergilov z roku 1945 (Thom et Raper). Druhy sú popísané a klasifikované primárne podľa plodníc a askospór v piatich skupinách: *A. repens*, *A. ruber*, *A. chevalieri*, *A. amstelodami*, (*E.*) *herbariorum*. Blaser (1974/ 75) po revízii rodu uvádza spolu 19 druhov (5 popisuje ako nových), ktoré na základe fyziológie rozdeľuje do troch skupín- *Eurotium herbariorum*, *E. echinulatum* a *E. amstelodami*. Samson (1979) v Kompilácii aspergilov popísaných od roku 1965 pridáva ďalší druh- *E. xerophilum*. Pitt (1985) vypracoval čiastočnú revíziu rodu (okrem iného tiež vzhľadom na vtedajšie zmeny v Botanickom kóde nomenklatury) a uvádza popis 7 druhov. Blaserov výpočet redukuje o tri druhy ich zaradením medzi synonymá pre iné druhy, status troch ďalších druhov uvádza ako diskutabilný a rozporne uvádza *E. rubrum* ako samostatný druh. Kozakiewicz (1989) rozdeľuje euróciá podľa ornamentiky askospór, pozorovanej skenovacím elektrónovým mikroskopom do 4 skupín: s ihlicami resp. háčikmi (angl. aculeate), s výrastkami (angl. tuberculate), laločnato- sieťované (angl. lobate-reticulate) a s mikrovýrastkami (angl. microtuberculate). Spolu 9 z 25 popísaných taxónov je v rozpore s Pittom (1985), ktorý ich uvádza ako synonymá iných druhov. Ako uvádzajú Pitt et Hocking (1999), na pšenici, ako aj v širokej škále iných prostredí sú veľmi rozšírené štyri druhy: *E. repens*, *E. rubrum*, *E. amstelodami* a *E. chevalieri*. Druhy *E. herbariorum*, *E. cristatum* a *E. echinulatum* sú zaznamenávané menej často a ostatné druhy predstavujú kuriozity, známe z troch a menej izolátov (Pitt et Hocking, 1999). Jeden potenciálne nový druh,

označený ako *Eurotium halotolerans*, bol súčasťou štúdie Butinar et al (2005). Viacero nových druhov bolo popísaných v Číne: *E. taklimakanense* (Paride et al., 2001), *E. fimicola*, *E. aridicola* (Kong et Qi, 1995a), *E. tuberculatum* (Sun et Qi, 1994), *E. costiforme* a *E. parviverruculosum* (Kong et Qi, 1995b). Akceptácia väčšiny týchto druhov je neistá kvôli nedostatku komunikácie a dispozície biologického materiálu zo strany autorov (Frisvad, osobná komunikácia). Vzhľadom na priebeh projektu Biodiverzita rodov *Penicillium*, *Aspergillus* a príbuzných rodov (Samson et al., 2003-2010) možno v najbližších rokoch očakávať taxonomické zmeny aj v rode *Eurotium* Link: Fr. *Eurotium amstelodami*, *E. chevalieri*, *E. repens*, *E. rubrum* a *E. herbariorum* sú celosvetovo rozšírené huby, kolonizujúce potraviny, najmä skladované. Často sú zaznamenané na cereáliách vrátane pšenice a múky. Pri prvých štyroch uvedených druhoch bola zaznamenaná tvorba páchnucich metabolitov (Podľa: Pitt et Hocking, 1999). *E. repens* sa používa ako štartovacia kultúra pri výrobe rybacej omáčky z rybieho mäsa (Hayakawa et al., 1993. Podľa: Pitt et Hocking, 1999) a rovnako ako *E. rubrum* aj ako štartovacia kultúra pri výrobe katsuobushi z tuniaka (Damici et Wada, 1994. Podľa: Pitt et Hocking, 1999). **Sekcia *Restricti***- dosiaľ nie je známa žiadna teleomorfa. Charakteristický je pomalý rast na všetkých médiách (Klich, 2002). Pitt et Samson (1990) po revízii akceptovali v sekcii tri druhy. Druhy sa často vyskytujú na skladovaných obilninách, ale vďaka nízkej vitalite na bežne používaných izolačných médiách sú často prehliadané. Bývajú tiež nesprávne identifikované.

Podrod *Fumigati*

Zoskupuje uniseriátne druhy s najmä hruškovitými vezikulami. Farba konídií šedo zelená, modro zelená, oranžová (Klich, 2002). **Sekcia *Fumigati***- sekcia bola podrobená revízii na konci roku 2007 (Samson et al. 2007a) a autori k nej potvrdili príslušnosť 10 striktno anamorfných druhov, 23 teleomorfných a 4 ďalšie teleomorfné uviedli ako otázne. Ďalším významným príspevkom, zároveň prinášajúcim korekciu tohto výpočtu, bolo popísanie druhu *Neosartorya fumigata* (O'Gorman et al., 2008), teleomorfy klinicky významného (De Hoog et al., 2000) druhu *A. fumigatus*. *A. fumigatus* bol popísaný v roku 1863 Freseniom a bol považovaný za striktno anamorfný (Samson et al., 2007a). **Sekcia *Clavati***- uniseriátne druhy s najmä kyjakovitými vezikulami. Farba konídií šedo zelená (Klich, 2002). Sekciu *Clavati* z pôvodného rovnomenného podrodu do podrodu *Fumigati* preradil Peterson (2008). Taxonomickú revíziu sekcie priniesli Varga et al. (2007a); do sekcie patrí

5 anamorfných a 1 teleomorfný druh. Všetky druhy sú acido- a alkali- tolerantné a tvoria kyjakovité konidiálne hlavice.

Podrod *Circumdati*

Druhy uniseriátne alebo biseriátne, so sférickými až hruškovitými vezikulami (Klich, 2002). **Sekcia *Circumdati***- sekcia zoskupuje najmä biseriátne druhy (Klich, 2002), ktoré (s výnimkou *A. robustus*) tvoria žlté až okrové konídie, skleróciá inej ako čiernej farby a produkujú najmenej jeden z týchto extrolitov: ochratoxíny, kyselinu penicilovú, xantomegníny, meleíny (Frisvad et al., 2004a). Frisvad et al. (2004a) popri popise siedmich nových druhov priniesli predbežnú revíziu sekcie s výsledným počtom 19 anamorfných a jeden teleomorfný druh. Niektoré druhy sú využívané v priemysle, najmä na biotransformácie (Podľa: Frisvad et al., 2004a). **Sekcia *Candidi***- farba konidií biela alebo takmer biela (Klich, 2002). Varga et al. (2007b) po taxonomickej revízii zaraďujú do sekcie *Candidi* k pôvodne solitárnemu druhu *Aspergillus candidus* ďalšie tri: *A. campestris*, *A. taichungensis* a *A. tritici*. Morfologické charakteristiky, vlastné sekcii *Candidi* sú: pomaly rastúce kolónie s globóznymi, po celom povrchu biseriátne porastenými konidiálnymi hlavicami, produkujúcimi biele až žltkasté konídie. Stopky konidioforov sú hladké. Okrem dobre vyvinutých konidioforov sa často tvoria atypické; malé, redukované, pripomínajúce penicílium, niektoré naopak s veľkými metulami. Konídie hladké alebo takmer hladké, subglobózne až vajcovité. Okrem druhu *A. campestris* býva pozorovaná tvorba tmavo sfarbených sklerócií (Varga et al., 2007b). **Sekcia *Cremeri***- farba konidií hnedá, žltá alebo modro zelená (Klich, 2002). Peterson (2008) z nadbytočnej sekcie *Wentii* preradil do tejto sekcie druh *Aspergillus wentii* Wehmer. **Sekcia *Flavi***- farba konidií žltá až olivovo hnedá (Klich, 2002). Druhy rastú rýchlo pri teplote 37 °C (Pildain et al., 2008). Do tejto sekcie patrí väčšina známych potenciálnych producentov aflatoxínov (Frisvad et al., 2006b, Pildain et al., 2008, Horn et al., 2009a, b) a kyseliny kojovej (Frisvad et al., 2010, Kubátová, 2006, Pildain et al., 2008). **Sekcia *Nigri***- stopky konidioforov hladkostenné, farba konidií čierna alebo blížiac sa čiernej (Klich, 2002). Samson et al. (2007b) uvádzajú celkovo 19 akceptovaných anamorfných taxónov (4 uniseriátne, 15 biseriátnych). Čierne aspergily sú významné v potravinárskej a medicínskej mykológii a biotechnológii (Varga et al., 2000. Zdroj: Samson et al., 2007b). Sú však náročné na klasifikáciu a identifikáciu. Prehľad fenotypových a molekulárnych identifikačných metód a odporúčania ich použitia priniesli Samson et al. (2007b). **Sekcia *Terrei***- hyalínne stopky konidioforov, žltohnedé až oranžovohnedé

konídie (Klich, 2002). Balajee et al. (2009) priniesli fylogenetickú štúdiu 94 izolátov sekcie *Terrei*. Od *A. terreus* odčlenili a popísali nový kryptický druh *A. alabamensis*. V sekcii tiež uvádzajú dve variety druhu *A. terreus*: *var. africanus* a *var. aureus*, ktorá by podľa autorov mala byť prehodnotená ako samostatný nový druh.

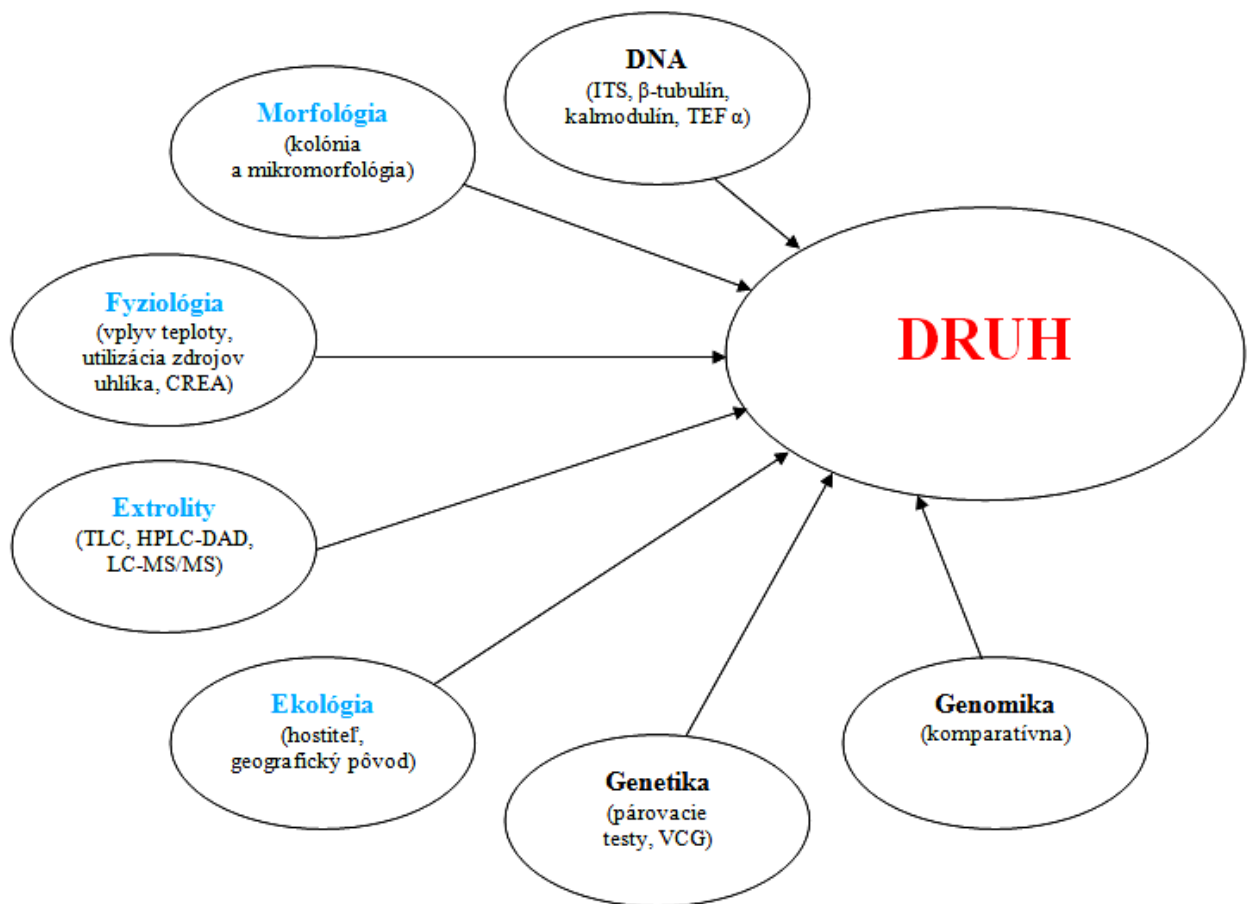
Podrod *Nidulantes*

Podrod zoskupuje biseriálne druhy (Klich, 2002). **Sekcia *Nidulantes***- stopky konidioforov krátke, často hnedé, farba konídií zelená, často sú prítomné globózne Hülle bunky. Väčšina druhov má sexuálne štádium, patriace do rodu *Emericella* Berk.: kleistoteciá tenkostenné, obklopené Hülle bunkami, askospóry červené až purpurové (Klich, 2002). Druhy rodu *Emericella* zrejme uprednostňujú suché substráty a teplú klímu (Samson et Mouchacca, 1974. Podľa: Zalar et al., 2008). Sú zrejme dobre adaptované na teplé prostredia s nízkou vodnou aktivitou, sú termotolerantné, ale zriedka termofilné (Zalar et al., 2008). **Sekcia *Usti***- hnedé stopky konidioforov, konídie červenkasté, hnedé alebo olivové (Klich, 2002). Do sekcie patrí 7 anamorfných a 1 teleomorfný druh. Všetky s výnimkou *A. pseudodeflectus* tvoria viac alebo menej často nepravidelné, predĺžené Hülle bunky (Houbraken et al., 2007).

1.2.3.2 Polyfázická koncepcia druhu

Druhovú diagnostikáciu a poznanie životného cyklu mikroskopických húb je základom pre ich ďalší výskum a využitie (Fassatiová, 1979). Aj morfológicky podobné a blízko príbuzné druhy sa môžu odlišovať v spektre produkovaných toxických metabolitov (Samson et al., 2006, Houbraken et al., 2007, Samson et al., 2007a, Varga et al., 2007a, Nielsen et al., 2009 a ďalší). Napr. konštantné producenty veľkých množstiev ochratoxínu, *Aspergillus westerdijkiae*, *A. ochraceus* a *A. steynii*, produkujú aj ďalšie, druhovo špecifické extrolity. Tieto môžu mať synergický účinok, ako je to napr. v prípade ochratoxínu A a kyseliny penicilovej (Frisvad et al., 2004a). Presná druhová identifikácia mikroskopických húb, osídľujúcich potraviny je preto dôležitá. Tradičná taxonómia aspergilov, založená na fenotypových charakteristikách, poskytuje väčšinou uspokojivé vymedzenie taxónov. V niektorých sekciiach sa však vyskytuje veľká morfológická variabilita (Samson et al., 2006). Približne pred 35 rokmi bola v taxonómii mikroorganizmov zavedená polyfázická koncepcia, ktorej cieľom je integrácia rôznych súborov údajov a informácií: fenotypových, genotypových a fylogenetických. Polyfázická koncepcia je „zlatým štandardom“ pre druhové vymedzenie. Využíva kombináciu multilokusových sekvenčných dát, morfológické,

fyziologické charakteristiky a ekologické údaje (Samson et Varga, 2009), pričom v princípe žiadna z použitých metód by nemala byť zdôrazňovaná nadmerne (Samson et al., 2006). V najnovších štúdiách boli druhy aspergilov definované na základe tejto koncepcie. Pre klasifikáciu a identifikáciu aspergilov sú aplikovateľné nezávislé prístupy: morfológia kombinovaná s fyziológiou (vrátane nutričných charakteristík), profilácia sekundárnych metabolitov a DNA sekvenácia. Tieto tri spôsoby druhovej identifikácie aspergilov často vedú k zhodnej diagnostikácii. Pre charakterizáciu aspergilov sa odporúča kombinovať aspoň dva z uvedených spôsobov v polyfázickej koncepcii (Samson et Varga, 2009). Prvky polyfázickej koncepcie sú na Obr. 2.

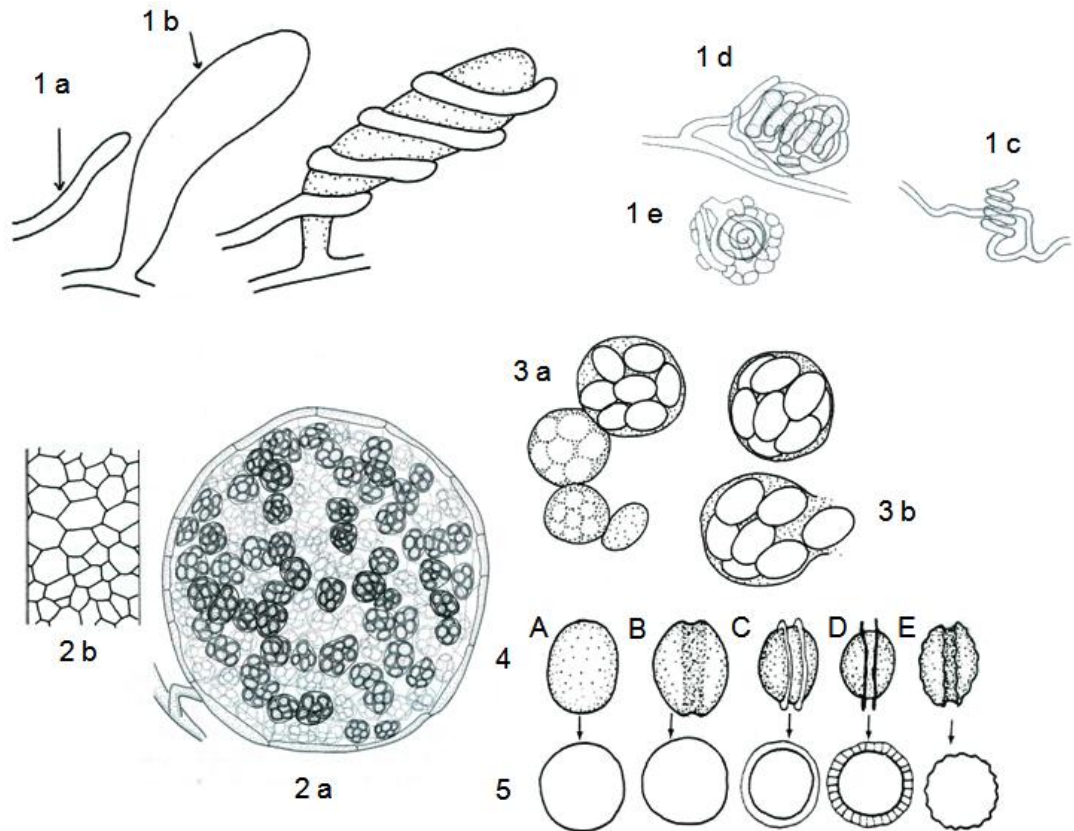


Obr. 2 Polyfázická koncepcia druhu; upravené podľa Samson et Varga (2009)

ITS- interný transkribovaný medzerník (angl. Internal Transcribed Spacer); TEF- aktivačný faktor transkripcie (angl. transcriptional enhancer factor); CREA- agar s kreatínom a sacharózou; TLC- tenkovrstvová chromatografia; HPLC-DAD- vysokotlaková kvapalinová chromatografia s detekciou sústavou diód; LC-MS/MS- kvapalinová chromatografia s tandemovou spektrometriou más; VCG- vegetatívne kompatibilné skupiny (angl. vegetative compatibility groups)

1.2.4 Reprodukcia

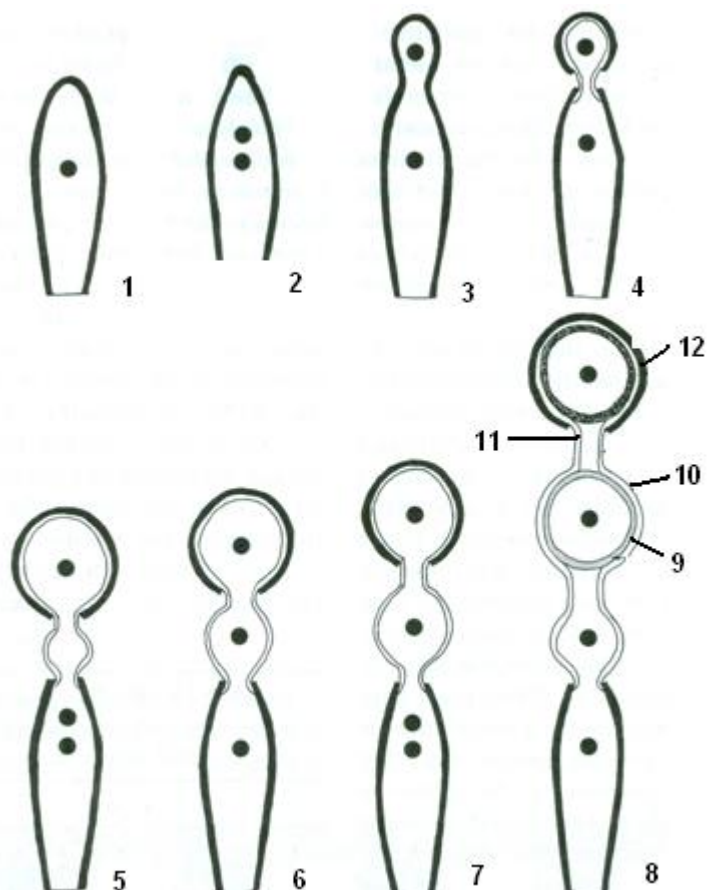
Konidiálne štádium je v rode *Aspergillus* častejšie ako teleomorfa. Mnohé druhy stratili schopnosť sexuálnej reprodukcie (Geiser et al., 1996. Podľa: Webster et Weber, 2007). Fenomén straty sexuálnej reprodukcie sa vyskytuje nezávisle v niekoľkých prípadoch v rámci radu *Eurotiales* (Webster et Weber, 2007). Geiser (2009) uvádza, že teleomorfu vytvára približne tretina aspergilov a tieto sú až na pár výnimiek homothalické. Je možné, že pri niektorých druhoch je sexuálna reprodukcia zatiaľ nepoznaná v dôsledku ich heterothalickosti- napr. teleomorfy potenciálne aflatoxinogénnych druhov *Aspergillus flavus* a *A. parasticus* boli popísané až v roku 2009 (Horn et al., 2009a, Horn et al., 2009b). Horn et al. (2009b) uvádzajú, že sexuálna reprodukcia sa v ďalšom výskume v sekcii *Flavi* môže ukázať skôr ako pravidlo, než ako výnimka. Ďalej, teleomorfy niektorých druhov môžu typicky osídľovať substráty, ktoré bežne nie sú predmetom mykologických rozborov (Frisvad, osobná komunikácia). Známe teleomorfy, asociované s rodom *Aspergillus*, sú v Tab. 1. Ich počet odzrkadľuje úžasný stupeň fylogenetickú a biologickú diverzitu (Geiser, 2009). Bunky, ktoré pri **pohlavnom rozmnožovaní** fúziou vytvárajú dikaryotické štádium, sa nazývajú gametangiá. Sú to hýfy, ktoré nie sú, s výnimkou rodu *Fennellia*, diferencované na jednoznačné samčie a samičie elementy (Wiley et Simmons, 1973. Podľa: Geiser, 2009). Samčie gametangium sa nazýva anterídium, samičie askogónium (Samson et al., 2002a). Páriace sa gametangiá majú tendenciu vytvárať zvitky alebo príľnavo zamotané hýfové štruktúry (Benjamin, 1955. Podľa: Geiser, 2009). Karyogamiou jadier gametangií vznikajú prototunikátne vrecká s väčšinou 8 askospórami (Geiser, 2009). Vrecká sú uzatvorené v dutine kleistotécia- globóznej, subglobóznej plodnice bez otvoru (Samson et al., 2002a). Stena plodnice aspergilov je tvorená mnohouholníkovými bunkami (*textura angularis*). Po dozretí lyzuje, plodnica praská a vrecká sú uvoľnené do prostredia. Prototunikátna stena vreciek pri dozretí askospór mizne a askospóry sú uvoľnené do prostredia (Obr. 3; De Hoog et al., 2000). **Asexuálna reprodukcia** je konidiálna, fialidická. Vo fialide sa polarizovaný rastový patern myceliálnej hýfy konidioforu a fialidy mení za kvasinkovitý (izodiametrický) rast tvoriacich sa konídií (Webster et Weber, 2007). Z fixného konidiogénneho miesta sa v bazipetálnej sukcesii tvoria enterblastické konídie, každá s novovznikajúcou stenou, do ktorej konidiogénna bunka neprispieva.



Obr. 3 Orgány aspergilov, charakteristické pre pohlavné rozmnožovanie (De Hoog et al., 2000, Samson et al., 2002a, Webster et Weber, 2007)

1a- anterídium; 1b- askogónium; 1c- počiatok tvorby plodnice (d- laterálny pohľad; e- čelný pohľad); 2a- vyvinuté kleistotécium; 2b- *textura angularis* kleistoteciálnej steny; 3a- ontogenéza vrečka; 3b- lýza jednoduchej steny vrečka a uvoľnenie zmaturovaných askospór; 4- laterálny pohľad; 5- čelný pohľad; A- šošovicovitá askospóra s hladkou ornamentikou bez hrebeňov a pozdĺžnej brázdy; B- šošovicovitá askospóra so stopou brázdy v ekvatoriálnej rovine; C, D- šošovicovitá askospóra s dvomi pozdĺžnymi hrebeňmi v ekvatoriálnej rovine; E- šošovicovitá askospóra s drsnou ornamentikou a výraznou brázdou v ekvatoriálnej rovine

Dĺžka fialidy ostáva počas tvorby konídií nezmenená (Kendrick, 1971. Podľa: Webster et Weber, 2007). Nárast prvej konídie vedie k porušeniu bunkovej steny fialidy blízko jej vrcholu a zvyšky prelomenej steny fialidy ostávajú ako čiapka okolo prvovytvorenej konídie. Pred rozrušením bunkovej steny fialidy sa zakladá vrstva materiálu bunkovej steny. Táto vrstva sa stáva vonkajšou vrstvou bunkovej steny konídie, vnútorná stena sa vyvíja neskôr. Delenie jadra vo fialide pokračuje. Okolo dcérskeho jadra sa ukladá cytoplazma a bunková stena, čím sa vytvára druhá konídia, ktorá je vytlačená cez odlomený vrchol fialidy.



Obr. 4 Ontogenéza fialokonidií *Aspergillus niger* (Subramanian, 1971. Podľa: Webster et Weber, 2007)

1- mladá fialida; 2- mitóza vo fialide; 3- počiatok prvej konídie s dcérskym jadrom; 4- prelomenie steny fialidy a formácia novej vrstvy steny, ohraničujúcej konidiálnu cytoplazmu; 5, 6- mitóza vo fialide a extrúzia druhej konídie; 7, 8- ďalšia mitóza vo fialide a formácia tretej konídie; 9- vnútorná stena konídie; 10- vonkajšia stena konídie; 11- *isthmus*; 12- odlomená stena fialidy

Druhá a každá následná konidia sa od prvej odlišujú tým, že nie sú obklopené zvyškami rozrušenej bunkovej steny fialidy. Cytoplazma druhej konídie je v počiatku spojená s cytoplazmou prvej cez cylindrickú zúženinu- *isthmus*. Toto cytoplazmatické prepojenie konidií je prerušené vytvorením vnútornej vrstvy steny. Pretrvávanie prázdneho *isthmus* sa označuje ako konektíva (Obr. 4; Webster et Weber, 2007). Každá fialida môže vytvoriť 100 alebo viac spór, takže suma konidií z jedného konidioforu môže byť viac ako 10 000 (Adams et al., 1998. Podľa: Webster et Weber, 2007).

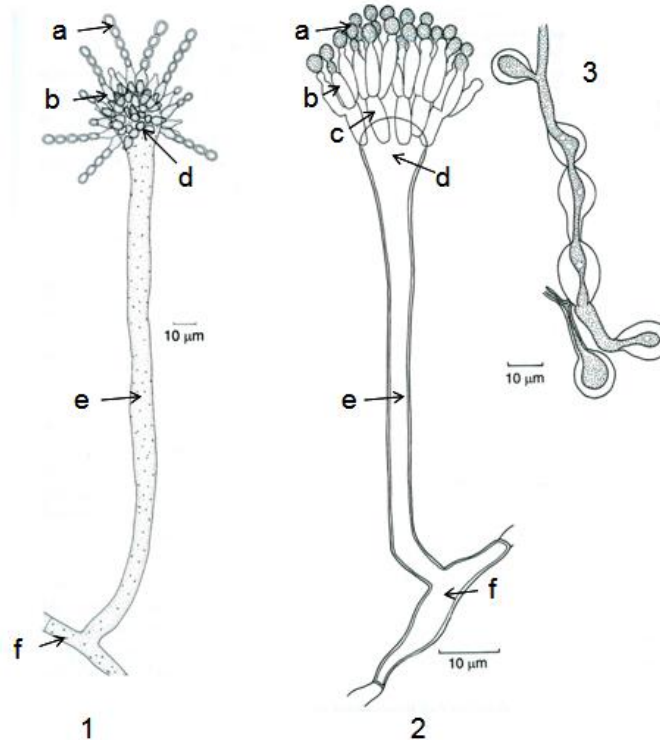
1.2.5 Morfológia

Rod *Aspergillus* zahŕňa predovšetkým rýchlo rastúce vlákňité mikroskopické huby, ktoré do piatich, často už troch dní kultivácie vytvárajú farebné kolónie (Votava et al., 2003). Kolónie majú väčšinou konzistenciu hustého porastu vzpriamených konidioforov (Samson et al., 2002a) a v dôsledku bohatej konidiogenézy rýchlo nadobúdajú pigmentáciu. Pigmentácia zrelých konídií je prinajmenšom čiastočne spôsobená melanínom (Webster et Weber, 2007).

Makromorfologické charakteristiky: farba konídií- u aspergilov nájdeme konídie takmer všetkých farieb. Tento znak je hlavným pre klasifikáciu druhov do podrodov. Farba mycélia- zvyčajne biela; niektoré druhy vytvárajú odlišne sfarbené mycélium. Exsudát- kvapky tekutiny, vznikajúce na povrchu mycélia; môžu byť farebné alebo bezfarebné. Reverz- spodná strana kolónie; má rôznu farbu, často závislú od kultivačného média. Rozpustný pigment- pigment difundujúci do živného média za okraj kolónie (Klich, 2002); má rôzne odtiene žltej, žltozelenej, zelenomodrej, hnedej až čiernosivej farby (Votava et al., 2003). Skleróciá- pevné masy hýf viac-menej guľovitého alebo elipsovitého tvaru s obsahom spór (Klich, 2002). Môžu indikovať prítomnosť pohlavného rozmnožovania (Dangeard, 1907. Podľa: Thom et Raper, 1945, Frisvad, osobná komunikácia). Geiser (2009) uvádza, že skleróciá druhov, ako sú *Aspergillus flavus* a *A. niger*, by mali byť považované za kleistoteciálne primordiá. Kleistoteciá- pohlavné štádiá vytvárajú plodnice typu kleistotécium bez prirodzeného otvoru s obsahom vreciek a askospór (Klich, 2002).

Mikromorfologické charakteristiky: nepohlavné rozmnožovacie orgány (Obr. 5) rodu *Aspergillus* svojím tvarom pripomínajú kropeničku, podľa čoho bol tento rod pomenovaný svojím objaviteľom (lat. *aspergillum*- kropenička na svätenú vodu; Klich, 2002, Kubátová, 2006 a ďalší). Stopka s konidiogénnou hlavicou vyrastá priamo zo substrátového mycélia alebo zo vzdušných hýf. Zvyčajne je neseptovaná a nevetvená (Samson et al., 2002a). Môže byť pomerne krátka (50 μm a menej), alebo aj niekoľko milimetrov dlhá (Klich, 2002). Je hyalínna, žltá alebo hnedo sfarbená, s rôzne ornamentovanou stenou (Malíř, Ostrý et al., 2003). V spodnej časti, v mieste spojenia s vegetatívnou hýfou, má zvyčajne tvar písmena T alebo L. Táto časť sa všeobecne označuje ako nožná bunka napriek tomu, že nie je samostatnou bunkou (Klich, 2002). Apikálna časť stopky sa mechúrovito rozširuje do vezikula. Vezikulum môže mať rôznu, charakteristickú veľkosť a tvar (napr. guľovitý, lopatovitý, kyjakovitý; Klich, 2002). Vezikulum, fialidy, metuly (ak sú prítomné) a konídie spolu tvoria konidiálnu

hlavicu (Samson et al., 2002a). Ak fialidy vyrastajú priamo z vezikula, označujeme takéto hlavice ako uniseriátne. Ak sa medzi stenou vezikula a fialidami nachádza ešte jedna vrstva buniek (nazývajú sa metuly), označujeme hlavice ako biseriátne. Dôležitým charakteristickým znakom, ktorý odlišuje rod *Aspergillus* od niekoľkých bližšie príbuzných rodov je, že fialidy alebo metuly vyrastajú na vezikule simultánne (Klich, 2002). Fialidy majú fľaškovitý tvar. Na vrchole sú zúžené do krčku, cez ktorý bazipetálne pučia konídie.



**Obr. 5 Orgány aspergilov, charakteristické pre nepohlavné rozmnožovanie
(Webster et Weber, 2007)**

1- uniseriálny konidiofor *Eurotium repens* s lúčovitou konidiálnou hlavicou;
2-biseriálny konidiofor *Emericella nidulans* so stĺpcovitou konidiálnou hlavicou;
3- subglobózne Hülle bunky v reťazci; a- konídie; b- fialida; c- metula; d- vezikulum;
e- stopka konidioforu (1- s drsnou ornamentikou, 2- s hladkou ornamentikou); f- nožná bunka

Konídie môžu byť guľovité, elipsoidné, hruškovité, alebo oválne a majú hladký, zdrsnený alebo ostnité povrch. Veľmi často sú medzi sebou spojené plazmatickými mostíkmi (konektívami- pozn. autorky; Malíř, Ostrý et al., 2003). Konídie v suchých reťazcoch tvoria stĺpcovité, kompaktné alebo lúčovité, rozptýlené konidiálne hlavice (Samson et al., 2002a). Pri niektorých druhoch sa v mycéliu terminálne alebo

interkalárne vytvárajú Hülle bunky (obalové bunky; nem. die Hülle- obal). Ako prvý ich popísal Eidam (1883. Podľa: Thom et Raper, 1945) podľa ktorého sú označované tiež Eidamove bunky (Malíř, Ostrý et al., 2003). Sú špecializované štruktúry, tvoriace sa v niektorých skupinách aspergilov. Ich pôvod je otázný, podobne ako aj ich funkcia. Keďže pre jednotlivé taxonomické skupiny sú jasne odlišiteľné, majú diagnostickú hodnotu. Thom et Raper (1945) ďalej uvádzajú, že pri niektorých skupinách sú to abortované konidiofory s pôvodnou až úplne zakrpatenou stopkou. Na základe štúdií je jednoznačné, že sú prítomné okolo plodníc *Aspergillus nidulans* a môžu indikovať prinajmenej zakrpatený prekursor formácie plodníc, kdekoľvek sa objavia (Thom et Raper, 1945). Geiser et al. (1996. Podľa: Geiser, 2009) označujú Hülle bunky za relikty sexuálneho rozmnožovania. Hülle bunky sú hrubostenné, majú guľovitý, oválny, pretiahnutý, alebo laločnatý tvar (Malíř, Ostrý et al., 2003) a výrazne odrážajú svetlo (Klich, 2002). **Pohlavné rozmnožovacie orgány** (Obr. 3): plodnica- tvorí ju guľovité kleistotécium. Vrecká v plodniciach obsahujú väčšinou osem askospór vajcovitého, oválneho, alebo guľovitého tvaru (Malíř, Ostrý et al., 2003). Dôležitým mikromorfologickým znakom je tvar a textúra buniek, tvoriacich stenu plodnice (Klich, 2002). Askospóry môžu mať rôznu farbu, veľkosť a ornamentáciu. Na ich povrchu, respektíve okolo nich môžeme rozlíšiť útvary označované ako krídla, hrebene, brázdy a jazvy, ktoré sú dôležitými znakmi pri rozlišovaní jednotlivých druhov (Klich, 2002).

1.2.6 Výskyt

Aspergily patria medzi najpočetnejšie a najrozšírenejšie organizmy na zemi. Aby sa prispôbili rôznym miestam, ktoré osídľujú, vyvinuli si nespočetne veľa metabolitov (Klich, 2002). Patria medzi časté kontaminanty (Samson et al., 2002a). Prakticky všetky bežné aspergily boli izolované aj z poľnohospodárskych produktov (Domsch et al., 1980, Pitt et Hocking, 1999, Samson et al., 2002a). Spolu s rodom *Penicillium* majú veľké zastúpenie na organických zvyškoch na celom svete. Pri skladovaní substrátov s nízkou vlhkosťou, ako sú napr. obilniny a krmivá zvierat, sú druhy týchto rodov zvyčajne dominantné (Smith et Ross, 1991).

1.2.7 Antropocentrický význam

Rod *Aspergillus* je veľmi dôležitý z pohľadov patogenity, mykotoxínov, základov genetiky eukaryotických organizmov a biotechnologického výskumu (Samson et al., 2006). Spolu s rodom *Penicillium* patria medzi najvýznamnejšie rody v biotechnológiách. Významnejším organizmom je len *Saccharomyces cerevisiae*.

Aplikácie sú rôznorodé: produkcia enzýmov, primárnych a sekundárnych metabolitov, priama kolonizácia a modifikácia potravín (Webster et Weber, 2007). Na konverziu nelákavých a nestráviteľných ingrediencií na chutné a výživné potraviny sa používajú najmä v orientálnych krajinách (Subramanian, 1983. Podľa: Kozakiewicz, 1989). Z metabolitov, produkovaných zástupcami rodu *Aspergillus*, bolo odvodených množstvo antibiotík, antitumorových a antifungálnych látok (Klich, 2002). Významným pozitívnym ekonomickým prínosom rodu je využívanie enzýmov a kyselín, produkovaných mnohými druhmi. Dva z najdôležitejších priemyselných produktov sú amyláza a kyselina citrónová (Klich, 2002). Jong et Burmingham (1992) zosumarizovali 147 amerických patentov, využívajúcich metabolity aspergilov, schválených v období rokov 1971–1991. Mnohé ďalšie patenty boli registrované pred a po tomto období (Podľa: Klich, 2002). Pozitívny ekonomický prínos je však viac ako vyvážený negatívnymi stránkami. Aspergily sú príčinou znehodnocovania poľnohospodárskych produktov pred aj po zbere (Klich, 2002). Sú zodpovedné za rôzne sekundárne hniloby (rozkladanie) rastlín a potravín s následnou možnou akumuláciou mykotoxínov. Na poľnohospodárskych produktoch sú často nachádzané aflatoxín produkujúce druhy ako *A. flavus* a *A. parasiticus* a ochratoxinogénne druhy *A. niger*, *A. ochraceus* a *A. carbonarius* (Perrone et al., 2007). Výskyt toxických metabolitov aspergilov v potravinách a krmivách podlieha v mnohých krajinách prísnej kontrole (Geiser et al., 2007). Niektoré druhy sú ľudskými a živočíšnymi patogénmi (Klich, 2002), spôsobujú aspergilózy (Geiser et al., 2007) a mnohé druhy sú alergénne (Klich, 2002). Aspergilóza je konglomerát klinických obrazov, najmä u imunokompromitovaných pacientov, spôsobených alergickou reakciou, kolonizáciou alebo infiltráciou tkanív rôznymi druhmi aspergilov. Má tieto formy: aspergilóm, cerebrálny aspergilóm, invazívna; toxická; astmatická; infiltratívna alveolárna a alergická bronchopulmonárna aspergilóza. Niektoré aspergily, najmä *A. flavus* a *A. fumigatus*, sú častými pôvodcami pľúcnych aspergilóz: alergických, invazívnych alebo kombinácie oboch. Často tiež spôsobujú sínusitídy. Mnohé druhy sú termotolerantné a ich jednobunkové suché hydrofóbne konídie sú ľahko vdýchnuteľné (De Hoog et al., 2000). Cerebrálne infekcie sú často spôsobované druhmi inými ako *A. flavus* a *A. fumigatus* (Pagano et al., 1996. Podľa: De Hoog et al., 2000). Niektoré osmotolerantné druhy, ako *A. niger* (komplex; pozn. autorky) a *A. terreus*, sú pomerne často izolované ako sekundárna infekcia v prípadoch vonkajšej bakteriálnej otitídy. Mikromycéty s klinickým významom sú podľa príslušného zdravotného rizika zaradené

do štyroch kategórií: GRAS (Generally Regarded As Safe- vo všeobecnosti považované za bezpečné) a BSL (BioSafety Levels- stupne biologickej bezpečnosti) 1–3. Aspergily nachádzame v skupinách GRAS, BSL-1 a BSL-2 (De Hoog et al., 2000).

1.2.8 Extrolity

Prakticky všetky druhy aspergilov produkujú unikátnu kombináciu rôznych typov malých organických zlúčenín, ako sú polyketidy, neribozomálne peptidy, terpenoidy, ako i množstvo ďalších zlúčenín zmiešaného biosyntetického pôvodu. Niektoré z týchto zlúčenín sú dokonca unikátne pre jediný druh. Skutočnosť, že sekundárne metabolity sú dobrými fenotypovými charakteristikami na odlišenie druhov, je podporená najnovšími štúdiami kompletných sekvenácií genómov dôležitých aspergilov, ukazujúcich, že hlavné odlišnosti v genóme medzi druhmi sú často spojené s množstvom a podobnosťou génov pre syntézu polyketidov a neribozomálnych peptidov (Galagan et al., 2005, Nierman et al., 2005, Pel et al., 2005. Podľa: Samson et Varga, 2009). Pri vláknitých mikroskopických hubách vrátane aspergilov, sa gény, zodpovedné za biosyntézu sekundárnych metabolitov, export a reguláciu transkripcie, často nachádzajú v koregulovaných komplexoch. Lokalizácia väčšiny z týchto komplexov bola zistená v subtelomérických oblastiach, ktoré sú často spojené s frekventovanými zmenami v usporiadaní genómu a s deléciami (Galagan et al., 2005, Nierman et al., 2005. Podľa: Samson et Varga, 2009). Detailnejšie porovnania ukázali, že väčšina dráh je nových a unikátnych pre každý organizmus (Nierman et Fedorova, 2008. Podľa: Samson et Varga, 2009). Zdá sa, že tvorba nových dráh vytvára *de novo* zoskupenie, duplikáciu segmentov a vzrastajúcu rozdielnosť. Obohacovanie génov sekundárnych metabolitov v subtelomérických oblastiach aspergilov môže umožňovať rapidnú reorganizáciu a evolúciu týchto génov v druhovo špecifickej forme (Carbone et al., 2007. Podľa: Samson et Varga, 2009).

Frisvad et Nielsen (2009) uvádzajú ako **extrolity**:

- ❖ aristolity (sekundárne metabolity vrátane toxických a mykotoxínov),
- ❖ extracelulárne enzýmy,
- ❖ hydrofobíny.

Aristolity zahŕňajú sekundárne metabolity vrátane toxických a mykotoxínov (Kap. 1.2.8.1). Ďalšie aristolity sú často rozpoznateľné ako difundujúce pigmenty, farby reverzu kolónie a farby exsudátu. Zohrávajú významnú úlohu v taxonómii húb. Farby, najmä farby konídií, sú často považované za súčasť morfológie. Tieto farby môžu byť

rozdelené na melanínové a proteín- melanínové komplexy, ktoré dodávajú konídiám fyzickú silu, odolnosť, ochranu proti žiareniu a iné farbivá (a prchavé látky), ktoré často účinkujú ako ekologické signály (Wicklów, 1986. Podľa: Frisvad et Samson, 2004). **Extracelulárne enzýmy** môžu zohrávať dôležitú úlohu v špecifických asociáciách jednotlivých druhov s habitatom (Filtenborg et al., 1996. Podľa: Frisvad et Samson, 2004). **Hydrofobíny** sú povrchovo aktívne proteíny, produkované vláknitými hubami. Pre huby predstavujú štruktúrne komponenty a zároveň účinkujú v ich interakciách s prostredím. Sú dôležité napr. pri vzdušnom raste a pri prichytávaní mycélia k pevným oporám. Spôsobujú hydrofóbny charakter štruktúr húb, napr. spór (Linder et al., 2005). Monoméry hydrofobínov môžu byť toxické a dráždivé (Wösten, 2001). Keďže hydrofobíny patria k molekulám s najvýraznejšou povrchovou aktivitou a vytvárajú amfipatický film na akomkoľvek hydrofilno- hydrofóbnom rozhraní, dajú sa využiť na premenu hydrofilných povrchov na hydrofóbne a *vice versa*. Štruktúrou sú to malé proteíny, tvorené približne stovkou aminokyselín (Wösten et De Vocht, 2000).

1.2.8.1 Mykotoxíny a ďalšie toxické metabolity, produkované aspergilmami

Frisvad et al. (2006b) definujú mykotoxíny ako sekundárne metabolity askomycét vrátane húb s neznámym pohlavným štádiom, o ktorých je známe, že spôsobili, alebo je im pripisovaný potenciál spôsobiť ochorenia u ľudí alebo stavovcov. Labuda (2010) dopĺňa, že patologické zmeny sú spôsobené už malými dávkami, ktoré sa do tela dostávajú prirodzenou cestou (potravou, inhaláciou, resorbciou cez kožu). Niektoré mykotoxíny sú toxické akútne, niektoré chronicky, niektoré aj-aj. Je možné, že mix mykotoxínov pôsobí synergicky alebo aditívne (Frisvad et al., 2007c). Toxíny mikromycét sú rozšírené po celom svete a patria medzi hlavné kontaminanty potravín (Bhatnagar et al., 2002, Peshin et al., 2002). Ich výskyt závisí od geografických a sezónnych faktorov, ako aj od pestovateľských, zberových, skladovacích a prepravných spôsobov (Bhatnagar et al., 2002). Počas skladovania obilných zŕn je rast vláknitých mikroskopických húb a produkcia toxických sekundárnych metabolitov výsledkom kombinácie viacerých faktorov, ku ktorým patria prítomnosť toxinogénneho kmeňa huby (Votava et al., 2003), poškodenie rastlinného materiálu, teplota, vlhkosť, plyny (O₂ a CO₂), veľkosť inokula, doba skladovania, prítomnosť iných mikroorganizmov (Abramson, 1998, FAO, 2001), interakcie medzi rastlinami, hubami a chemikáliami, používanými pri pestovaní obilnín a pri ich skladovaní (Moss, 1991, Kozakiewicz, 2001). Mykotoxíny môžu byť prítomné v mycéliu a spórach

mikroskopickej huby- intracelulárne, alebo sú vylučované do prostredia v okolí huby- extracelulárne (D'Mello et Macdonald, 1997). Aspergily spolu s fuzáriami a penicíliami tvoria skupinu húb, ktoré dobre rastú na potravinách (Peshin et al., 2002) a sú najfrekvencovanejšími producentmi mykotoxínov v Európe (Creppy, 2002). Tieto huby produkujú niekoľko sto toxických metabolitov (Peshin et al., 2002), ktoré sa nachádzajú v potravinách a nepodliehajú degradácii pri bežnom priemyselnom spracovaní alebo varení, pretože sú termostabilné (Creppy, 2002). Neexistuje metóda dekontaminácie mykotoxínov z potravín a krmív, ktorou by sa zničili všetky mykotoxíny bez ponechania rezíduí alebo metabolitov a zároveň by nebola zmenená nutričná hodnota potravín a krmív (Peraica et al., 2002). V obilninách sa mykotoxíny môžu tvoriť počas rastu rastliny na poli, skladovania po zbere a v niektorých prípadoch aj počas výroby a skladovania potravín (Cousin et al., 2005). Produkciu mykotoxínov v produktoch sa dá zabrániť prevenciou rastu ich producentov (Betina, 1990). V záujme ochrany obilnín pred kontamináciou mykotoxínmi je potrebné dodržiavať preventívne agrotechnické opatrenia, ktoré zabraňujú rastu vláknitých mikroskopických húb (Peraica et al., 2002). Prevencia alebo inhibícia rastu počas skladovania sa zvyčajne zabezpečuje modifikáciou vnútorného prostredia v skladových priestoroch (vlhkosť, teplota, zloženie atmosféry). Vlhkosť sa dá znížiť sušením ešte pred uskladnením. Plynná atmosféra sa dá zmeniť hermetickým skladovaním v kontajneroch s vysokou hladinou CO₂ a nízkou hladinou O₂. Používa sa aj chemická inhibícia rastu húb počas skladovania. Na tento účel sa využívajú napríklad rôzne organické kyseliny (Betina, 1990). Ako je uvedené vyššie, mnohé aspergily majú druho- alebo kmeňovo špecifickú potenciú produkovať mykotoxíny (Frisvad et Thrane, 2010, Frisvad et al., 2006b, Kubátová, 2006, Klich, 2002 a ďalší). V Tab. 2 sú uvedené niektoré toxické sekundárne metabolity tých aspergilov, ktoré môžu byť izolované zo zrna pšenice v podmienkach mierneho podnebného pásma. Aflatoxíny a ochratoxíny patria do skupiny piatich najdôležitejších mykotoxínov pre zdravie ľuďstva na celom svete (Pitt, 2000) a ich výskyt v potravinovom reťazci podlieha v mnohých štátoch systematickej kontrole. **Aflatoxíny** sú najvýznamnejšie mykotoxíny vôbec (Frisvad, 1995). Sú najlepšie preskúmané hubové polyketidové deriváty. Tvoria sa v metabolických dráhach najmenej 12 druhov rodu *Aspergillus* a 7 druhov perfektných rodov *Emericella* a *Petromyces*- 3, resp. 4 druhy (Frisvad et al., 2007c, Pildain et al., 2008, Zalar et al., 2008, Horn et al., 2009a, b). Ich produkcia zatiaľ nebola zistená pri druhoch iných rodov (Frisvad et al., 2007c).

Tab. 2 Vybrané toxíny aspergilov, asociovaných so zrnom pšenice

DRUH	TOXICKÉ SEKUNDÁRNE METABOLITY
<i>Aspergillus candidus</i> Link ¹	terfenylín ² , xantoascín ²
<i>Aspergillus clavatus</i> Desm. ¹	patulín* ³ , askladiol ³ , cytochalazín E* ³ , tryptoquivalíny ³
<i>Aspergillus flavus</i> Link ¹	kyselina kojová ³ , aflatoxín B ₁ * ³ , kyselina aspergilová ³ , kyselina 3-nitropropionová* ³ , kyselina cyklopiazonová* ³
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen. ¹	gliotoxín* ³ , verukulogén* ³ , fumitremorgín A a B* ³ , fumitoxíny ³ , fumigaklavíny* ³ , tryptoquivalíny ³
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh. ¹	nafto-4-pyróny ³ , malformíny ³ , ochratoxín A* (niektoré izoláty) ³ , fumonizín B ₂ ⁴
<i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh. ¹	kyselina penicilová* ³ , ochratoxín A* ³ , xantomegnín* ³ , viomeleín* ³ , vioxantín* ³
<i>Aspergillus oryzae</i> (Ahlb.) E. Cohn ¹	kyselina kojová ³ , kyselina cyklopiazonová* ³ , kyselina 3-nitropropionová* ³
<i>Aspergillus terreus</i> Thom ¹	tereín ³ , patulín* ³ , citrinín* ³ , citreoviridín* ³ , teritrém* ³
<i>Aspergillus tritici</i> B.S. Mehrotra & M. Basu ¹	terfenylín ⁵
<i>Aspergillus ustus</i> (Bainier) Thom & Church ¹	austamid* ³ , austdiol* ³ , austíny* ³ , austocystíny* ³
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab. ¹	sterigmatocystín* ³ , nidulotoxín ³
<i>Aspergillus westerdijkiae</i> Frisvad & Samson ¹	ochratoxín A a B ⁶ , kyselina penicilová ⁶ , meleín ⁶ , 4-hydroxymeleín ⁶ , xanthomegnín ⁶ , viomeleín ⁶ , vioxantín ⁶
<i>Emericella nidulans</i> (Eidam) Vuill. ¹	sterigmatocystín* ³ , nidulotoxín ³ , penicilín** ³
<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangin ¹	fyscion ³ , echinulín ³
<i>Eurotium chevalieri</i> L. Mangin ¹	fyscion ³ , echinulín ³
<i>Eurotium repens</i> de Bary ¹	fyscion ³ , echinulín ³
<i>Eurotium rubrum</i> W. Bremer ¹	fyscion ³ , echinulín ³

*mykotoxín *sensu stricto*; **nie je klasifikovaný ako mykotoxín, nemal by sa však vyskytovať v potravinách; ³Frisvad et Thrane, 2010; ¹autori taxónov sú uvedení v súlade s údajmi v databáze húb Index Fungorum (2010); ²Samson et al., 2002a; ⁴Frisvad et al., 2007b; ⁵Varga et al., 2007b; ⁶Frisvad et al., 2004a

Aflatoxíny sú potenciálne karcinogény, klasifikované v skupine 1, s účinkami na všetky druhy testovaných zvierat vrátane vtákov a rýb (JECFA, 1997). Najsilnejším a zároveň najlepšie preštudovaným je aflatoxín B₁ (JECFA 1997, JECFA 2001). Nárazníkovým

a hlavným cieľovým orgánom aflatoxínov je pečeň (Cousin et al., 2005). V potravinách sú zvyčajne produkované štyri komponenty, aflatoxín B₁, B₂, G₁ a G₂, pomenované podľa farby fluorescencie (B- angl. blue- modrá; G- angl. green- zelená) pod ultrafialovým svetlom a relatívnej pozície na TLC platniach. Zatiaľ čo aflatoxíny skupiny B a G sa prirodzene vyskytujú na rastlinách a rastlinných produktoch, aflatoxíny skupiny M (angl. milk- mlieko) sú vo všeobecnosti akceptované len ako produkty hydroxylácie aflatoxínov B v tráviacom trakte dobytká. Vyskytujú sa v mlieku a mliečnych produktoch (JECFA 1997, JECFA 2001). Aflatoxíny M₁ a M₂ sú, hoci porovnateľne v malých množstvách, produkované aj pri kultivácii čistých kultúr aflatoxinogénnych kmeňov (Stubblefield et al., 1970, Ramachandra et al., 1975, Dutton et al., 1985). Karcinogénny potenciál aflatoxínu M₁ je v porovnaní s potenciálom aflatoxínu B₁ približne o jeden stupeň nižší (JECFA 2001). Hlavnými zdrojmi aflatoxínov v potravinách sú *Aspergillus flavus* a *A. parasiticus*. *A. flavus* je najčastejším kontaminantom potravín aflatoxínmi v tropických krajinách. Tento druh má afinitu zvlášť ku kukurici, arašidom a semenám bavlníka. Zvyčajne produkuje aflatoxíny skupiny B, avšak len asi 40 % známych izolátov je produkčných (Frisvad et al., 2006b). Tančinová et al. (2007) preskrinovali na produkciu aflatoxínu B₁ prostredníctvom tenkovrstvovej chromatografie spolu 415 izolátov aspergilov zo sekcie *Flavi*, detegovaných vo vzorkách viacerých poľnohospodárskych komodít na Slovensku a z tohto počtu boli produkčné len 3 izoláty. Tie boli detegované v kŕmnej zmesi pre hydinu, ktorá obsahovala sójový extrahovaný šrot, importovaný z oblasti Južnej Ameriky. Podobne v štúdií Piecková et al. (2001) nebol v slovenských kukuričných produktoch detegovaný žiadny aflatoxinogénny izolát *A. flavus*. *A. parasiticus* sa zvyčajne nachádza na arašidoch, na ostatných potravinách je zriedkavý. Produkuje aflatoxíny B aj G a prakticky všetky známe izoláty sú toxinogénne (Frisvad et al., 2006b). Viac ako 20 druhov rodu *Aspergillus* produkuje **ochratoxín A** a niektoré z nich sú známe práve ako pravidelné zdroje kontaminácie potravín ochratoxínom (Frisvad et al., 2007a). Mykotoxín je klasifikovaný ako pravdepodobný ľudský karcinogén v skupine 2B s nefrotoxickými účinkami na všetky druhy testovaných zvierat. Účinky na ľudský organizmus je ťažké stanoviť a potvrdiť jednoznačne, rovnako ako aj dlho pozorovanú spojitosť s Balkánskou endemickou nefropatiou (JECFA, 2001. Podľa: Frisvad et al., 2006b). Z aspergilov v skladovaných cereáliách môže byť jeho zdrojom *Aspergillus ochraceus* (Pitt et Hocking, 1997. Podľa: Frisvad et al., 2006b) a z *A. ochraceus* nedávno odčlenený samostatný druh

A. westerdijkiae, ktorý konštantne produkuje ochratoxín A vo veľkých množstvách (Frisvad et al., 2004a). Frisvad et al. (2007b) detegovali karcinogénny mykotoxín, **fumonizín B₂**, v troch kmeňoch s kompletne sekvenovaným genómom a v ex typovej kultúre priemyselne významného druhu *Aspergillus niger*. Fumonizíny boli dlho známe výlučne ako produkty rodu *Fusarium*. Z hľadiska bezpečnosti potravín a krmív patria medzi najvýznamnejšie mykotoxíny. Produkcia kmeňmi *A. niger* bola porovnávaná s produkciou kmeňom *Fusarium verticillioides* a bol zistený odlišný regulačný mechanizmus produkcie. Kmene *A. niger* najlepšie produkovali fumonizín na agarovom médiu s nízkou vodnou aktivitou (Frisvad et al., 2007b). Fumonizíny sú pri požití vyššieho množstva akútne toxické na pečeň a obličky. Primárnymi ochoreniami, spôsobenými fumonizínmi, sú leukoencefalomalácia koní a pľúcny edém ošípaných (Cole et al., 2003). Niektoré kmene *Aspergillus niger* produkujú zároveň fumonizín a ochratoxín A. Potraviny osídlené takýmito kmeňmi by mohli byť kontaminované až dvomi typmi karcinogénnych mykotoxínov (Frisvad et al., 2007b). **Kyselina cyklopiazonová** spôsobuje poškodenie orgánov u cicavcov (Frisvad et al., 2004b); vo veľkých koncentráciách môže spôsobiť fokálne nekrózy vo väčšine vnútorných orgánov stavovcov a pôsobí tiež na kanáliky a orgány nimi tvorené. Tento metabolit, ktorého hlavným zdrojom je *A. flavus*, mal pravdepodobne prídavný závažný účinok na svaly a kosti moriakov, ktoré uhynuli v známom prvom prípade výskytu ochorenia „Turkey-X-disease“. **Patulín** je cytotoxický a pravdepodobne karcinogénny. Vykazuje antibiotickú farmaceutickú aktivitu (Frisvad et al., 2004). Je vo všeobecnosti toxický (Samson et Frisvad, 2004) pre eukaryotické aj prokaryotické organizmy. Toxické účinky na ľudí doteraz neboli presvedčivo dokázané. **Sterigmatocystín** je možný karcinogén, ktorý potenciálne môže spôsobovať ochorenia u ľudí, avšak jeho toxicita môže byť limitovaná nízkou rozpustnosťou vo vode a gastrických šťavách (Frisvad et al., 2006b).

2 Ciele práce

❖ Základný výskum:

- mykologické analýzy zrna obilnín, najmä pšenice, dopestovaného v rôznych lokalitách Slovenska, s cieľom priniesť prehľad o druhovom spektre aspergilov, aktuálne osídľujúcich zrno obilnín slovenského pôvodu,
- *in vitro* testovanie izolátov relevantných druhov na produkciu mykotoxínov: aflatoxínu B₁ a G₁, ochratoxínu A, patulínu, kyseliny cyklopiazonovej, sterigmatocystínu a citrinínu s cieľom priniesť informácie o mykotoxinogénnej potencii slovenských kmeňov aspergilov.

❖ Štúdie izolátov:

- taxonomické štúdie, reflektujúce aktuálne zmeny v taxonómii aspergilov s cieľom zaznamenať nálezy druhov nových pre územie Slovenska,
 - analýzy metabolického profilu vybraných izolátov s cieľom podrobnejšej charakterizácie slovenských kmeňov.
- ### ❖ Dispozícia genofondu v domácich a zahraničných zbierkach pre ďalšiu možnú prácu s izolovaným materiálom.

3 Metodika práce a metódy skúmania

3.1 Biologický materiál

Skúmaným biologickým materiálom boli vláknité mikroskopické huby rodu *Aspergillus* Fr.: Fr. a asociovaných teleomorfných rodov, najmä rodov *Eurotium* Link: Fr. a *Emericella* Berk., izolované zo 70 vzoriek zrna pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.), 2 vzoriek zrna pšenice špaldovej (*Triticum spelta* L.) a 1 vzorky jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.).

3.1.1 Vyšetrené vzorky zrna obilnín

Vzorky zrna pšenice a jačmeňa boli poskytnuté z obilných skladov, ďalej Ministerstvom pôdohospodárstva Slovenskej republiky (vzorky 11 až 22/ 2006) a Ústredným kontrolným a skúšobným ústavom poľnohospodárskym (vzorky 9 až 13/ 2007 a 7 až 11/ 2008; Tab. 3). Vzorky boli odobrané v rôznych časových úsekoch bezprostredne po zbere a v priebehu skladovania. Následne boli do vykonania mykologických analýz skladované v laboratórnych podmienkach. Vyšetrené vzorky boli odobrané zo zrna zožatého v rokoch 2006, 2007 a 2008. Dostupné informácie o jednotlivých vzorkách sú sumarizované v Tab. 3.

Tab. 3 Analyzované vzorky zrna pšenice a jačmeňa

číslo vzorky	druh	lokalita zberu	kraj	spôsob pestovania	odroda
1/ 2006	<i>T. aestivum</i> L.	Veľké Lovce	Nitriansky	K	Arida
2/ 2006	<i>T. aestivum</i> L.	Veľké Lovce	Nitriansky	K	Arida
3/ 2006	<i>T. aestivum</i> L.	Oponice	Nitriansky	K	Armelis
4/ 2006	<i>T. aestivum</i> L.	Oponice	Nitriansky	K	Armelis
5/ 2006	<i>T. aestivum</i> L.	Oponice	Nitriansky	K	Axis
6/ 2006	<i>T. aestivum</i> L.	Oponice	Nitriansky	K	Axis
7/ 2006	<i>T. aestivum</i> L.	Oponice	Nitriansky	K	Axis
8/ 2006	<i>T. aestivum</i> L.	Veľké Lovce	Nitriansky	K	Hana
9/ 2006	<i>T. aestivum</i> L.	Veľké Lovce	Nitriansky	K	Hana
10/ 2006	<i>T. aestivum</i> L.	Oponice	Nitriansky	K	Solara
11/ 2006	<i>T. aestivum</i> L.	-	-	EKO	-
12/ 2006	<i>T. aestivum</i> L.	-	-	EKO	-
13/ 2006	<i>T. aestivum</i> L.	-	-	EKO	Axis
14/ 2006	<i>T. aestivum</i> L.	-	-	EKO	Capo
15/ 2006	<i>T. aestivum</i> L.	-	-	EKO	Josef

(pokračovanie Tab. 3)

číslo vzorky	druh	lokalita zberu	kraj	spôsob pestovania	odroda
16/ 2006	<i>H. vulgare</i> L.	-	-	EKO	Epson
17/ 2006	<i>T. spelta</i> L.	-	-	EKO	Francenkorn
18/ 2006	<i>T. aestivum</i> L.	-	-	EKO	Capo
19/ 2006	<i>T. aestivum</i> L.	-	-	EKO	-
20/ 2006	<i>T. aestivum</i> L.	-	-	EKO	Axis
21/ 2006	<i>T. aestivum</i> L.	-	-	EKO	Josef
22/ 2006	<i>T. aestivum</i> L.	-	-	EKO	Axis
1/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Oponice	Nitriansky	K	Banquet
2/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Oponice	Nitriansky	K	Armelis
3/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Oponice	Nitriansky	K	Armelis
4/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Oponice	Nitriansky	K	Sana
5/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Oponice	Nitriansky	K	Karolinum
6/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Oponice	Nitriansky	K	Axis
7/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Veľké Lovce	Nitriansky	K	Hana
8/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Veľké Lovce	Nitriansky	K	Karolinum
9/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Bodorová	Žilinský	KbF	Anduril
10/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Bodorová	Žilinský	KbF	Evelina
11/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Bodorová	Žilinský	KbF	Ilias
12/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Bodorová	Žilinský	KbF	Mv Vekni
13/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Bodorová	Žilinský	KbF	Bosorka
14/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Oponice	Nitriansky	K	Armelis
15/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Oponice	Nitriansky	K	Sana
16/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Oponice	Nitriansky	K	Banquet
17/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Oponice	Nitriansky	K	Karolinum
18/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Oponice	Nitriansky	K	Axis
19/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Veľké Lovce	Nitriansky	K	Hana
20/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Veľké Lovce	Nitriansky	K	Karolinum
21/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Poprad	Prešovský	EKO	Torysa
22/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Senec	Bratislavský	EKO	Saturnus
23/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Komárno	Nitriansky	EKO	Mv Suveges
24/ 2007	<i>T. spelta</i> L.	Stará Ľubovňa	Prešovský	EKO	Ceralio
25/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Galanta	Trnavský	EKO	Axis
26/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Senec	Bratislavský	EKO	Arida, Venistar
27/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Senec	Bratislavský	EKO	Venistar, Josef
28/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Dunajská Streda	Nitriansky	EKO	-
29/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Nitra	Nitriansky	EKO	-
30/ 2007	<i>T. aestivum</i> L.	Martin	Žilinský	EKO	-
1/ 2008	<i>T. aestivum</i> L.	Kolárovo	Nitriansky	K	Alfa

(pokračovanie Tab. 3)

číslo vzorky	druh	lokalita zberu	kraj	spôsob pestovania	odroda
2/ 2008	<i>T. aestivum</i> L.	Trnava	Trnavský	K	-
3/ 2008	<i>T. aestivum</i> L.	Trnava	Trnavský	K	-
4/ 2008	<i>T. aestivum</i> L.	Dolná Krupá	Trnavský	K	-
5/ 2008	<i>T. aestivum</i> L.	Poprad	Prešovský	K	Alacris
6/ 2008	<i>T. aestivum</i> L.	Poltár	Banskobystrický	K	Hana
7/ 2008	<i>T. aestivum</i> L.	Beluša	Trenčiansky	KbF	Baroko
8/ 2008	<i>T. aestivum</i> L.	Beluša	Trenčiansky	KbF	Etela
9/ 2008	<i>T. aestivum</i> L.	Beluša	Trenčiansky	KbF	Anduril
10/ 2008	<i>T. aestivum</i> L.	Beluša	Trenčiansky	KbF	Ilias
11/ 2008	<i>T. aestivum</i> L.	Beluša	Trenčiansky	KbF	Bosorka
12/ 2008	<i>T. aestivum</i> L.	PD Sokolce	Nitriansky	K	Margaret
13/ 2008	<i>T. aestivum</i> L.	Smižany	Košický	K	-
14/ 2008	<i>T. aestivum</i> L.	Smižany	Košický	K	-
15/ 2008	<i>T. aestivum</i> L.	Smižany	Košický	K	-
16/ 2008	<i>T. aestivum</i> L.	Matejovce	Prešovský	K	-
17/ 2008	<i>T. aestivum</i> L.	Spišské Bystré	Prešovský	K	-
18/ 2008	<i>T. aestivum</i> L.	Turčianske Teplice	Žilinský	K	Driffter
19/ 2008	<i>T. aestivum</i> L.	Liptovský Mikuláš	Banskobystrický	K	Rheia C1
20/ 2008	<i>T. aestivum</i> L.	Podtureň	Žilinský	K	Ilias
21/ 2008	<i>T. aestivum</i> L.	Závada	Banskobystrický	K	Atrium

T.- *Triticum*; *H.*- *Hordeum*; K, EKO, KbF- zrno dopestované: K- takzvané konvenčne; EKO- takzvané ekologicky na farmách, ktoré majú tento štatút priznaný Ministerstvom pôdohospodárstva Slovenskej republiky; KbF- takzvané konvenčne bez použitia fungicídnej ochrany

3.2 Mykologické analýzy

3.2.1 Izolácia aspergilov zo zrna obilnín

3.2.1.1 Endogénne osídlenie

Zloženie endogénnej mykocenózy bolo stanovené metódou priameho ukladania povrchovo vysterilizovaných zŕn na agarové platne (Samson et al., 2002b, Hocking et al., 2006). Viac ako 300 kusov makroskopicky morfológicky bezchybných, nepoškodených pšeničných zŕn bolo povrchovo vysterilizovaných dvojminútovým pôsobením 0,4 % roztoku chloramínu a následne opláchnutých sterilnou destilovanou vodou. Zrná vysušené na sterilnom filtračnom papieri boli následne v počte 7 alebo

8 uložené na povrch platní s DRBC (agar s dichlóranom, Bengálskou červeňou a chloramfenikolom; Merck, Nemecko; 100 zrn), DYSG (agar s dichlóranom, chloramfenikolom, kvasničným extraktom a glycerolom; Lund et Frisvad, 2003; 100 zrn) a DCPA (agar s dichlóranom, chloramfenikolom a peptónom; Burgess et al., 1988; 100 zrn) a kultivované 5–7 dní v tme, pri teplote 25 ± 1 °C. Dichlóran (2, 6-dichloro-4-nitroanilín; Fluka Chemika, Švajčiarsko) bol do DYSG a DCPA pridávaný po autoklávaní rozpustený v etanole (Burgess et al., 1988) a chloramfenikol (Penta, Česká republika) pred naliatím médií do Petriho misiek.

3.2.1.2 Osídlenie povrchu a mykocenóza zomletého zrna

Mykocenóza povrchu zrna a mykocenóza zomletého zrna boli stanovené platňovou zried'ovaciou metódu (Samson et al., 2002b, Hocking et al., 2006). Ako riediaci roztok bola zvolená sterilná peptónová voda (Števlíková et al., 2001). Propaguly z 20 g homogenizovaných celých, resp. zomletých (ETA 0010, Česká republika; 2 min) zrn boli trepaním (horizontálna trepačka, 30 min) uvoľnené do 180 ml riediaceho roztoku s 0,02 % prídavkom Tween 80. Riedenia prvého až tretieho stupňa boli v trojnásobnom opakovaní v objeme 0,1 ml povrchovo inokulované na platne s DRBC a MEA (agar so sladínovým extraktom; BiomarkTM, India). Kultivácia prebiehala 5–7 dní v tme, pri teplote 25 ± 1 °C.

Po uplynutí kultivačnej doby boli z izolovaných zmesných kultúr mikroskopických húb jedince s mikroštruktúrami, charakteristickými pre aspergily prenesené na identifikačné médiá.

3.2.2 Identifikácia aspergilov do úrovne rodov a druhov

Aspergily boli identifikované na základe čo možno najširšieho súboru dát. Použité prvky polyfázickej koncepcie sú vyznačené farebne na Obr. 2 (Kap. 1.2.3).

Základné identifikačné médiá: CYA (Czapkov agar s kvasničným extraktom)-kultivácia v tme, pri teplotách 25 a 37 ± 1 °C a CY20S (Czapkov agar s kvasničným extraktom a 20 % sacharózy; Klich, 2002)- kultivácia v tme, pri teplote 25 ± 1 °C. Podľa potreby boli ďalej zvolené kombinácie kultivačných médií a teplôt (vždy s toleranciou ± 1 °C; Tab. 4). Kultivácia prebiehala v tme, 7–14 dní.

Diagnostická literatúra (zoradená podľa roku vydania):

- rod *Aspergillus*: Pitt et Samson (1990), Klich (2002), Samson et al. (2002a), Frisvad et al. (2004a), Kubátová (2006), Samson et al. (2007a), Varga et al (2007a, b),

- rod *Emericella*: Klich (2002), Samson et al. (2002a), Kubátová (2006),

- rod *Eurotium*: Blaser (1974/ 75), Pitt (1985), Pitt et Hocking (1999).

Znaky hodnotené po kultivácii: makromorfologické a mikromorfologické charakteristiky (Kap. 1.2.5). Priemer kolónií bol meraný pravítkom. Na makroskopickú fotodokumentáciu bol použitý fotoaparát Olympus Camedia C-5000 (Obr. 7, 18- 1) a skener HP Scanjet G4010 (Obr. 13 a 16). Obr. 10, 11, 14, 20 A a 22 boli odfotené v BioCentre DTU, Lyngby, Dánsko a Obr. 20 B a C v RomerLabs Division Holding, Tulln, Rakúsko. Mikroštruktúry boli pozorované vo vitálnych preparátoch s laktofenolom (Števlíková et al., 2001) mikroskopom Olympus BX51. Dokumentácia a meranie mikroštruktúr boli robené programom QuickPhoto Camera 2.3, fotoaparátom Olympus SP- 500 UZ, pre *Aspergillus parasiticus* MD 502 programom Micro Image, mikroskopom Olympus Provis AX70 a fotoaparátom Olympus F 1.8.

Tab. 4 Kultivačné médiá a teploty používané pre identifikáciu aspergilov

sekcia	kultivačné médiá	teplota [°C]
<i>Aspergillus, g. Eurotium</i>	CYA, CYAS20, CY20S, CY40S	25, 30, 37
<i>Restricti</i>	CYA, CYAS, CYAS20, CY20S, CY40S, CZ, MEA	25, 30, 37
<i>Fumigati</i>	CREA, CYA, CZ, MEA, OA, YES	10, 25, 37, 50
<i>Clavati</i>	CYA, YES	25, 37
<i>Circumdati</i>	CREA, CYA, MEA, YES	25, 37
<i>Candidi</i>	CYA, CZ, MEA, OA, YES	25, 37
<i>Cremeri</i>	CREA, CYA, MEA, YES	25, 37
<i>Flavi</i>	CYA, CZ, 5/2 agar, YES	25, 37, 42
<i>Nigri</i>	CYA, YES	25, 37
<i>Terrei</i>	CYA, YES	25, 37
<i>Nidulantes</i>	CYA	25, 37

g.- rod; CREA- agar s kreatínom a sacharózou (Samson et al., 2002a); CY20S- Czapkov agar s kvasničným extraktom a 20 % sacharózy; CY40S- CY20S, modifikované zvýšením obsahu sacharózy na 40 %; CYA- Czapkov agar s kvasničným extraktom; MEA- agar so sladínovým extraktom (Klich, 2002); CYAS- Czapkov agar s kvasničným extraktom a 5 % NaCl (Frisvad et Samson, 2004); CYAS20- CYAS, modifikované zvýšením obsahu NaCl na 20 %; CZ- Czapkov agar (s prídavkom roztoku stopových prvkov); OA- agar s extraktom z ovsených vločiek; YES- agar s kvasničným extraktom a sacharózou (s objemom destilovanej vody zvýšeným na 1000 ml; Samson et al., 2002a); 5/2 agar- agar s 5 % V8 džúsu a 2 % agaru (Giorni et al., 2007)

3.3 Kultivačné analýzy

3.3.1 Detekcia aflatoxín produkujúcich kmeňov

3.3.1.1 Detekcia parami amoniaku

Identifikačná metóda podľa Saito et Machida (1999): izoláty boli jednobodovo naočkované do stredu 90 mm plastových Petriho misiek na YES a kultivované v tme, pri teplote 25 ± 1 °C. Na 4. deň kultivácie boli misky obrátené hore dnom a do vrchnáka bolo pridaných 200 μ l 25 % roztoku amoniaku (Lachema, Česká republika). Následne bola zaznamenaná farebná reakcia na spodnej strane kolónií. Reverz kolónií s vyprodukovanými aflatoxínmi sa zafarbí na ružovo (Kubátová, 2006).

3.3.1.2 Fluorescenčná detekcia na agare s kokosovým extraktom

Detekcia podľa Davis et al. (1987), Giorni et al. (2007): izoláty boli jednobodovo naočkované do stredu 60 mm plastových Petriho misiek na CEA (agar s kokosovým extraktom) a kultivované obrátené v tme pri teplote 26 ± 1 °C. Na 5. deň kultivácie bola v miskách na spodnej strane sledovaná prítomnosť modro fluoreskujúcich prstencov pod dlhovlnným UV žiarením (365 nm).

3.3.1.3 Detekcia na selektívnom médiu pre *Aspergillus flavus*/ *A. parasiticus* (AFPA)

Detekcia podľa STN 56 0087 (ISO 7954): izoláty boli trojbodovo naočkované do 60 mm plastových Petriho misiek na AFPA (Samson et al., 2002a) a hodnotené po 48 hod kultivácii v tme pri teplote 30 ± 1 °C. *A. flavus* a *A. parasiticus* produkujú kyselinu aspergilovú, resp. neoaspergilovú, ktorá vytvára so soľami Fe^{3+} farebný komplex feriaspergilín, resp. ferineoaspergilín, ktoré po kultivácii za konštantných podmienok spôsobujú zafarbenie reverzu rastúcich kolónií na žltoranžovo až hrdzavo.

3.3.2 Ružové zafarbenie konídií anízaldehydom

Murakami (1971) použil metódu na klasifikáciu mikromycét, produkujúcich kyselinu kojovú. Izolát bol naočkovaný do 200 ml Erlenmeyerových baniek so 100, resp. 50 ml Czapkovo bujónu (Samson et al., 2002a, bez agaru) s prídavkom 0,05 % anízaldehydu (p-metoxybenzaldehyd; Sigma-Aldrich, Co., USA) a kultivovaný v tme, pri teplote 30° C. Prítomnosť ružového zafarbenia konídií bola pozorovaná denne po dobu štyroch týždňov.

3.4 Analýzy extrolitov

Sú súčasťou polyfázického prístupu k druhovej identifikácii a zároveň poskytujú informácie o toxigenite testovaných izolátov. Výsledky skrínigov boli posudzované v zmysle prác Samson et al. (2002a), Frisvad et al. (2006b), Frisvad et al. (2004a), Samson et al. (2007a, b), Varga et al. (2007a, b), Nielsen et al. (2009), Frisvad et Thrane (2010). Výsledky HPLC-DAD (Kap. 3.3.2) boli konzultované s prof. Frisvadam (BioCentrum DTU, Dánsko) a výsledky LC-MS/ MS (Kap. 3.3.3) s DI Dr. Sulyokom (IFA- Tulln, Rakúsko).

3.4.1 Tenkovrstvová chromatografia (TLC)

Reprezentatívne izoláty potenciálne toxigénnych druhov boli *in vitro* testované na produkciu vybraných mykotoxínov metódou TLC podľa Samson et al. (2002b) s modifikáciou podľa Labuda et Tančinová (2006). Kultivácia pre skrínig kyseliny cyklopiazonovej a sterigmatocystínu prebiehala na CYA, pre skrínig aflatoxínov B₁ a G₁, citrinínu, ochratoxínu A a patulínu na YES 7 a viac dní v tme, pri teplote 25 ± 1 °C. Z kolónií boli spolu s kultivačným médiom vyrezané 3 výseky, každý s plochou približne 5 x 5 mm. Výseky boli extrahované 5 min v 500 µl roztoku chloroform:metanol (2:1, v/v) na Vortexe G-560E (Scientific Industries, Bohemia), resp. -Genie 2 (Mo Bio Laboratories, Inc., Bohemia). Tekuté fázy metabolických extraktov jednotlivých izolátov a štandardy skrínovaných mykotoxínov (Sigma, Nemecko) boli v množstvách 50, resp. 30 µl nanosené na chromatografickú platňu (Macherem-Nagel, Nemecko) a vyvíjané v roztoku toluén:etylacetát:kyselina mravčia (5:4:1, v/v/v). Vizualizácia aflatoxínov; ochratoxínu; sterigmatocystínu a citrinínu prebiehala priamo pod UV svetlom (365 nm; škvrny: modrá a zelenomodrá; modrozelená; červenkastá a žltozelená s chvostom), vizualizácia kyseliny cyklopiazonovej pod denným rozptýleným svetlom po postriekaní Ehrlichovým činidlom (fialová škvrna s chvostom). Patulín bol viditeľný na dennom svetle po postriekaní 0,5 % roztokom MBTH (metylbenzotiazolum hydrochlorid; Merck, Nemecko) a následnom zahriatí na 130 °C na 8 min (žltlooranžová škvrna).

3.4.2 Vysokotlaková kvapalinová chromatografia s detekciou sústavou diód (HPLC-DAD)

Extrolity reprezentatívnych izolátov druhového spektra boli analyzované metódou HPLC-DAD podľa Frisvad et Thrane (1987), s minoritnými modifikáciami

podľa Smedsgaard (1997) v BioCentre DTU (Dánsko) pod vedením prof. Frisvada. Kmene boli kultivované 14 a viac dní na CYAS v tme, pri teplote 25 ± 1 °C. Z kultúr bolo vyrezaných 5 výsekov (cork borer) a extrahovaných v 500 µl roztoku etylacetát:dichlórmetán:metanol (3:2:1, v/v/v) s 1 % prídavkom kyseliny mravčej ultrasonikáciou, po dobu 60 min. Tekuté fázy boli prenesené do čistých HPLC vialiek a extrakčné činidlo voľne odparené. Následne boli vzorky znovu extrahované 500 µl metanolu ultrasonikáciou po dobu 10 min a pred analýzou mikrofiltrované.

3.4.3 Kvapalinová chromatografia s tandemovou spektrometriou más (LC-MS/MS)

Kultivácia pre skríning izolátov zo sekcie *Nigri* prebiehala na CY20S 7 dní v tme, pri teplote 25 ± 1 °C. Z kolónií boli spolu s kultivačným médiom vyrezané 3 výseky, každý s plochou približne 5 x 5 mm. Výseky boli extrahované 5 min v 500 µl roztoku chloroform:metanol (2:1, v/v) na vortexe. Po voľnom odparení extrakčného činidla boli vzorky poslané na analýzu DI Dr. Sulyokovi (IFA- Tulln, Rakúsko).

Stacionárna kultivácia pre analýzu kmeňa *Aspergillus parasiticus* MD 502 a porovnávaných kmeňov *Aspergillus flavus* NRRL 3251, A. sekcia *Flavi* I, A. sekcia *Flavi* II; kmene boli poskytnuté zo zbierky firmy Romer Labs Division Holding GmbH, Tulln (Rakúsko), prebiehala na modifikovanom tekutom médiu AetM (Abye et Mateles; Johnson et al., 2008) 7 dní v tme, pri teplote 25 ± 1 °C. Veľkosť použitého inokula na 50 ml média bola 2×10^4 konídií. Extrolity boli z média extrahované ekvivalentným objemom etylacetátu na horizontálnej trepačke (100 rpm, 1 hod). 100 µl filtrátu (injekčná striekačka s vatovou vrstvou) etylacetátovej fázy bolo voľne odparených a znovu rozpustených v 1000 µl roztoku acetonitril:voda (1:1, v/v). Pred analýzou bol extrakt znovu prefiltrovaný (Acrodisc® CR 4 mm Syringe Filters). Detekcia a kvantifikácia extrolitov bola vykonaná DI Dr. Sulyokom (IFA- Tulln, Rakúsko). Štatistické parametre boli vypočítané pomocou programu Microsoft Office Excel 2007.

Práca bola riešená v rámci projektov VEGA 1/3456/06, KEGA 3/5080/07, GA SPU 739/05330 a ACM-2009-00405.

4 Výsledky práce a diskusia

4.1 Osídlenie vyšetrených vzoriek aspergilmi

Zo žatvy roku 2006 bolo analyzovaných celkovo 22 vzoriek. Zrno 10 vzoriek pšenice letnej bolo dopestované tzv. konvenčne v Nitrianskom kraji. Ďalších 10 vzoriek zrna pšenice letnej a singulárne vzorky zrna pšenice špaldovej a jačmeňa siateho bolo poskytnutých Ministerstvom pôdohospodárstva Slovenskej republiky; obilniny boli pestované tzv. ekologicky, lokality odberu neboli špecifikované (Tab. 3). Spolu 14 vzoriek bolo osídlených minimálne jedným druhom rodu *Aspergillus* a/ alebo minimálne jedným druhom asociovaných teleomorfných rodov, čo sa prejavilo jednopočetnou alebo viacnásobnou izoláciou daného druhu použitými metódami. Negatívny výsledok analýzy osídlenia zrna aspergilmi bol zaznamenaný vo vzorkách 2/ 2006, 3/ 2006, 4/ 2006, 7/ 2006, 8/ 2006, 9/ 2006, 10/ 2006 a 12/ 2006. Druhové zastúpenie a celkové počty izolátov jednotlivých aspergilov, detegovaných v a na analyzovanom zrne jednotlivých pozitívnych vzoriek, sú uvedené v Prílohe 1 (Tab. 33, Tab. 34, Tab. 35, Tab. 36, Tab. 37, Tab. 38, Tab. 39, Tab. 40, Tab. 41, Tab. 42, Tab. 43, Tab. 44, Tab. 45, Tab. 46). Vo vzorkách bolo zistené spektrum 12 taxónov rodu *Aspergillus*, 1 rodu *Emericella* a 6 rodu *Eurotium* (zoradené podľa frekvencie výskytu; Tab. 5): *Aspergillus flavus*, *Eurotium amstelodami*, *E. chevalieri*, *Aspergillus niger* komplex, *A. fumigatus*, *Eurotium repens*, *Eurotium* sp., *Aspergillus clavatus*, *A. tritici*, *A. versicolor* neurčená skupina, *A. westerdijkiae*, *Eurotium rubrum*, *Aspergillus ochraceus sensu lato*, *A. sydowii*, *A. tubingensis*, *A. versicolor* skupina II, *Aspergillus* sp., *Emericella nidulans*, *Eurotium cristatum*.

Zo žatvy roku 2007 bolo analyzovaných 30 vzoriek. Zrno 15 vzoriek pšenice letnej, pôvodom v Nitrianskom kraji, bolo dopestované tzv. konvenčne a 3 vzoriek tzv. ekologicky; zrno 5 vzoriek pôvodom v Žilinskom kraji bolo dopestované tzv. konvenčne, bez použitia fungicídnej ochrany. Tzv. ekologicky bolo dopestované zrno 3 vzoriek v Bratislavskom a singulárnych vzoriek v Trnavskom, Prešovskom a Žilinskom kraji. Tzv. ekologicky bolo dopestované aj zrno singulárnej vzorky pšenice špaldovej z Prešovského kraja (Tab. 3). Celkovo 28 vzoriek bolo osídlených minimálne jedným druhom rodu *Aspergillus* a/ alebo minimálne jedným druhom asociovaných teleomorfných rodov, čo sa prejavilo jednopočetnou alebo viacnásobnou izoláciou daného druhu použitými metódami. Negatívny výsledok analýzy osídlenia zrna

aspergilmí bol zaznamenaný vo vzorkách 2/ 2007 a 3/ 2007. Druhov  zastúpenie a celkov  po ty izolátov jednotlivých aspergilov, detegovaných v a na analyzovanom zrne jednotlivých pozitívnych vzoriek, sú uveden  v Prílohe 1 (Tab. 47, Tab. 48, Tab. 49, Tab. 50, Tab. 51, Tab. 52, Tab. 53, Tab. 54, Tab. 55, Tab. 56, Tab. 57, Tab. 58, Tab. 59, Tab. 60, Tab. 61, Tab. 62, Tab. 63, Tab. 64, Tab. 65, Tab. 66, Tab. 67, Tab. 68, Tab. 69, Tab. 70, Tab. 71, Tab. 72, Tab. 73, Tab. 74). Vo vzorkách bolo zisten  spektrum 16 taxónov rodu *Aspergillus*, 1 rodu *Emericella* a 8 rodu *Eurotium* (zoraden  podl a frekvencie výskytu; Tab. 5): *Eurotium repens*, *Aspergillus* sp., *Eurotium amstelodami*, *Aspergillus flavus*, *Eurotium* sp., *E. rubrum*, *E. herbariorum* skupina, *Aspergillus fumigatus*, *Eurotium chevalieri*, *Aspergillus niger* komplex, *A. versicolor* neur en  skupina, *Eurotium herbariorum/ rubrum*, *Aspergillus sydowii*, *A. tritici*, *Emericella nidulans*, *Aspergillus ochraceus sensu lato*, *A. candidus sensu lato*, *A. clavatus*, *A. cf. melleus*, *A. restrictus*, *A. terreus*, *A. turingensis*, *A. versicolor* skupina II, *A. westerdijkiae*, *Eurotium appendiculatum*.

Zo žatvy roku 2008 bolo analyzovaných celkovo 21 vzoriek zrna p senice letnej. Zrno 5 vzoriek, pôvodom v Trenčianskom kraji, bolo dopestované tzv. konvenčne bez použitia fungicídnej ochrany. Tzv. konvenčne bolo dopestované zrno 3 vzoriek pôvodom v  ilinskom, 3 v Košickom, 3 v Prešovskom, 3 v Trnavskom, 2 v Nitrianskom a 2 v Banskobystrickom kraji (Tab. 3). Celkovo 18 vzoriek bolo osídlených minimálne jedným druhom rodu *Aspergillus* a/ alebo minimálne jedným druhom asociovaných teleomorfných rodov, čo sa prejavilo jednopočetnou alebo viacnásobnou izoláciou daného druhu použitými metódami. Negatívny výsledok analýzy osídlenia zrna aspergilmí bol zaznamenaný vo vzorkách 9/ 2008, 10/ 2008 a 19/ 2008. Druhov  zastúpenie a celkov  po ty izolátov jednotlivých aspergilov, detegovaných v a na analyzovanom zrne jednotlivých pozitívnych vzoriek, sú uveden  v Prílohe 1 (Tab. 75, Tab. 76, Tab. 77, Tab. 78, Tab. 79, Tab. 80, Tab. 81, Tab. 82, Tab. 83, Tab. 84, Tab. 85, Tab. 86, Tab. 87, Tab. 88, Tab. 89, Tab. 90, Tab. 91, Tab. 92). Vo vzorkách bolo zisten  spektrum 14 taxónov rodu *Aspergillus*, 1 rodu *Emericella* a 11 rodu *Eurotium* (zoraden  podl a frekvencie výskytu; Tab. 5): *Eurotium amstelodami*, *Aspergillus flavus*, *Eurotium* sp., *Aspergillus* sp., *Eurotium herbariorum* skupina, *E. repens*, *E. rubrum*, *E. chevalieri*, *Aspergillus candidus sensu lato*, *Eurotium herbariorum/ rubrum*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger* komplex, *A. tritici*, *A. versicolor* neur en  skupina, *A. clavatus*, *A. sydowii*, *A. wentii*, *A. ochraceus sensu lato*,

A. parasiticus, *A. versicolor* skupina II, *A. westerdijkiae*, *Emericella nidulans*, *Eurotium cf. amstelodami*, *E. amstelodami/chevalieri*, *E. cf. chevalieri*, *E. herbariorum/repens*.

Zachytené druhy sú vlastné skladovanej pšenici, sú z nej popri ďalších druhoch celosvetovo viac alebo menej často referované, ako je sumarizované v prácach Kozakiewicz (1989), Singh et al. (1991), Pitt et Hocking (1999), Filtenborg et al. (2002), Malíš, Ostrý et al. (2003), Frisvad et al. (2006b), Varga et al. (2007a). Podobne Jesenská (1987) uvádza, že v múkach a krupici slovenskej proveniencie sa vyskytujú rovnaké druhy a rody mikroskopických húb ako v cereálnych produktoch iných štátov, pričom uvádza porovnania s nálezmi v Austrálii, USA a ZSSR. Zriedkavými druhmi sú *Eurotium cristatum* (Kap. 4.3) a *E. appendiculatum*- Blaser (1974/ 75) ho zaradil do skupiny *E. echinulatum* a uvádza, že druhy tejto skupiny osídľujú chlieb a iné potraviny; rastú však pomaly aj v optimálnych podmienkach, preto sú zachytené len zriedkavo. Záznamov druhov *Aspergillus tritici* a *A. westerdijkiae* je málo v dôsledku ich nedávnej deskripcie po odčlenení od kryptických druhov *A. candidus* (Varga et al., 2007a) a *A. ochraceus* (Frisvad et al., 2004a). *A. tubingensis* je náročné diagnostikovať morfológickými a fyziologickými metódami. Je pravdepodobné, že býva diagnostikovaný ako *A. niger* (Schuster et al., 2002). Izoláty tzv. čiernych aspergilov, pri ktorých nebol analyzovaný kompletný metabolický profil, sú podľa odporúčania Samson et Varga (2009) identifikované ako *Aspergillus niger* komplex. Podobne, izoláty sekcie *Circumdati* bez analýzy metabolického profilu sú uvedené ako *Aspergillus ochraceus sensu lato*. Druhy sekcie *Candidi*, ktoré neboli kultivované pri diferenciálnej teplote 37 °C, sú uvedené ako *A. candidus sensu lato*. Izoláty druhu *Aspergillus versicolor* sú uvádzané ako „skupina II“ a „neurčená skupina“. Je možné, že v budúcnosti budú tieto skupiny rozdelené na dva samostatné druhy (Frisvad, osobná komunikácia). Skratka *cf.* (lat. *cōnfer*) pri izolátoch *A. cf. melleus*, *Eurotium cf. amstelodami*, *E. cf. chevalieri* znamená neistotu v diagnostikácii a druh, na ktorý sa izolát najviac podobá. Podobne boli v prípade neistoty rozhodnutia diagnózy medzi tromi, resp. dvomi druhmi použité označenia *E. herbariorum* skupina, resp. *Eurotium herbariorum/ rubrum*, *E. herbariorum/ repens* a *E. amstelodami/ chevalieri*. *E. herbariorum* skupina zoskupuje v predkladanej práci pravdepodobne najmä druhy *Eurotium repens* a *E. rubrum* a s oveľa menším podielom *E. herbariorum*, prípadne iné druhy zo skupiny *sensu* Blaser (1974/ 75). Určitý podiel izolátov ostal z dôvodov kontaminácie identifikovaný do úrovne rodu (*Aspergillus* sp., *Eurotium* sp.).

Tab. 5 Frekvencia výskytu aspergilov vo vzorkách zrna pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.), pšenice špaldovej (*Triticum spelta* L.) a jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) slovenského pôvodu, žatva rokov 2006, 2007 a 2008. Taxóny sú uvedené v abecednom poradí.

Frekvencia výskytu [%]												
rok zberu	2006				2007				2008			2006- -2008
taxón \ časť zrna	povrch	zomleté zrno	vnútro	spolu (N=22)	povrch	zomleté zrno	vnútro	spolu (N=30)	povrch	vnútro	spolu (N=21)	spolu (N=73)
<i>Aspergillus candidus</i> s. l.					3,3		3,3	3,3	19	9,5	23,8	6,85
<i>Aspergillus clavatus</i>	9,1			9,1	3,3			3,3	4,8	9,5	9,5	6,85
<i>Aspergillus flavus</i>	13,6		27,3	36,4	20	6,7	30	40	28,6	42,9	57,1	42,47
<i>Aspergillus fumigatus</i>	13,6			13,6	10	10	6,7	23,3	9,5	4,8	14,3	17,81
<i>Aspergillus</i> cf. <i>melleus</i>							3,3	3,3				1,37
<i>Aspergillus niger</i> komplex	9,1	4,5	9,1	18,2	6,7		6,7	13,3	9,5	9,5	14,3	15,07
<i>Aspergillus ochraceus</i> s. l.	4,5			4,5	3,3		3,3	6,7	4,8		4,8	5,48
<i>Aspergillus parasiticus</i>										4,8	4,8	1,37
<i>Aspergillus restrictus</i>					3,3			3,3				1,37
<i>Aspergillus sydowii</i>			4,5	4,5	3,3	3,3	3,3	10	9,5		9,5	6,85
<i>Aspergillus terreus</i>					3,3	3,3		3,3				1,37
<i>Aspergillus tritici</i>	4,5		4,5	9,1	3,3	6,7	6,7	10	14,3		14,3	10,96
<i>Aspergillus tubingensis</i>			4,5	4,5			3,3	3,3				2,74
<i>Aspergillus versicolor</i> ¹		4,5		4,5	3,3			3,3	4,8		4,8	4,11
<i>Aspergillus versicolor</i> ²	9,1			9,1	10	6,7		13,3	14,3	4,8	14,3	15,07
<i>Aspergillus wentii</i>										9,5	9,5	2,74
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>			9,1	9,1			3,3	3,3	4,8		4,8	5,48
<i>Aspergillus</i> sp.	4,5			4,5	16,7	6,7	30	43,3	38,1	19	47,6	32,88

(pokračovanie Tab. 5)

Frekvencia výskytu [%]												
rok zberu	2006				2007				2008			2006- -2008
časť zrna taxón	povrch	zomleté zrno	vnútro	spolu (N=22)	povrch	zomleté zrno	vnútro	spolu (N=30)	povrch	vnútro	spolu (N=21)	spolu (N=73)
<i>Aspergillus</i>	45,5	9,1	36,4	63,6	43,3	30	53,3	80	71,4	52,4	71,4	73,97
<i>Emericella nidulans</i>			4,5	4,5	3,3	3,3	10	10	4,8		4,8	6,85
<i>Emericella</i>			4,5	4,5	3,3	3,3	10	10	4,8		4,8	6,85
<i>Eurotium amstelodami</i>	22,7	4,5	18,2	22,7	16,7	3,3	40	43,3	14,3	61,9	61,9	45,21
<i>Eurotium cf. amstelodami</i>										4,8	4,8	2,74
<i>Eurotium amst./chevalieri</i>										4,8	4,8	1,37
<i>Eurotium appendiculatum</i>							3,3	3,3				1,37
<i>Eurotium chevalieri</i>	9,1		22,7	22,7	3,3	3,3	13,3	16,7	4,8	28,6	28,6	21,92
<i>Eurotium cf. chevalieri</i>										4,8	4,8	1,37
<i>Eurotium cristatum</i>			4,5	4,5								1,37
<i>Eurotium herbariorum</i> skup.					3,3	10	26,7	26,7		47,6	47,6	23,29
<i>Eurotium herb./rubrum</i>							13,3	13,3	4,8	19	19,0	10,96
<i>Eurotium repens</i>			13,6	13,6	6,7	10	50	50	4,8	33,3	33,3	34,25
<i>Eurotium herb./repens</i>										4,8	4,8	1,37
<i>Eurotium rubrum</i>			9,1	9,1	6,7		30	30		33,3	33,3	24,66
<i>Eurotium</i> sp.	4,5	9,1	9,1	13,6	10		36,7	36,7	33,3	52,4	57,1	35,62
<i>Eurotium</i>	22,7	13,6	27,3	27,3	30	16,7	70	73,3	33,3	81	81,0	61,64
<i>aspergily</i>				63,6				93,3			85,7	

s. l.- *sensu lato*; cf.- *cōnfer*; ¹skupina II; ²neurčená skupina; sp.- *speciēs*; amst.- *amstelodami*; skup.- skupina; herb.- *herbariorum*; N- celkový počet vzoriek

Tab. 6 Aspergily v endogénnej mykocenóze vyšetreného zrna obilnín bez ohľadu na izolačné médium

taxón	rok	počet izolátov				% infik. zrn
		2006	2007	2008	spolu	
<i>Aspergillus candidus sensu lato</i>			1	2	3	0,02
<i>Aspergillus clavatus</i>				2	2	0,01
<i>Aspergillus flavus</i>		8	69	587	664	4,43
<i>Aspergillus fumigatus</i>			4	1	5	0,03
<i>Aspergillus cf. melleus</i>			1		1	0,01
<i>Aspergillus niger</i> komplex		2	3	5	10	0,07
<i>Aspergillus ochraceus sensu lato</i>			1		1	0,01
<i>Aspergillus parasiticus</i>				1	1	0,01
<i>Aspergillus sydowii</i>		1	1		2	0,01
<i>Aspergillus tritici</i>		1	8		9	0,06
<i>Aspergillus tubingensis</i>		1	1		2	0,01
<i>Aspergillus versicolor</i> neurčená skupina				1	1	0,01
<i>Aspergillus wentii</i>				3	3	0,02
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>		2	1		3	0,02
<i>Aspergillus</i> sp.			34	85	119	0,79
<i>Aspergillus</i>		15	124	687	826	5,51
<i>Emericella nidulans</i>		1	3		4	0,03
<i>Emericella</i>		1	3		4	0,03
<i>Eurotium amstelodami</i>		24	61	101	186	1,24
<i>Eurotium cf. amstelodami</i>				2	2	0,01
<i>Eurotium amstelodami/ chevalieri</i>				3	3	0,02
<i>Eurotium appendiculatum</i>			9		9	0,06
<i>Eurotium chevalieri</i>		11	5	59	75	0,5
<i>Eurotium cf. chevalieri</i>				4	4	0,03
<i>Eurotium cristatum</i>		4			4	0,03
<i>Eurotium herbariorum</i> skupina			132	141	273	1,82
<i>Eurotium herbariorum/ rubrum</i>			4	10	14	0,09
<i>Eurotium repens</i>		4	90	50	144	0,96
<i>Eurotium repens/ herbariorum</i>				4	4	0,03
<i>Eurotium rubrum</i>		2	44	84	130	0,87
<i>Eurotium</i> sp.		5	184	90	279	1,86
<i>Eurotium</i>		50	529	548	1127	7,51
aspergily		66	656	1235	1957	13,05
počet vyšetrených zrn		4600	6100	4300	15000	

infik.- infikovaných; cf.- cōnfer; sp.- speciēs

Podobne, najmä pri slede viacerých vzoriek, bohato osídlených aspergilmí, bola z časových, priestorových a materiálnych dôvodov selektovaná čo najširšia paleta izolátov, reflektujúca ich variabilitu, a zvyšné izoláty boli zaznamenané na úrovni rodu. Preto je pravdepodobné, že identita takto zaznamenaných izolátov je zhodná s identitou niektorého druhu zo spektra, detegovaného v konkrétnej vzorke. Alternatívne riešenie- typizácia izolátov, t. j. zoskupenie kolónií do skupín podľa makroskopického vzhľadu a inokulácia reprezentatívnych izolátov, ktorých identita je následne priznaná celej skupine- sa pri aspergiloch, najmä euróciách, ukázala nepresná.

Keďže pri použitej metóde vyšetrenia vnútorného osídlenia zrn bolo na každom médiu vyšetrených 100 kusov zrn, v Tab. 32 až 91 možno detegované počty izolátov považovať s minimálnymi odchýlkami (prípady izolácie viac ako 1 kolónia z 1 zrna) zároveň za percentá infikovaných zrn. V Tab. 6 je toto percento vyjadrené pre jednotlivé taxóny bez ohľadu na rok zberu zrna a izolačné médium. Jesenská (1987) sumarizuje vyšetrenia 8250 povrchovo vysterilizovaných obilných zrn po uskladnení a po žatve roku 1979 v Slovenskej socialistickej republike. Spolu 964 zrn bolo pozitívnych na aspergily, čo predstavovalo 11,69 % osídlenie. Vo vzorkách žatvy rokov 2006–2008 bolo v 15000 vyšetrených povrchovo vysterilizovaných zrnách zistené 13,05 % osídlenie aspergilmí. Celkový počet izolátov druhu *A. flavus* bol v analýzach, publikovaných Jesenskou (1987) 46, čo tvorilo 0,56 % frekvenciu výskytu. Vo vzorkách žatvy rokov 2006–2008 bolo zistené 4,43 % endogénne osídlenie týmto druhom (Tab. 6).

Nízky počet izolátov v zomletom zrne mohol byť spôsobený použitím nevhodného homogenizátora. Pri mletí boli pravdepodobne v dôsledku vysokého stupňa homogenizácie a vzniku zahriatia propaguly prítomné v a na zrne poškodené.

Dôležitejšia ako počet izolátov toho- ktorého druhu, je identita a zistené prítomné spektrum. Pri vzniku podmienok pre germináciu, rast a rozmnožovanie dôjde ku zníženiu kvality zrna, adekvátnemu príslušným mikromycétam.

4.2 Potenciálny vplyv detegovaných taxónov na kvalitu a bezpečnosť zrna

Taxóny sú zoradené podľa frekvencie výskytu (Tab. 5).

❖ Taxóny s frekvenciou výskytu > 13,7 % (detegované v počte vzoriek \geq 10)

Eurotium amstelodami (45,21 %)- Pitt et Hocking (1999) sumarizujú zaznamenanú produkciu chlóranozolov, ktoré môžu spôsobiť nežiaduci zápach v potravinách

transportovaných v kontajneroch (Hill et al., 1995) a izoprénu, ktorý spôsobil nepriaznivý zápach v pekárskom výrobku (Berenguer et al., 1991). Druh je rezistentný voči kyseline sorbovej a sorbátu draselnému pri aplikácii v pekárskych výrobkoch s východiskovým pH blízky neutrálnemu (Marín et al., 2003) a relatívne rezistentný voči kyseline propionovej (Magan et al., 1993. Podľa: Pitt et Hocking, 1999). Klíčivosť zrna pšenice, skladovaného 2 mesiace pri vlhkosti 16,0–16,4 % a teplote 25 °C, klesla po umelej inokulácii zmesnou kultúrou *E. amstelodami*, *Aspergillus candidus* (*sensu lato*; pozn. autorky) a *A. restrictus* z 90 na 27 % (t. j. o 63 %; Papavizas et Christensen, 1960. Podľa: Kozakiewicz, 1989). *E. amstelodami* zvýšilo obsah voľných mastných kyselín v zrne kukurice (Nagel et Semeniuk, 1947). Euróciá boli zaznamenané ako príčina aspergilózy vtákov (Saez, 1961. Podľa: Kozakiewicz, 1989). *Aspergillus flavus* (42,47 %)- bežne osídľuje zrná obilnín (Samson et al., 2002a). Je najčastejším druhom, ktorý môže spôsobovať ich kontamináciu aflatoxínmi (Cotty et al. 1994, Cotty 1997. Podľa: Perrone et al., 2007). Zo všetkých izolátov *A. flavus* je schopných produkovať aflatoxín B₁ len asi 40 % a výskyt produkčných izolátov sa viaže s tropickými a subtropickými krajinami. Okrem aflatoxínov môže tento druh produkovať aj ďalšie mykotoxíny, kyselinu 3- nitropropionovú a kyselinu cyklopiazonovú (Frisvad et al., 2006b). *A. flavus* má schopnosť rásť ako nedeštruktívny patogén (alebo komenzál) v pletivách rôznych rastlín, je schopný rásť pri bežných skladových teplotách vyšších ako chladničkových a pri nízkej vodnej aktivite. Je teda schopný rásť v akejkoľvek komodite pri zhoršených predzberových, zberových a skladovacích podmienkach (Pitt et Hocking, 1999). V štúdiu Nagel et Semeniuk (1947) spôsobil spolu s druhom *Penicillium chrysogenum* 40 % stratu organického materiálu za 4 týždne a bol tiež príčinou zvýšeného obsahu mastných kyselín v zrne kukurice. Spolu s druhmi *A. fumigatus* a *A. niger* (komplex- pozn. autorky) sú najvýznamnejšími aspergilmi, spôsobujúcimi závažné ochorenia u rizikových skupín ľudí (Kozakiewicz, 1989, DeHoog et al., 2000). *A. flavus* bol tiež príčinou aspergilózy vtákov (Ainsworth et Austwick, 1955. Podľa: Kozakiewicz, 1989). Druh je producentom vitamínov riboflavínu, tiamínu a vitamínu C (Podľa: Kozakiewicz, 1989). Tento pozitívny aspekt je prevážený množstvom negatívnych. *Eurotium repens* (34,25 %)- bola zaznamenaná produkcia chlóránizolov, ktoré môžu spôsobiť nežiaduci zápach v potravinách transportovaných v kontajneroch (Hill et al., 1995. Podľa: Pitt et Hocking, 1999). Produkuje páchnuce zlúčeniny vrátane 3-metyl-1-butanolu, 1-oktén-3-olu a 3-oktanónu (Sinha et al., 1985. Podľa: Pitt et

Hocking, 1999). ***Eurotium rubrum*** (24,66 %)- klíčivost' zrna pšenice, skladovaného 1 mesiac pri vlhkosti 17,0–17,2 % a teplote 25 °C, klesla po inokulácii zmesnou kultúrou *E. rubrum*, *Aspergillus candidus* (*sensu lato*; pozn. autorky) a *A. restrictus* z 93 na 25 % (t. j. o 68 %; Papavizas et Christensen, 1960. Podľa: Kozakiewicz, 1989).

***Eurotium herbariorum* skupina** (23,29 %)- vid' *Eurotium repens* a *E. rubrum*. Izoláty sú rezistentné voči kyseline sorbovej a sorbátu draselnému pri aplikácii v pekárenských výrobkoch s východiskovým pH blízkym neutrálnemu (Marín et al., 2003). Izoláty *E. herbariorum* skupiny tvorili 60 % mykocenózy zrna pšenice s „chorým“ alebo poškodeným klíčkom, čo sa prejavilo diskoloráciou pšeničného embrya (Milner et Geddes, 1946. Podľa: Kozakiewicz, 1989). Poškodené embryá sa pri mletí zrna javia ako čierne škvrny. Chlieb upečený z takejto múky má menší objem a nepriaznivý zápach (Sorger-Domenigg et al., 1955. Podľa: Kozakiewicz, 1989). Táto druhová skupina bola tiež zodpovedná za zvýšenie obsahu voľných mastných kyselín v zrne kukurice (Nagel et Semeniuk, 1947).

Eurotium chevalieri (21,92 %)- bola zaznamenaná produkcia izoprénu, príčiny nežiaduceho zápachu v pekárenskom výrobku (Berenguer et al., 1991. Podľa: Pitt et Hocking, 1999). Druh je rezistentný voči kyseline sorbovej a sorbátu draselnému pri aplikácii v pekárenských výrobkoch s východiskovým pH blízkym neutrálnemu (Marín et al., 2003).

Aspergillus fumigatus (17,81 %)- producent tremorgénnych toxínov (Samson et al., 2007a). Termofil (Pitt et Hocking, 1999), primárne osídľujúci rozkladajúcu sa vegetáciu; spôsobuje v nej spontánne zahrievanie (Cooney et Emerson, 1964. Podľa: Pitt et Hocking, 1999). Druh bol často izolovaný z „horúcich miest“ v zrne skladovanom na kanadských farmách (Wallace et Sinha, 1962. Podľa: Kozakiewicz, 1989). O klinickej relevantnosti druhu vid' *A. flavus*. Spolu s druhmi *Emericella nidulans* a *Aspergillus niger* (komplex; pozn. autorky) je často príčinou aspergilózy vtákov (Ainsworth et Austwick, 1955. Podľa: Kozakiewicz, 1989). Infekcia mladých vtákov je zvyčajne fatálna, dospelé vtáky prežívajú, no v stupňujúcej sa oslabenej kondícii. Je spájaný s mykotickou aborciou u hospodárskych zvierat (Austwick et Venn, 1962. Podľa: Kozakiewicz, 1989).

***Aspergillus niger* komplex** (15,07 %)- xerofil (Pitt et Hocking, 1999). V štúdií Nagel et Semeniuk (1947) spôsobil spolu s druhom *Penicillium chrysogenum* 40 % stratu organického materiálu za 4 týždne a bol tiež príčinou zvýšeného obsahu mastných kyselín v zrne kukurice. Spôsobil tiež pokles pH zo 6,0 na 3,4. O klinickej relevantnosti vid' *A. flavus*. O aspergilózach vtákov vid' *A. fumigatus*. *A. niger* (komplex, pozn. autorky) je producentom vitamínov biotínu, tiamínu a riboflavínu (Podľa: Kozakiewicz,

1989), tento pozitívny aspekt je prevážený negatívnymi. *Aspergillus versicolor* neurčená skupina (15,07 %)- *Aspergillus versicolor* je hlavný zdroj páchnucích prchavých zlúčenín v zaplesnivenom zrne (Abramson et al., 1983, Sinha et al., 1988, Börjesson et al., 1992. Podľa: Pitt et Hocking, 1999) a hlavný zdroj sterigmatocystínu v potravinách (Frisvad et al., 2007).

❖ **Taxóny s frekvenciou výskytu < 13,7 % (detegované v počte vzoriek ≤ 10)**

Aspergillus tritici- schopnosť rásť pri teplote 37 °C indikuje druh ako možnú príčinu klinických prípadov, pripisovaných v minulosti druhu *A. candidus* (Varga et al., 2007b).

Eurotium herbariorum/ rubrum- vid' *Eurotium herbariorum* skupina a *Eurotium rubrum*. *Aspergillus candidus sensu lato* je xerofilný druh (Pitt et Hocking, 1999), schopný rásť na skladovanom obilí s 15 % obsahom vlhkosti (Lacey et Magan, 1991. Podľa: Varga et al., 2007b) a zdvihnúť vlhkosť zrna na 18 a viac % a teplotu na 55 °C.

Je odolný voči kyseline propionovej, používanej ako konzervans skladovaných obilnín (Müller et al., 1981. Podľa: Pitt et Hocking, 1999) a je tolerantnejší voči nízkym koncentráciám kyslíka ako väčšina aspergilov (Magan et Lacey, 1984. Podľa: Pitt et Hocking, 1999). O znížení klíčivosti skladovaného zrna pšenice vid' *E. amstelodami* a *E. rubrum*. Spolu s *Eurotium herbariorum* skupinou sa podieľa na diskolorácii pšeničného embrya (Papavizas, 1957. Podľa: Kozakiewicz, 1989). Bol tiež zaznamenaný ako príčina zvýšenia obsahu voľných mastných kyselín v kukurici (Nagel et Semeniuk, 1947). *A. clavatus*- produkuje prchavé látky s výrazným zápachom, pripomínajúcim kvasenú kapustu. Môže spôsobiť zvyšovanie teploty a spontánne zahrievanie sladu (Flannigan et al., 1984, Flannigan, 1986. Podľa: Pitt et Hocking, 1999). Je alergén (Andersen et Nielsen, 2008) a pôvodca ochorenia, označovaného ako sladovníkove pľúca (Riddle et al., 1968, Flannigan, 1986. Podľa: Pitt et Hocking, 1999).

Emericella nidulans- nepravdepodobný kontaminant potravín (Frisvad et al., 2006b). Je marginálny termofil (Lacey, 1980. Podľa: Pitt et Hocking, 1999) a zároveň xerofil, čo je nezvyčajná kombinácia (Pitt et Hocking, 1999). O aspergilózach vtákov vid' *A. fumigatus*. Je spájaný s mykotickou aborciou u hospodárskych zvierat (Austwick et Venn, 1962. Podľa: Kozakiewicz, 1989). Druh bol detegovaný ako pôvodca pľúcnych lézií u koňa a somára (Tscherniak, 1928, Pinoy et Masson, 1915. Podľa: Kozakiewicz, 1989). *Aspergillus ochraceus sensu lato*- ako uvádzajú Frisvad et al. (2004a), ako *A. ochraceus* boli v štúdiách identifikované často druhy *A. westerdijkiae* a *A. steynii*. Tieto druhy sú najdôležitejšími zo sekcie *Circumdati*, predstavujúcimi riziko produkcie

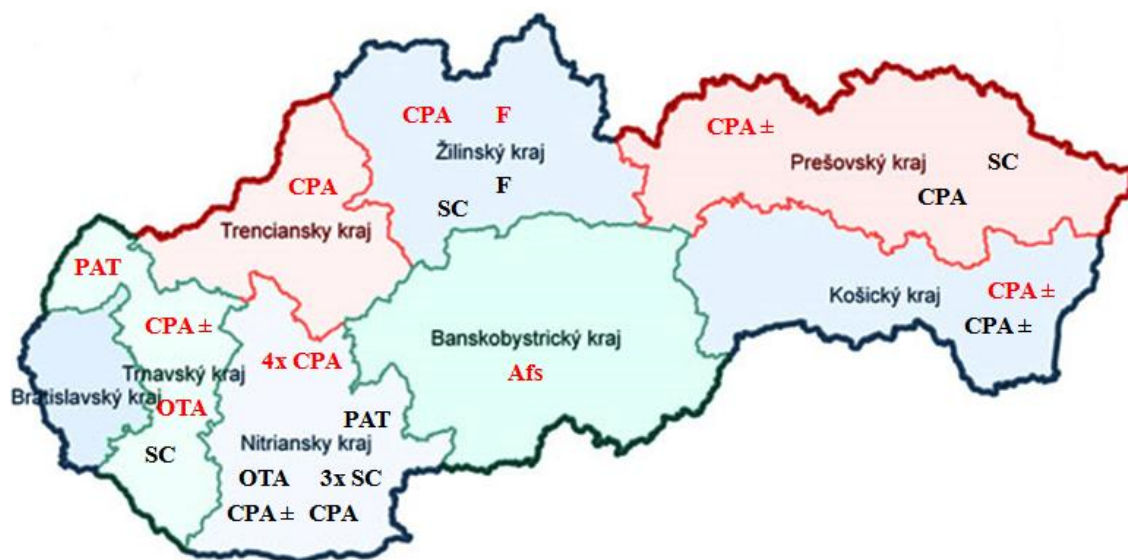
ochratoxínu A v potravinách. Kým *A. ochraceus* produkuje väčšie alebo menšie množstvá ochratoxínu, ale nie konštantne, *A. westerdijkiae* a *A. steynii* sú konštantnými producentmi ochratoxínu. Izoláty týchto druhov sú časté a väčšina z nich produkuje veľké množstvá ochratoxínu A. Dipaulo et al. (1994. Podľa: Pitt et Hocking, 1999) opísali prípad renálneho zlyhania následkom inhalácie ochratoxínu A, prítomného v sýpke uzatvorenej niekoľko mesiacov a zaplesnivenej *A. ochraceus* (*sensu lato*- pozn. autorky). *A. westerdijkiae*- konštantný producent veľkých množstiev ochratoxínu A (Frisvad et al., 2004a). ***A. versicolor* skupina II-** vid' *A. versicolor* neurčená skupina.

❖ **Taxóny s frekvenciou výskytu = 1,37 % (detegované v singulárnych vzorkách)**

Aspergillus cf. melleus- nekonštantný producent stopových množstiev ochratoxínu (Frisvad et al., 2004a). *A. parasiticus*- všetky známe izoláty produkujú aflatoxíny skupiny B a G (Frisvad et al., 2006b). Izoláty často produkujú aflatoxíny v oveľa vyšších koncentráciách ako izoláty *A. flavus* (Pitt, 1993. Podľa: Pitt et Hocking, 1999). *A. restrictus*- o znížení klíčivosti skladovanej pšenice vid' *E. amstelodami* a *E. rubrum*. Izoláty druhu zvýšili obsah voľných mastných kyselín v pokuse skladovanom zrne pšenice (Christensen et Linko, 1963. Podľa: Kozakiewicz, 1989). Druh bol pôvodcom pľúcnych lézií u kráľika (Marsalek et al., 1960. Podľa: Kozakiewicz, 1989). *A. terreus*- termofil (Pitt et Hocking, 1999). Je spájaný s mykotickou aborciou u hospodárskych zvierat (Austwick et Venn, 1962. Podľa: Kozakiewicz, 1989). Bol pôvodcom pľúcnych lézií u vtákov (Ainsworth et Austwick, 1955, Saez, 1961. Podľa: Kozakiewicz, 1989). *A. wentii*- xerofil (Pitt et Hocking, 1999). *Eurotium amstelodami/ chevalieri*- vid' *E. amstelodami* a *E. chevalieri*. *E. cf. chevalieri*- vid' *E. chevaleiri*. *E. herbariorum/ repens*- vid' *E. herbariorum* a *E. repens*.

Pri detegovaných druhoch *Aspergillus restrictus*, *A. sydowii*, *A. wentii*, *Eurotium appendiculatum* a *E. cristatum* nebola dosiaľ popísaná produkcia toxických metabolitov. Ostatné detegované taxóny sú potenciálne producenty najmenej jedného toxického metabolitu (Tab. 2). Schopnosť produkovať mykotoxíny aflatoxín B₁, G₁, ochratoxín A, kyselinu cyklopiazonovú, sterigmatocystín a patulín v *in vitro* podmienkach bola pri reprezentatívnych izolátoch relevantných druhov testovaná TLC metódou. *In vitro* produkcia ďalších metabolitov bola pri vybraných izolátoch skríňovaná metódami HPLC-DAD a LC- MS/ MS. Zistená schopnosť, resp. neschopnosť produkovať toxické metabolity je uvedená v tabuľkách výsledkov

mykologických analýz v Prílohe 1 (Tab. 36, Tab. 37, Tab. 39, Tab. 40, Tab. 41, Tab. 42, Tab. 43, Tab. 44, Tab. 45, Tab. 46, Tab. 47, Tab. 48, Tab. 50, Tab. 51, Tab. 52, Tab. 55, Tab. 62, Tab. 63, Tab. 64, Tab. 68, Tab. 69, Tab. 70, Tab. 73, Tab. 74, Tab. 75, Tab. 76, Tab. 79, Tab. 80, Tab. 83, Tab. 84, Tab. 85, Tab. 86, Tab. 87) a znázornená na Obr. 6.



Obr. 6 Producenty mykotoxínov *sensu stricto*, detegované vo vzorkách s pôvodom v jednotlivých krajoch Slovenska (mapa: Mapy krajov, 2010)

PAT- patulín; CPA- kyselina cyklopiazonová; OTA- ochratoxín A; SC- sterigmatocystín; F- mykotoxíny, produkované druhom *Aspergillus fumigatus*; Afs- aflatoxíny; ± pravdepodobný producent; červenou farbou sú zvýraznené mykotoxíny, produkované endogénnymi izolátmi; čiernou mykotoxíny, produkované izolátmi, detegovanými na povrchu zrna a v zomletom zrne

Potencia produkovať toxický metabolit indikuje možnú kontamináciu zrna. Toxíny môžu byť prítomné aj v nevyklíčených propagulách mikromycét, nachádzajúcich sa na a/ alebo v zrne (Wicklów et Shotwell, 1983. Podľa: Pitt et Hocking, 1999). Diverzita mykocenózy zrna je nielen druhová, ale aj rodová (Jesenská, 1987, Frisvad, 1995, Tančinová et Labuda, 2006). Jednotlivé toxíny môžu mať synergický účinok (Frisvad et al., 2004a). Mnohé mykotoxíny môžu byť produkované vo veľkých množstvách v laboratórnych podmienkach, ale nie nevyhnutne v potravinách, krmivách alebo iných substrátoch (Frisvad et al., 2007c). V obilninách, ktoré nie sú viditeľne infikované hubami vo veľkých množstvách, by mali byť relevantnými metódami zistené len nízke alebo veľmi malé množstvá mykotoxínov (Frisvad, osobná komunikácia).

4.3 Štúdium izolátov jednotlivých taxonomických skupín

Druhy sú zoradené v zmysle vnútorodového členenia rodu *Aspergillus* podľa Peterson (2008; Tab. 1). Autori taxónov a názvy anamorfy, uvedených pri detegovaných teleomorfných druhoch, sú v súlade s Index Fungorum (2010).

Podrod *Aspergillus*

Sekcia *Aspergillus*- rod *Eurotium* Link: Fr.- v 73 analyzovaných vzorkách zrna obilnín bolo v 45 vzorkách zrna pšenice zaznamenaných spolu 1324 teleomorfných izolátov, morfológicky zaradených do 6 druhov, 1 druhovej skupiny a 5 pomocných taxónov. Určitý podiel izolátov bol identifikovaný na úrovni rodu (Tab. 7). V dôsledku homothalickosti rodu *Eurotium* boli kolónie izolátov tvorené vždy teleomorfoú a anamorfoú, ktorých podiely varírovali.

Zaznamenané taxóny v poradí podľa frekvencie ich výskytu (Tab. 5):

- ❖ *Eurotium amstelodami* L. Mangin (anamorfa: *Aspergillus vitis* Novobr.),
- ❖ *E. repens* de Bary (anamorfa: *Aspergillus repens* (Corda) Sacc.),
- ❖ *E. rubrum* W. Bremer (anamorfa: *Aspergillus ruber* Thom & Church),
- ❖ *E. herbariorum* skupina,
- ❖ *E. chevalieri* L. Mangin (anamorfa: *Aspergillus chevalieri* L. Mangin),
- ❖ *E. herbariorum/ rubrum*,
- ❖ *E. appendiculatum* Blaser (anamorfa: *Aspergillus appendiculatus* Blaser),
E. cristatum Raper & Fennell (anamorfa: *Aspergillus cristatus* Raper & Fennell)
Malloch & Cain, *E. herbariorum/ repens*, *E. cf. amstelodami*, *E. cf. chevalieri*,
E. amstelodami/ chevalieri.

Zrelé zrno potravinárskej pšenice, komodita s nízkou vodnou aktivitou, predstavuje substrát prirodzene osídľovaný xerofilnými euróciami. Vzácnym nálezom je izolácia zriedkavého druhu *E. appendiculatum* zo vzorky pšenice špaldovej (Tab. 68; Blaser, 1974/ 75; Hocking et Pitt, 1999). Druhy *E. appendiculatum* a *E. cristatum* (Tab. 43) dosiaľ neboli publikované na území Slovenska (Tab. 30).

Eurotium appendiculatum

Druh popísal Blaser (1974/ 75) podľa izolátu z údenej klobásy s pôvodom v Stäfa (Švajčiarsko). Podľa charakteru rastu druh zaradil do ním vytvorenej skupiny *E. echinulatum*. Šošovicovité askospóry, veľké $6,2 \pm 0,7 \times 4,8 \pm 0,5 \mu\text{m}$, majú v ekvatoriálnej rovine brázdu a nepravidelné hrebene s niťovitými hyalínnymi príveskami, dlhými 1–3,5 μm .

Tab. 7 Izoláty rodu *Eurotium* zo zrna pšenice, zberanej v rokoch 2006-2008 na Slovensku, bez ohľadu na izolačné médium

rok:	2006								2007								2008								spolu 2006-2008	
osídlenie zrna:	vnútro		povrch		zoml. z.		spolu		vnútro		povrch		zoml. z.		spolu		vnútro		povrch		spolu		+	Σ		
taxón:	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ				
<i>E. amstelodami</i>	4	24	5	8	1	1	5	33	11	61	5	8	1	1	12	70	13	101	3	27	13	128	30	231		
<i>E. appendiculatum</i>									1	9					1	9							1	9		
<i>E. chevalieri</i>	5	11	2	4			5	15	4	5	1	1	1	1	5	7	6	59	1	35	6	94	16	116		
<i>E. cristatum</i>	1	4					1	4															1	4		
<i>E. repens</i>	3	4					3	4	15	90	2	7	3	9	15	106	7	50	1	1	6	51	24	161		
<i>E. rubrum</i>	2	2					2	2	9	44	2	8			9	52	7	84			7	84	18	138		
<i>E. cf. amstelodami</i>																	2	2			2	2	2	2		
<i>E. cf. chevalieri</i>																	1	4			1	4	1	4		
<i>E. herbariorum</i> sk.									8	132	1	9	3	6	8	148	10	141			10	141	18	289		
<i>E. herb./repens</i>																	1	4			1	4	1	4		
<i>E. herb./rubrum</i>									4	4					4	4	4	10	1	1	5	11	9	15		
<i>Eurotium</i> sp.	2	5	1	1	2	3	3	9	11	184	2	7			11	191	11	90	7	59	12	149	26	349		
<i>Eurotium</i>	6	50	5	13	3	4	6	67	20	529	8	40	5	17	22	586	17	584	7	123	17	671	45	1324		

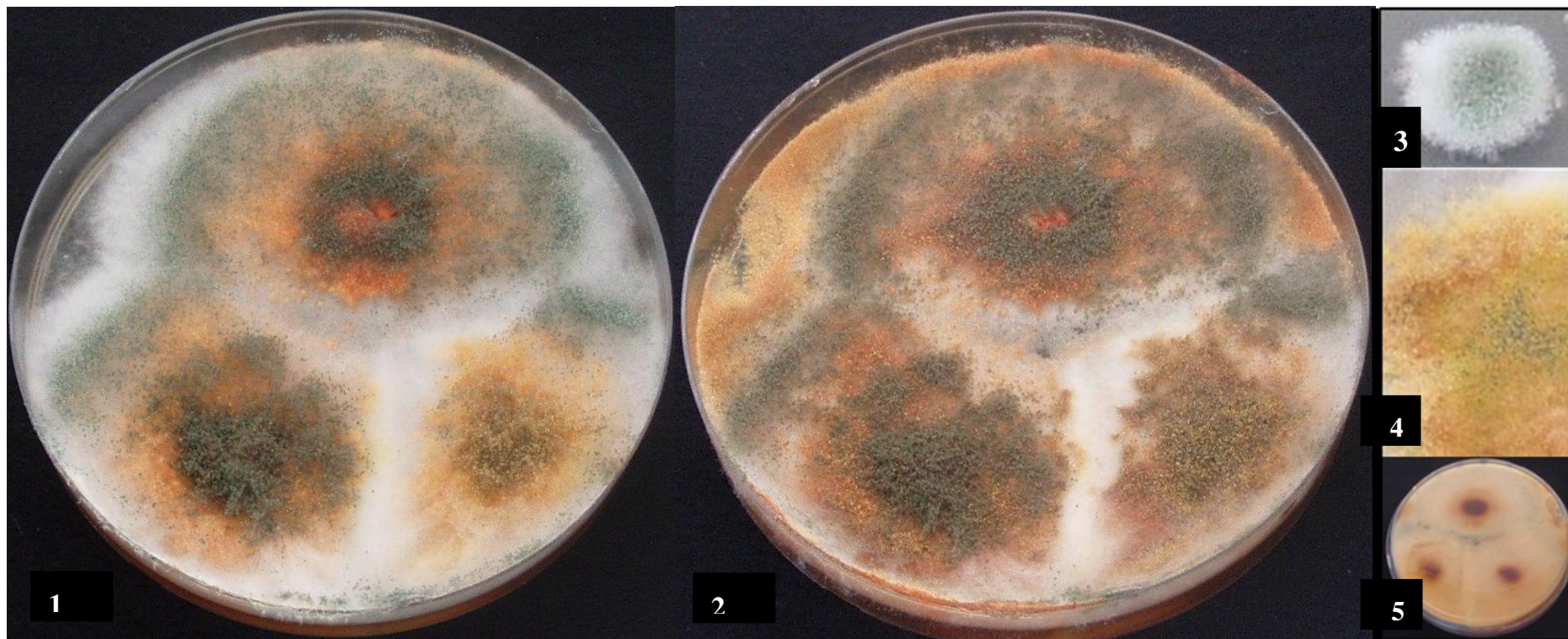
zoml. z.- zomleté zrno; + pozitívne vzorky; Σ súčet izolátov; *E.*- *Eurotium*; *cf.*- *cōnfer*; *sk.*- skupina; *herb.*- *herbariorum*; *sp.*- *speciēs*

Tab. 8 Charakteristiky rastu *Eurotium appendiculatum* MD 257 na médiách so zníženou vodnou aktivitou

deň		5.	7.	14.	
teplota	médium	priemer [mm]			
25 °C	CY20S	30	37	52	askospóry zmaturované na 9. deň
	CY40S	55	72	75	askospóry zmaturované na 7. deň
	CYAS20		< 5	9	len anamorfa; na 14. deň bol pozorovaný začiatok tvorby plodníc
30 °C	CY20S		0	0	absencia rastu a germinácie
	CY40S		23	79	askospóry na 7. deň nezmaturované; anamorfa takmer absentuje na 7. aj 14. deň
	CYAS20		+	13	len anamorfa; na 14. deň bol pozorovaný začiatok tvorby plodníc
37 °C	CY20S		0	0	
	CY40S		0	0	
	CYAS20		0	0	

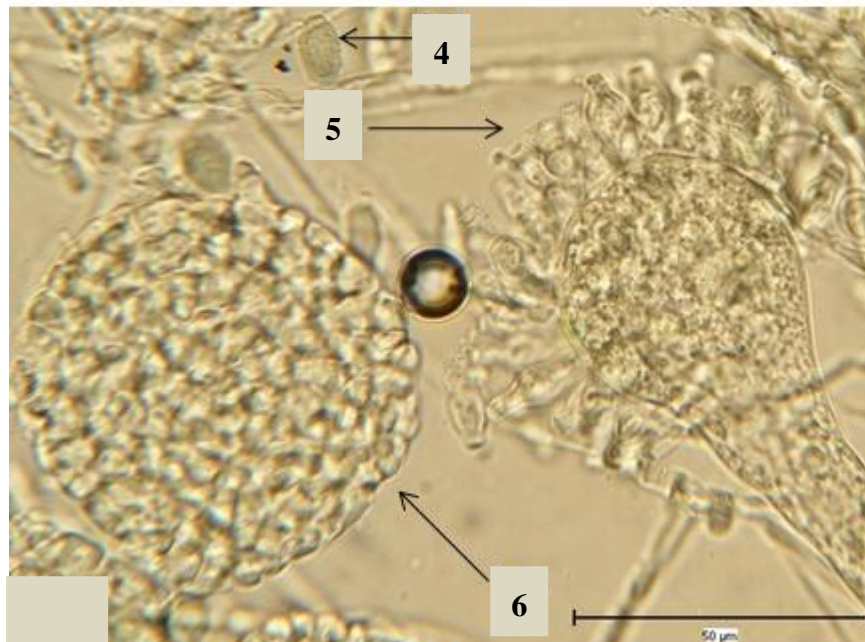
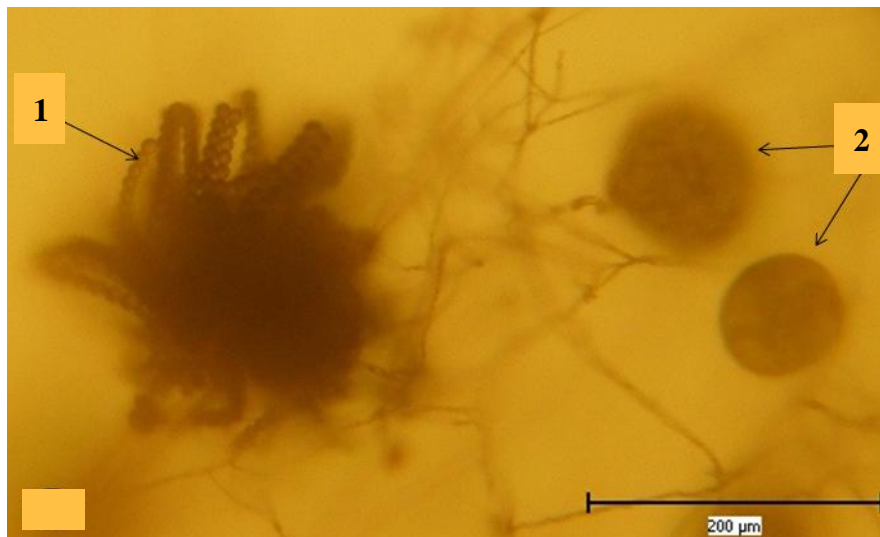
CY20S- Czapkov agar s kvasničným extraktom a 20 % sacharózy (Klich, 2002); CY40S- CY20S, modifikovaný zvýšením obsahu sacharózy na 40 %; CYAS20- Czapkov agar s kvasničným extraktom a 5 % NaCl (Frisvad et Samson, 2004), modifikovaný zvýšením obsahu NaCl na 20 %; + prítomnosť rastu

Pitt (1985) dáva *E. appendiculatum* do pozície synonyma pre druh *E. echinulatum* Delacr., tvoriaci najväčšie askospóry v rode *Eutorium*. Príveskovitú ornamentiku askospór vysvetľuje defektnou priľnavosťou hrebeňov k telu askospóry- javom, ktorý je príležitostne pozorovaný pri iných askomycétach. V Index Fungorum (2010) je uvedené ako samostatný platný druh. Odhliadnuc od rozdielnych názorov na taxonomické zaradenie, izolácia je zriedkavá. Blaser (1974/ 75) uvádza, že druhy skupiny *E. echinulatum* osídľujú chlieb a iné potraviny. Rastú však pomaly aj v optimálnych podmienkach a táto slabá vitalita vysvetľuje ich zriedkavý záchyt. V Tab. 8 je tempo rastu izolátu MD 257 na médiách so zníženou vodnou aktivitou. Makroskopická a mikroskopická fotodokumentácia je na Obr. 7, Obr. 8, Obr. 9. V porovnaní s ostatnými izolovanými druhmi, izoláty *E. appendiculatum* vytvárali po 5 dňoch kultivácie mohutné biele mycélium, pripomínajúce rod *Fusarium*. Na médiu CY40S bol rast najrýchlejší, mycélium na 7. deň kultivácie prerastalo 90 mm Petriho misku. Zaujímavou fyziologickou vlastnosťou bola absencia rastu na CY20S pri teplote 30 °C.



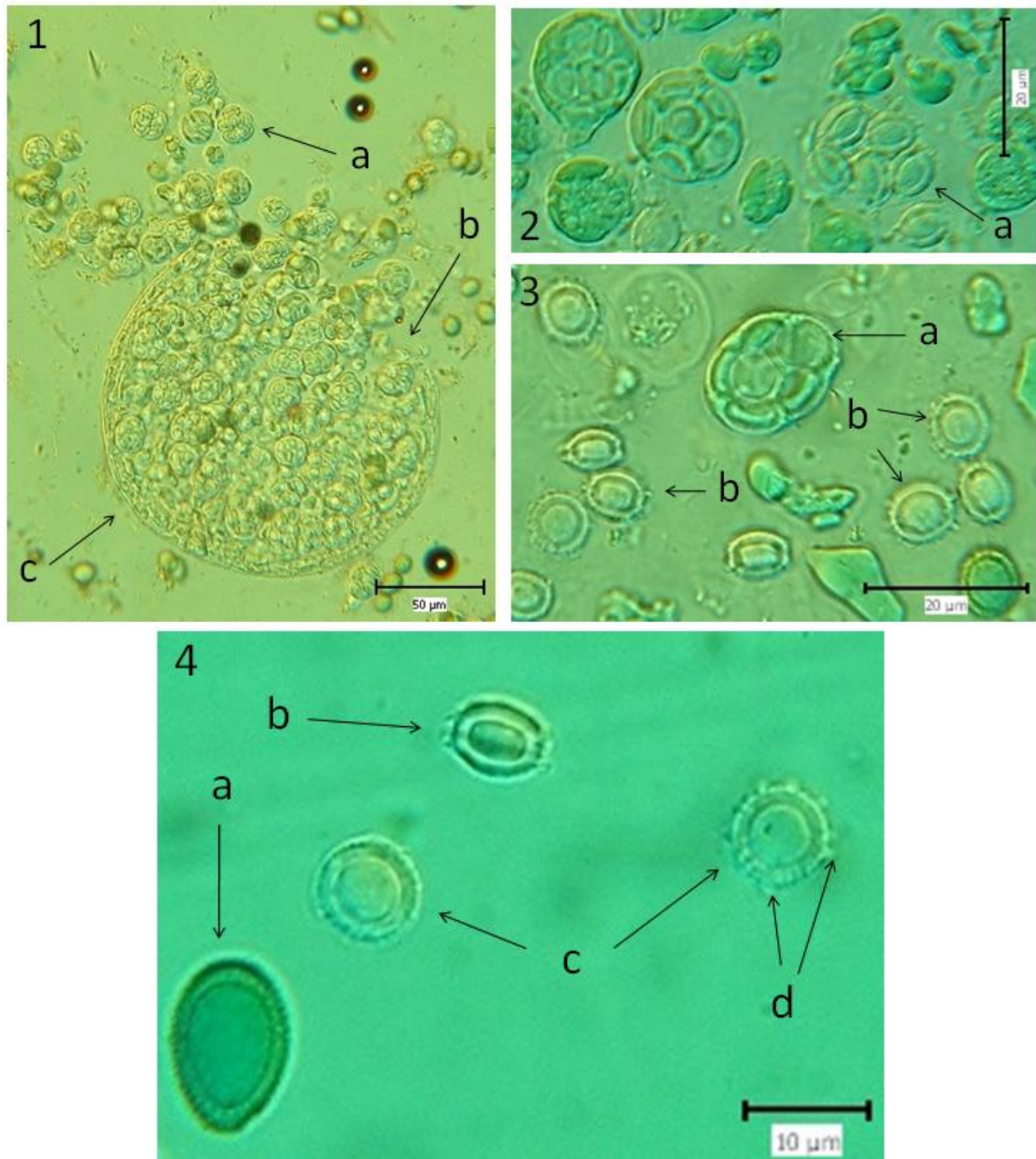
Obr. 7 Makroskopický vzhľad *Eurotium appendiculatum* MD 257, 7. a 14. deň kultivácie

1- CY40S (Czapkov agar s kvasničným extraktom a 20 % sacharózy; Klich, 2002, modifikovaný zvýšením obsahu sacharózy na 40 %), kultivácia v tme, pri teplote 25 °C, 7. deň; 2- CY40S, kultivácia v tme, pri teplote 25 °C, 14. deň; 3- detail kolónie: Czapekov agar s kvasničným extraktom a 5 % NaCl (Frisvad et Samson, 2004), modifikovaný zvýšením obsahu NaCl na 20 %, kultivácia v tme, pri teplote 30 °C, 14. deň; 4- detail kolónie: CY40S, kultivácia v tme, pri teplote 30 °C, 14. deň; 5- reverz: CY40S, kultivácia v tme, pri teplote 25 °C, 14. deň



Obr. 8 Mikromorfológia *Eurotium appendiculatum* MD 257

pohľad *in situ*: 1- konidiálna hlavica s reťazcami konídií; 2- kleistotéciá; pohľad v preparáte s laktofenolom: 3- nezrelé kleistotéciá, mierka= 200 μm; 4- konídiá; 5- vezikulum s fialidami; 6- kleistotécium, mierka= 50 μm



Obr. 9 Mikromorfológia *Eurotium appendiculatum* MD 257, 2. časť

1- zrelé kleistotécium: a- uvoľnené vrecká s askospórami, b- lýza steny plodnice a uvoľnenie vreciek, c- stena plodnice, mierka = 50 µm; 2- vrecká s askospórami: a- lýza steny vrecka a uvoľnenie askospór, mierka = 20 µm; 3- askospóry: a- vo vrecku, b- uvoľnené, mierka = 20 µm; 4- spóry: a- konídiá, b a c- askospóry, laterálny a čelný pohľad, d- prívesky, mierka = 10 µm

Eurotium cristatum

Druh je niekedy zamieňaný s *E. amstelodami*. Askospóry *E. cristatum* sú však o niečo väčšie (dĺžka, vrátane hrebeňov, do 6 µm) a nesúvisle ornamentované jemnými ihlicami. Kleistoteciá sú obklopené žltými hýfami (Pitt et Hocking, 1999). Uvedení

autori tento druh izolovali zriedkavo, z prehriateho jahodového pyrú a filipínskych arašidov a Paride et al. (2001) popisuje izolát z vlhkej zatrávnenej pôdy pri jazere Kara Kuri v Číne. Makroskopická a mikroskopická fotodokumentácia izolátu MD 13 je v práci Milová (2010).

***Eurotium repens*, *E. rubrum*, *E. herbariorum* skupina**

Eurotium repens de Bary a *E. rubrum* W. Bremer patria medzi najbežnejšie sa vyskytujúce druhy rodu *Eurotium* Link:Fr. (Pitt et Hocking, 1999). Spolu s *E. herbariorum* Link sú blízko príbuzné (Pitt et Hocking, 1999; Klich, 2002) a navzájom podobné. Patria do skupiny *E. herbariorum* (Blaser 1974/ 75). Od ďalších frekventovaných druhov, *E. amstelodami* a *E. chevalieri* (Pitt et Hocking, 1999, Klich, 2002, Samson et al., 2002a), sa odlišujú ako ornamentikou askospór, tak aj absenciou rastu pri teplote 37 °C (Butinar et al., 2005). Názory autorít na delimitáciu a samostatnú identitu *E. repens*, *E. rubrum* a *E. herbariorum* boli rozdielne už v minulosti (Domsch et al., 1980. Podľa: Klich, 2002; Blaser, 1974/ 75, Pitt, 1985) a rozdielnymi ostávajú doposiaľ. Podľa Pitta (osobná komunikácia) sú všetky tri druhy platné; výskyt *E. rubrum* je častý v porovnaní so zriedkavejším druhom *E. herbariorum*. Podľa Frisvada (osobná komunikácia) je existenciu separátnych druhov *E. rubrum* a *E. herbariorum* potrebné preskúmať. V Index Fungorum (2010) sú všetky tri uvedené ako samostatné druhy. Podobná a málo výrazná ornamentika askospór sťažuje druhovú identifikáciu vyššie vymenovaných druhov. Na nájdenie pomocného kultivačného identifikačného znaku, odlišujúceho tieto druhy, bola zameraná časť experimentálnej práce s izolátmi skupiny *E. herbariorum*. Sledovanie tempa rastu na médiách so zníženou vodnou aktivitou (CY20S, CY40S, CYAS, CAYS20) pri simultánnom použití teplôt 25 a 30 °C bolo nadviazaním na sériu kultivácií v BioCentre DTU pod vedením prof. Frisvada. Časť experimentov prebiehala v spolupráci s Ing. Veronikou Milovou. V jej práci (2010) je bohatá dokumentácia vzhľadu, tempa rastu a mikrometrických charakteristík viacerých MD izolátov eurócií. Ich čísla sú v citovanej a predkladanej práci zhodné. Izoláty boli po 7 dňoch kultivácie na základe makroskopicky pozorovanej podobnosti (veľkosť kolónie, intenzita sporulácie, výsledné zafarbenie) na CY20S pri 25 a 30 °C zaradené do dvoch skupín. **Skupinu 1** tvorili izoláty spolu s kmeňom *E. repens* MD 86. Rast a sporulácia na CY20S boli porovnateľne intenzívne pri oboch teplotách. Kolónie pokrývali takmer celý povrch 90 mm Petriho misiek. Farba kolónií bola po 14 dňoch kultivácie tmavo zelená, na miestach s plodnicami svetlo žltá (Obr. 10). Izoláty boli identifikované ako *E. repens*. **Skupinu 2** tvorili izoláty spolu

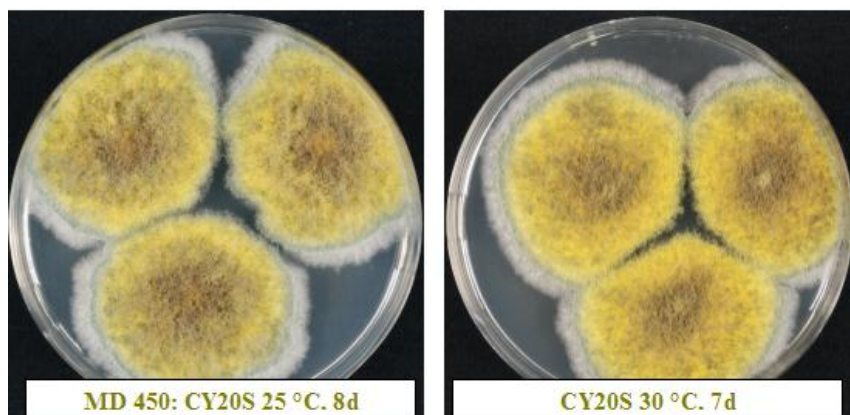
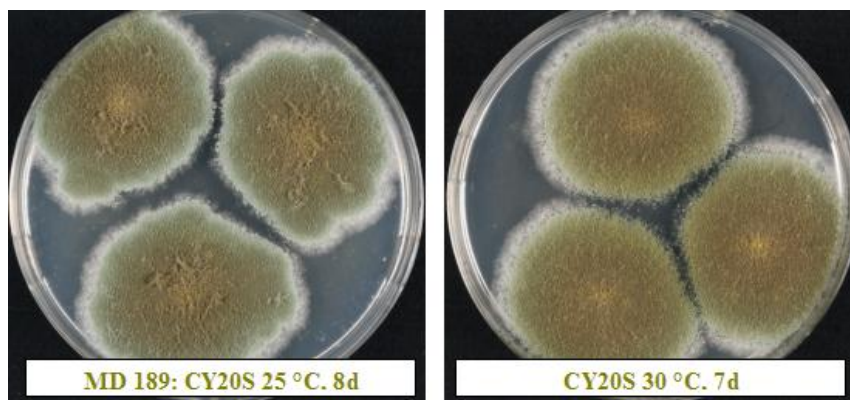
s kmeňom *E. rubrum* MD 123. Rast a sporulácia na CY20S boli pri sledovaných teplotách rozdielne. Pri teplote 25 °C bol rast v porovnaní so skupinou 1 slabší, kolónie boli menšie, sporulácia dobrá. Pri teplote 30 °C rástli izoláty skupiny 2 veľmi slabo, veľkosť kolónií bola menšia ako 1 cm a sporulácia bola pozorovaná len v strede kolónií. Kolónie časti izolátov z tejto skupiny boli po 14 dňoch kultivácie zafarbené na červeno. Tieto izoláty boli identifikované ako *E. rubrum*. Izoláty bez prítomnosti červených plôch v kolóniách boli zaradené do pomocnej skupiny *E. herbariorum/ rubrum*. Určitý podiel izolátov vytváral pri kultivačnej teplote 25 °C po 7 dňoch stredne veľké a dobre vysporulované kolónie a pri teplote 30 °C boli kolónie o niečo menšie, ale intenzívne vysporulované. Po 14 dňoch mali kolónie hnedooranžové a hnedočervené plochy. Tieto izoláty boli rovnako zaradené do pomocnej skupiny *E. herbariorum/ rubrum* (Obr. 10, Obr. 11). Na médiu CY40S boli izoláty kultivované pri teplote 37 °C. Malý podiel izolátov vytváral na 14. deň malé, pavučinové, nevysporulované kolónie. Na médiu CYAS pri teplote 25 °C bola pozorovaná tvorba purpurového pigmentu malým podielom izolátov druhu *E. repens*. Na médiu CYAS20 vytvárali izoláty vo všeobecnosti nepravidelné kolónie. Pri teplote 25 °C bola sporulácia veľmi slabá. Rast a sporulácia boli pri všetkých izolátoch najlepšie pri teplote 30 °C. Pri teplote 37 °C bol zaznamenaný rast 12 z 13 izolátov *E. repens* (11–14 mm) a 2 z 10 izolátov pomocnej skupiny *E. herbariorum/ rubrum* (2; 7 mm).

V Tab. 9 je sumarizované tempo rastu izolátov druhov rodu *Eurotium*, zaznamenávané priebežne počas štúdia.

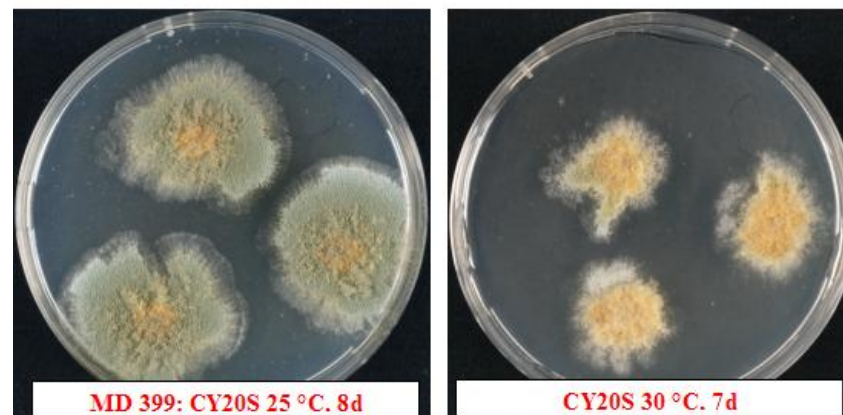
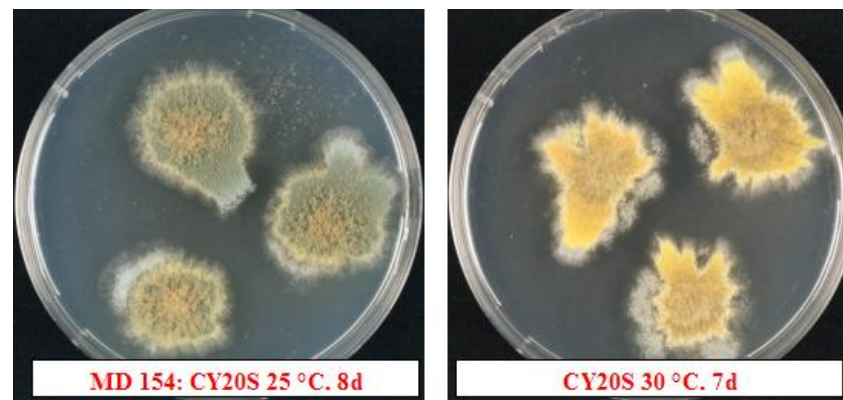
Tab. 9 Tempo rastu izolátov druhov rodu *Eurotium* zo pšenice slovenského pôvodu

teplota:	priemer kolónií CY20S na 7. deň kultivácie [mm]			
	25 °C		30 °C	37 °C
taxón:	študované izoláty	Pitt et Hocking (1999)		
<i>E. amstelodami</i>	37 (33; 43)	30–45	*	38 (35; 42)
<i>E. appendiculatum</i>	37		0	0
<i>E. chevalieri</i>	43 (30, *)	45–65	*	36 (23, *)
<i>E. cristatum</i>	34		24	0
<i>E. repens</i>	49 (41, *)	45–65	41 (23, *)	(0)
<i>E. rubrum</i>	36 (28; 47)	35–60	24 (12; 40)	(0)
<i>E. herbariorum</i> skupina	34 (25; 44)		0	(0)

CY20S- Czapkov agar s kvasničným extraktom a 20 % sacharózy (Klich, 2002); *tri kolónie pokrývali celý povrch 90 mm Petriho misky; *E.* - *Eurotium*



Obr. 10 *Eurotium repens*



Obr. 11 *Eurotium herbariorum/ rubrum*

CY20S- Czapkov agar s kvasničným extraktom (Klich, 2002); d- deň; MD 189- vzorka 13/ 2007, vnútro zrna; MD 450- vz. 5/ 2008, vnútro zrna; MD 154- vz. 12/ 2007, vnútro zrna; MD 399- vz. 30/ 2007, vnútro zrna

Tab. 10 Extrolity eurócií izolovaných zo zrna pšenice slovenského pôvodu (zber rokov 2006-2008), detegované metódou HPLC-DAD

extrolity	<i>Eurotium amstelodami</i>			<i>Eurotium chevalieri</i>			<i>Eurotium repens</i>					<i>Eurotium rubrum</i>			
	MD 95	MD 180	MD 443	MD 91	MD 212	MD 284	MD 189	MD 239	MD 292	MD 331	MD 450	MD 120	MD 119	MD 154	MD 399
auroglaucín	+														
antrachinóny				+		+		+	+	+	+	+	+	+	+
antrachinóny?					+										
asperentíny A							+								
červené antrachinóny									+				+		
červené metabolity												+		+	+
echinulín	+														
epihevedrid		+	+	+	+	+									
epihevedrid A	+														
flavoglaucín	+														
neoechinulín A	+														
fyscion								+	+						
„glabrinol“							+	+	+	+	+				
oranžové metabolity												+			+
questín					+										
cf. questín				+											
questín?				+											

HPLC-DAD- vysokotlaková kvapalinová chromatografia s detekciou sústavou diód (Frisvad et Thrane, 1987, s minoritnými modifikáciami podľa Smedsgaard, 1997); ^{MD 95}vzorka 17/ 2006, povrch zrna; ^{MD 180}vz. 18/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 443}vz. 5/ 2008, vnútro zrna; ^{MD 91}vz. 20/ 2006, vnútro zrna; ^{MD 212}vz. 30/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 284}vz. 1/ 2008, vnútro zrna; ^{MD 189}vz. 13/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 239}vz. 23/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 292}vz. 25/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 331}vz. 1/ 2008, vnútro zrna; ^{MD 450}vz. 5/ 2008, vnútro zrna; ^{MD 120}vz. 8/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 119}vz. 11/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 154}vz. 12/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 399}vz. 30/ 2007, vnútro zrna

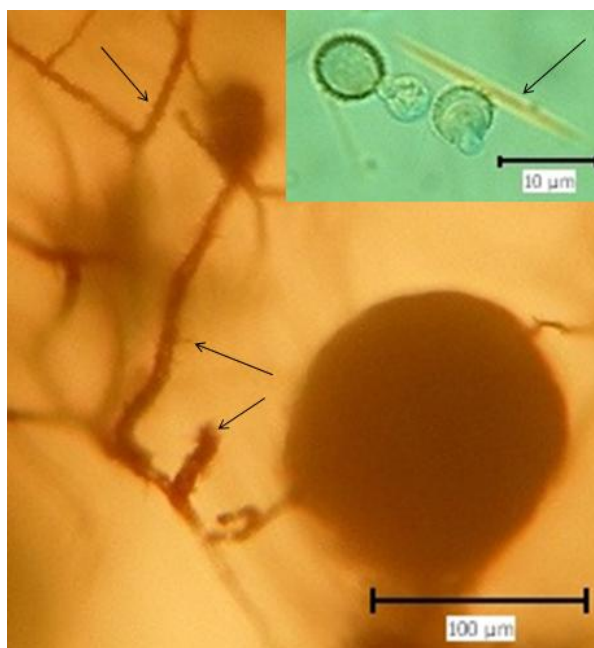
Tab. 11 Atoxinogenita eurócií izolovaných zo zrna pšenice slovenského pôvodu (zber rokov 2006-2008), potvrdená TLC metódou

druh	izolát	aflatoxín B ₁	sterigmatocystín
<i>Eurotium amstelodami</i>	MD 95, MD 180, MD 354, MD 200, MD 443	-	-
	MD 93, MD 26		-
<i>Eurotium cf. amstelodami</i>	MD 503	-	-
<i>Eurotium chevalieri</i>	MD 97, MD 91, MD 212, MD 272, MD 284, MD 514	-	-
	MD 92, 1, MD 98, 2		-
<i>Eurotium cristatum</i>	MD 13		-
<i>Eurotium repens</i>	MD 165, MD 164, MD 171, MD 173, MD 189, MD 239, MD 332, MD 292	-	-
<i>Eurotium rubrum</i>	MD 120	-	-
<i>Eurotium herbariorum</i> skupina	MD 301, MD 302, MD 309, MD 310, MD 228	-	-

TLC- tenkovrstvová chromatografia (Samson et al., 2002b, s modifikáciou podľa Labuda et Tančinová, 2006); ^{MD 95}vzorka 17/ 2006, povrch zrna; ^{MD 180}vz. 18/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 354}vz. 28/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 200}vz. 30/ 2007, povrch zrna; ^{MD 443}vz. 5/ 2008, vnútro zrna; ^{MD 93}vz. 13/ 2006, vnútro zrna; ^{MD 26}vz. 20/ 2006, vnútro zrna; ^{MD 503}vz. 12/ 2008, vnútro zrna; ^{MD 97}vz. 17/ 2006, povrch zrna; ^{MD 91}vz. 20/ 2006, vnútro zrna; ^{MD 212}vz. 30/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 272}vz. 1/ 2008, povrch zrna; ^{MD 284}vz. 1/ 2008, vnútro zrna; ^{MD 514}vz. 16/ 2008, vnútro zrna; ^{MD 92}vz. 17/ 2006, povrch zrna; ¹vz. 17/ 2006, vnútro zrna; ^{MD 98, 2}vz. 19/ 2006, vnútro zrna; ^{MD 13}vz. 19/ 2006, vnútro zrna; ^{MD 165}vz. 11/ 2007, zomleté zrno; ^{MD 164}, ^{MD 173}vz. 13/ 2007, zomleté zrno; ^{MD 171}vz. 13/ 2007, povrch zrna; ^{MD 189}vz. 13/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 239}vz. 23/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 332}vz. 24/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 292}vz. 25/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 120}vz. 8/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 301, MD 302, MD 309, MD 310}vz. 24/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 228}vz. 30/ 2007, vnútro zrna

Butinar et al. (2005) analyzovali metabolické profily izolátov *Eurotium amstelodami*, *E. chevalieri*, *E. herbariorum*, *E. rubrum* a *E. repens* rôzneho pôvodu. Všetky produkovali echinulín, neoechinulín A–D, fycion, flavoglaucín, auroglaucín, dihydroauroglaucín a tetrahydroglaucín. *E. repens* ďalej produkovalo asperentín a *E. rubrum* červené antrachinóny. V štúdií Slack et al. (2009) produkovali izoláty druhov *E. amstelodami*, *E. rubrum* a *E. herbariorum* rovnaké spektrá metabolitov: neoechinulín A a B, epiheveadrid, flavoglaucín, auroglaucín, izotetrahydroglaucín, echinulín, preechinulín, questín. Izoláty *E. herbariorum* produkovali tiež kladosporín a metabolity podobné kladosporínu. Výsledky uvedených štúdií sa líšia v produkcii asperentínov (syn. kladosporínu)- v prvej štúdií boli producentmi kmene *E. repens*, v druhej *E. herbariorum*. Extrolity reprezentatívnych izolátov zo pšenice slovenského pôvodu sú uvedené v Tab. 10. Analýzy boli vykonané na rovnakom pracovisku ako v štúdií Butinar et al. (2005), slovenské izoláty však boli kultivované na CYAS a kmene uvedenej štúdie na CY20S. Je pravdepodobné, že použité kultivačné médium ukázalo limitované spektrum metabolitov (Kap. 4.4). Izolát *E. repens* MD 292 produkoval červené antrachinóny, ktoré v štúdií Butinar et al. (2005) produkovali len kmene druhu *E. rubrum*. Všetky skrínované kmene v štúdií Slack et al. (2009) produkovali veľké množstvá uvedených metabolitov, s výnimkou výrazne menších množstiev epiheveadridu, vyprodukovaného kmeňmi *E. rubrum*. Ako ďalej uvádzajú autori, chemotypy kozmopolitných eurócií sa javia byť nezávislé od regiónu a pôvodu. Hanson (2008) sumarizuje výskum pigmentov eurócií autormi Raistrick et al; auroglaucín je oranžovo-červený pigment. Červené pigmenty eurócií niekedy kryštalizujú na mycéliu v tvare ihlíc. Kryštály boli pozorované v mycéliu niektorých izolátov *Eurotium rubrum* Obr. 12. Ako sumarizujú Frisvad et al. (2006a), euróciá boli publikované ako producenty aflatoxínov, sterigmatocystínu, ochratoxínu A a citrinínu. Tieto údaje však boli z rôznych príčin mylné a produkcia uvedených mykotoxínov euróciami sa relevantnými metódami dosiaľ nepotvrdila. Negatívne boli aj výsledky skrínungu spolu 38 izolátov 5 druhov a 2 pomocných taxónov eurócií v predkladanej práci (Tab. 11).

Sekcia *Restricti*- zo sekcie bolo zo 73 analyzovaných vzoriek zrna obilnín len v jednej vzorke zrna pšenice detegovaných spolu 7 izolátov, patriacich do druhu *Aspergillus restrictus* G. Smith (Tab. 12). Je pravdepodobné, že pri použití ďalšieho izolačného média s výrazne zníženou vodnou aktivitou, by bolo vo vzorkách zachytených viac izolátov zo sekcie (Pitt et Samson, 1990, Klich, 2002).



Obr. 12 Kryštály pigmentov na mycéliu *Eurotium rubrum* MD 328 (vzorka 24/2007, povrch zrna) *in situ* a v preparáte

Aspergillus restrictus

Druh je veľmi rozšírený a s ohľadom na nenápadný habitus pomerne často diagnostikovaný na obilninách a iných sušených potravinách (Pitt et Hocking, 1999). Spolu s blízko príbuzným druhom *A. caesiellus* Saito tvoria na rozdiel od *A. penicillioides* cylindrické konídie, ktoré pri dozretí ostávajú cylindrické alebo nadobúdajú súdkovitý tvar. Dôležitým rozlišujúcim fyziologickým znakom je tempo rastu na CY20S pri 25 °C; *A. restrictus* vo všeobecnosti dosahuje za 7 dní menej (16–20) a *A. caesiellus* viac (20–30) ako 20 mm. *A. restrictus* nerastie pri 37 °C, niektoré izoláty *A. caesiellus* majú pomalý (do 6 mm za 7 dní na CY20S pri 25 °C) rast. Drsné konídie *A. restrictus* sú menšie (4–5,5 µm) ako ihlicovito ornamentované konídie *A. caesiellus* (4; 5–6; 9 µm). Hruškovitité vezikulá *A. restrictus* (10–15 µm v priemere) sú porastené fialidami len v apikálnej hemisfére (Pitt et Samson, 1990). Druh je negatívne fototrofný (Welty et Christensen, 1965). Zistené priemery kolónií reprezentatívneho izolátu MD 184 na rôznych kultivačných médiách sú uvedené v Tab. 13. Zistené mikroskopické znaky: priemer vezikula 10 (8; 12) µm, šírka konidioforu pod vezikulom 4–5 µm, fialidy dlhé 7–9 µm rastúce na vrchnej časti vezikula, konídie súdkovité a drsné, dlhé 4 a široké 3 µm. Boli pozorované nerovné (pokrútené) a rozdvojené (tvoriace 2 vezikulá) konidiofory, tiež septovanosť stopky konidioforov. Druh produkuje cytotoxín restriktocín (Brandhorst et Kenelay, 1992).

Tab. 12 Izoláty rodu *Aspergillus* zo zrna pšenice a jačmeňa, zberaných v rokoch 2006-2008, bez ohľadu na izolačné médium

rok	2006								2007								2008						spolu 2006-2008			
	osídlenie zrna		vnútro		povrch		zoml. z.		spolu		vnútro		povrch		zoml. z.		spolu		vnútro		povrch				spolu	
taxón	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ
<i>A. candidus s. l.</i>									1	1	1	1			1	2	2	2	4	31 [#]	5	33 [#]	6	35 [#]		
<i>A. clavatus</i>			2	3			2	3			1	3			1	3	2	2	1	1	2	3	5	9		
<i>A. flavus</i>	6	8	2	3	1	1	8	12	9	69	6	6	2	6	12	81	9	587	6	110 [#]	11	697 [#]	31	790 [#]		
<i>A. fumigatus</i>			3	3			3	3	2	4	3	5	3	5	7	14	1	1	2	3	3	4	13	21		
<i>A. cf. melleus</i>									1	1					1	1							1	1		
<i>A. niger</i> komplex	2	2	2	3	1	1	4	6	2	3	2	3			4	6	2	5	2	5	3	10	11	22		
<i>A. ochraceus s. l.</i>			1	1			1	1	1	1	1	1			2	2			1	8	1	8	4	11		
<i>A. parasiticus</i>																	1	1			1	1	1	1		
<i>A. restrictus</i>											1	7			1	7							1	7		
<i>A. sydowii</i>	1	1					1	1	1	1			1	6	2	7			2	2	2	2	5	10		
<i>A. terreus</i>											1	2	1	1	1	3							1	3		
<i>A. tritici</i>	1	1	1	1			2	2	2	8	1	34	2	4	3	46			2	23	2	23	7	71		
<i>A. tubingensis</i>	1	1					1	1	1	1					1	1							2	2		
<i>A. versicolor</i> II. sk.					1	1	1	1			1	1			1	1			1	1	1	1	3	3		
<i>A. versicolor</i> n. sk.			2	3			2	3			3	8	2	3	4	11	1	1	4	6	3	7	9	21		
<i>A. wentii</i>																	2	3			2	3	2	3		
<i>A. westerdijkiae</i>	2	2					2	2	1	1					1	1			1	2	1	2	4	5		
<i>Aspergillus</i> sp.			1	1			1	1	9	34	5	55	2	10	13	99	4	85	8	97 [#]	9	182 [#]	23	282 [#]		
<i>Aspergillus</i>	8	15	10	18	2	3	14	36	16	124	12	126	9	35	24	285	12	678	15	288[#]	16	966	54	1287		

zoml. z.- zomleté zrno; + pozitívne vzorky; Σ súčet izolátov; A.- *Aspergillus*; s. l.- *sensu lato*; cf.- *cōnfer*; sk.- skupina; n.- neurčená; sp.- *speciēs*;

[#]počet nie je úplný

Tab. 13 Priemer kolónií *A. restrictus* MD 184 na 8. deň kultivácie

teplota	25 °C	30 °C	37 °C
kultivačné médium	priemer kolónií [mm]		
CY20S	16	11, 11, 14	0
CY40S	16, 17	12, 14	0
CYAS	10, 10, 12	5, 9, 10	0
CYA20S	7, 8, 8	9, 9, 11	0
CZ	5, 6, 6		
CYA	8, 12		0
MEA	7, 8, 8		
YES	6, 7, 8		
OA	6, 7, 7		

CYA- Czapkov agar s kvasničným extraktom; CY20S- Czapkov agar s kvasničným extraktom a 20 % sacharózy; MEA- agar so sladínovým extraktom (Klich, 2002); CY40S- CY20S modifikovaný navýšením sacharózy na 40 %; CYAS- Czapkov agar s kvasničným extraktom a 5 % NaCl (Frisvad et Samson, 2004); CYAS20- CYAS modifikovaný navýšením NaCl na 20 %; CZ- Czapkov agar (s prídavkom roztoku stopových prvkov); OA- agar s extraktom z ovsených vločiek; YES- agar s kvasničným extraktom a sacharózou (Samson et al., 2002a)

Podrod *Fumigati*

Sekcia *Fumigati*- v 73 analyzovaných vzorkách zrna obilnín bolo v 13 vzorkách zrna pšenice zaznamenaných spolu 21 anamorfných izolátov, morfológicky zaradených do druhu *A. fumigatus* Fresen. (Tab. 12).

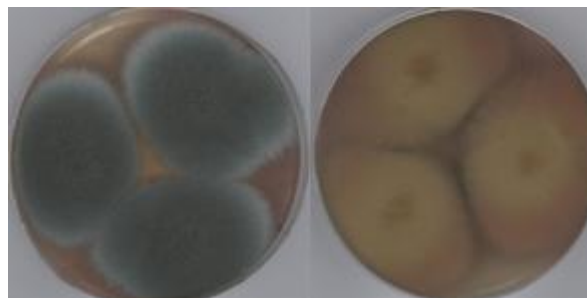
Aspergillus fumigatus

Po roku 1993 boli popísané a uznané za platné štyri podobné druhy: *A. fumisynnematus* (1993), *A. fumigatiaffinis*, *A. lentulus*, *A. novofumigatus* (2005). Ich makro- a mikro- morfológické charakteristiky sa navzájom prekrývajú a svetelnou mikroskopiou je náročné ich odlíšiť (Samson et al., 2007a). Z izolátov aspergilov, uchovávaných v zbierke, bolo vybraných celkovo 9 reprezentatívnych, pochádzajúcich zo 6 rôznych vzoriek (Tab. 14) a tie boli morfológicky a fyziologicky študované podľa Samson et al. (2007a). Mikromorfológia bola sledovaná na 7. deň kultivácie na MEA. Izoláty hojne vytvárali tmavozelené konidiofory s hruškovitým vezikulom, uniseriálne porasteným fialidami v horných dvoch tretinách plochy. Konídie boli drobné, guľovité (pri niektorých izolátoch okrem nich aj elipsovité), ornamentované dobre pozorovateľnými ostňami. Mikrometrické charakteristiky sú uvedené v Tab. 14.

Tab. 14 Fyziologické a morfológické charakteristiky izolátov druhu *Aspergillus fumigatus* zo zrna pšenice slovenského pôvodu

MD	fyziológia				mikromorfológia [µm]			
	CYA 10 °C	CYA 50 °C	CREA		konídie	priemer vezikula	fialidy	šírka konidioforu pod vezikulom
			rast	produkcia kyselín				
28	-	+	slabý	slabá	2 (2; 3) x 3 (2; 3)	17 (10; 29)		
56	-	+	slabý	žiadna	3 (2; 3); 2 (2; 3) x 3 (3; 4)	22 (18; 25)	6 (5; 7)	5 (4; 7)
57	-	+	slabý	žiadna	3 (2; 3)	20 (18; 24)	5 (4; 7)	6 (4; 8)
153	-	+	slabý	žiadna	2 (2; 3)	21 (17; 27)	6 (5; 7)	6 (4; 6)
162	-	+	slabý	žiadna	3 (2; 3)	20 (16; 31)		
233	-	+	slabý	slabá	2 (2; 3); 2 x 3	19 (15; 24)	6 (5; 7)	5 (4; 6)
366	-	+	slabý	slabá	3 (2; 3)	16 (11; 25)	6 (5; 7)	6 (4; 7)
408	-	+	slabý	slabá	2 (2; 3) x 3 (2; 3)	17 (13; 20)		
466	-	+	slabý	slabá	3 (2; 3)	19 (15; 25)	7 (6; 7)	7 (5; 12)

MD 28- vzorka 19/ 2007, povrch zrna; MD 56, MD 57- vz. 17/ 2006, povrch zrna; MD 153- vz. 7/ 2007, povrch zrna; MD 162- vz. 15/ 2007, povrch zrna; MD 233, 408- vz. 30/ 2007, vnútro; MD 366- vz. 30/ 2007, zomleté zrno; MD 466- vz. 5/ 2008, povrch zrna; CYA- Czapkov agar s kvasničným extraktom (Klich, 2002); CREA- agar s kreatínom a sacharózou (Samson et al., 2002a); - absencia rastu; + zaznamenaný rast



Obr. 13 Purpurový pigment kultúry *Aspergillus fumigatus* MD 233 (CYA, 25 °C, 7 dní)

MD 233- vzorka 30/ 2007, vnútro zrna; CYA, 25, 7d- kultivácia na Czapkovom agare s kvasničným extraktom (Klich, 2002)

Všetky izoláty rástli a sporulovali veľmi dobre na CYA, CZ, MEA, YES, OA pri teplotách 25 a 37 °C. Kolónie boli matné, tmavozelené až tyrkysové, na povrchu s jemnou vrstvou sivých hýf. Biely sterilný lem bol dobre viditeľný na YES. Tvorba hnedočerveného pigmentu (Obr. 13) bola pozorovaná pri všetkých izolátoch s výnimkou MD 56 a výrazná bola najmä na CYA 37, CZ a CYA. Rast na CREA bol slabý, pavučinový a pri 5 izolátoch bola pozorovaná slabá produkcia kyselín. Žiaden z izolátov nerástol pri 10 °C (prítomnosť inokula bola potvrdená následnou inkubáciou pri laboratórnej teplote) a všetky rástli pri 50 °C (Tab. 14).

Tab. 15 Extrolity produkované slovenskými izolátmi *Aspergillus fumigatus*

metóda	extrolit:	izolát:	MD 56	MD 408	MD 233	MD 366
HPLC-DAD	3-o-metyl-súlochrín		+	+	+	+
	cf. fischerín					+
	fumagilín		+ _t	+	+	
	fumigaklavín		+			
	fumigaklavín C			+	+	+
	fumigatín A			+	+	+
	fumiquinazolín					+
	fumiquinazolín A		+	+	+	
	fumitremorgín A			+	+	+
	fumitremorgín A/ verukulogén		+			
	fumitremorgín B			+		+
	kyselina helvolová		+	+	+	+
	pseurotín A		+	+	+	
	TR-2/ fumitremorgín C		+	+		+
	trypacidín		+	+	+	+
verukulogén?			+			

HPLC-DAD- vysokotlaková kvapalinová chromatografia s detekciou sústavou diód (Frisvad et Thrane, 1987, s minoritnými modifikáciami podľa Smedsgaard, 1997); + výsledok skríningu pozitívny; ^{MD 56} vzorka 17/ 2006, povrch zrna; ^{MD 408, MD 233} vz. 30/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 366} vz. 30/ 2007, zomleté zrno; _t stopy

Veľkosť kolónií varírovala od 1 do 5 cm a farebnosť od krémovej po svetlú olivovo zelenú. Prítomnosť len cieľového inokula bola overená mikroskopicky. Všetky zistené charakteristiky izolátov sú v súlade s druhom *A. fumigatus sensu* Samson et al. (2007a). Výnimkou je ornamentika konídií- nami pozorovaná ostnitá vs. hladká až mierne zdrsená. Niektoré charakteristiky sa prekrývajú s popisom vyššie vymenovaných podobných druhov. Pomocným znakom pre identifikáciu 5 izolátov bola zistená slabá

produkcia kyselín na CREA; produkcie kyselín sú schopné len *A. fumigatus* (slabo) a *A. fumigati* (dobro). Určujúcim znakom, vedúcim k diagnostikácii druhu *A. fumigatus* Fres., bola schopnosť izolátov rásť pri teplote 50 °C a neschopnosť rásť pri 10 °C (Tab. 14). Ostatné uvedené druhy sú naopak schopné rásť pri 10 °C a neschopné rásť pri 50 °C. Pri 4 izolátoch bol analyzovaný metabolický profil (Tab. 15). Nájdené aristolity fumagilín, fumitremorgíny, trypacidín, pseurotín A, 3-o-metyl-súlochrín a fumiquinazolíny sú typické pre *A. fumigatus* a 4 podobné druhy ich neprodujú. Posledné dva uvedené metabolity sú v sekcii *Fumigati* produkované len druhom *A. fumigatus*. Fischerín a TR-2 toxín produkuje v sekcii *Fumigati* *Neosartorya fischeri* a fumigatíny *N. ferenczii* (Samson et al., 2007a). Produkcia mykotoxínu gliotoxínu nebola zistená pravdepodobne v dôsledku použitia nevhodných kultivačných podmienok (Pena et al., 2009). Fumigatín A je pigment, jeho farba sa v alkalickom prostredí mení zo žltohnedej na výrazne purpurovú (Hanson, 2008). Ako je spomenuté vyššie, purpurová pigmentácia (Obr. 13) bola pozorovaná pri kultiváciách všetkých izolátov okrem MD 56.

Sekcia *Clavati*- v 73 analyzovaných vzorkách zrna obilnín bolo v 5 vzorkách zrna pšenice zaznamenaných spolu 9 anamorfných izolátov, morfológicky zaradených do druhu *A. clavatus* Desm. (Tab. 12).

Aspergillus clavatus

Spolu tri izoláty (Tab. 47) boli určené do druhu podľa pozorovaných morfológických znakov. Reprezentatívne izoláty zvyšných 4 pozitívnych vzoriek boli popri morfológii skríňované TLC metódou na *in vitro* produkciu patulínu (Tab. 16).

Tab. 16 Extrolity slovenských izolátov *Aspergillus clavatus*

metóda	extrolit	izolát	MD 21	MD 47	MD 407	ZB 62
TLC	patulín		-	+	+	+
HPLC-DAD	kotanín			+	+	
	LN			+		
	LN 2			+		
	orlandín			+	+	
	siderín			+	+	
	tryptoquivalíny			+	+	
	tryptoquivalón A			+		

TLC- tenkovrstvová chromatografia (Samson et al., 2002b, s modifikáciou podľa Labuda et Tančinová, 2006); HPLC-DAD- vysokotlaková kvapalinová chromatografia s detekciou sústavou diód (Frisvad et Thrane, 1987, s minoritnými modifikáciami podľa

(pokračovanie Tab. 16) Smedsgaard, 1997); - negatívny výsledok; + pozitívny výsledok; ^{MD 21}vzorka 13/ 2006, povrch zrna; ^{MD 47}vz. 17/ 2006, povrch zrna; ^{MD 407}vz. 1/ 2008, povrch zrna; ^{ZB 62}vz. 2/ 2008, vnútro zrna

Pri singulárnom izoláte (Tab. 37) produkcia nebola potvrdená. Negatívny výsledok v tomto prípade môže poukazovať na dve možné reality: a) izolát je neproduktívny, čo indikuje diagnózu *A. clavatonanicus*, podobného druhu *A. clavatus*; b) potenciál izolátu produkovať patulín je pod hranicou detegovateľnosti použitej metódy. Reprezentatívne izoláty vzoriek 2/ 2008, 17/ 2006 a 1/ 2008 produkovali patulín. Mykotoxín okrem *A. clavatus* produkujú v sekcii *Clavati* *A. giganteus* a *A. longivesica*. Ako je naznačené v ich pomenovaní, od *A. clavatus* sa líšia mohutnejšími rozmermi fertilyých hýf (Varga et al., 2007a). Metabolický profil reprezentatívnych izolátov z dvoch posledných uvedených vzoriek bol doplnený HPLC-DAD analýzou (Tab. 16). Bola detegovaná produkcia kotanínov, ktoré spolu s patulínom tvoria jedinečnú kombináciu pre druh *A. clavatus* (Varga et al., 2007a).

Podrod *Circumdati*

Sekcia *Circumdati*- v 73 analyzovaných vzorkách zrna obilnín bolo v 7 vzorkách zrna pšenice a singulárnej vzorke jačmeňa siateho zaznamenaných spolu 17 anamorfných izolátov, zaradených do druhov (v poradí podľa frekvencie výskytu; Tab. 5, Tab. 12):

- ❖ *Aspergillus ochraceus sensu lato*; *Aspergillus westerdijkiae* Frisvad & Samson,
- ❖ *Aspergillus cf. melleus* Yukawa. Výskyt teleomorfných druhov nebol zaznamenaný.

Aspergillus westerdijkiae

Druh bol popísaný v roku 2004. Morfológicky je podobný blízko príbuznému druhu *A. ochraceus*, hoci nie je schopný rásť pri teplote 37 °C. Odlišujúcimi znakmi sú skleróciá: *A. westerdijkiae* tvorí biele až krémové a *A. ochraceus* ružové až vínovočervené, purpurové (Frisvad et al., 2004a). Zo skúmaných kmeňov (Tab. 17, Tab. 18,) sa makromorfologickými charakteristikami druhej diagnóze približuje MD 370. MD 299 morfológicky pripomína *A. ostianus*. Produkuje výrazný pigment, čo je v rozpore s diagnózou *A. westerdijkiae*. V porovnaní s ostatnými kmeňmi má výrazne menšie vezikulum (veľkosť spadá do spodnej hranice diagnózy *A. westerdijkiae*) a konídie rôzneho tvaru, čo je v sekcii *Circumdati* typické pre *A. ostianus* (Klich, 2002). MD 2, 18 a 370 tvorili ružové skleróciá, ktoré sa neskôr vyfarbili do purpurova, čo je typické pre *A. ochraceus* (Frisvad et al., 2004a). MD 299 tvoril biele skleróciá. Pri

všetkých uvedených kmeňoch absentoval rast pri teplote 37 °C. Nezvyčajná kombinácia uvedených znakov kmeňmi MD 2, 18 a 370 môže indikovať kmene prechodné medzi *A. ochraceus* a *A. westerdijkiae*. HPLC-DAD analýzou bola zistená produkcia metabolitu NB1 kmeňmi MD 2, 299 a 370 (Tab. 19), čo indikuje druh *A. westerdijkiae* (Frisvad et al., 2004a, Frisvad, osobná komunikácia). MD 18 nebol skrínovaný na produkciu NB1, preto je zaradený ako *A. ochraceus sensu lato*. TLC metódou bola zistená produkcia ochratoxínu A pri predĺžení kultivačnej doby zo štandardnej 7 (14) na 29 dní. Ako je uvedené vyššie, podľa Frisvad et al. (2004a) je *A. westerdijkiae* konštantným producentom veľkých koncentrácií ochratoxínu. Pri kmeni MD 299 nebol ochratoxín A TLC metódou detegovaný ani po predĺženej kultivácii na médiu YES. V pozícii vizualizácie ochratoxínu A sa vizualizoval tmavý, červenohnedý pigment. HPLC-DAD analýzou nebola zistená produkcia ochratoxínov pri žiadnom testovanom kmeni, pretože na skrínung bolo použité nevhodné médium CYAS. Ak by sa potvrdila neschopnosť kmeňa MD 299 produkovať ochratoxíny, kmeň by mohol byť využitý na veľkoprodukciiu aspergamidov. Aby sa však vylúčila potencia izolátu, patriaceho do sekcie *Circumdati*, produkovať ochratoxín, je potrebné použiť viacero rastových podmienok a kultivačných médií (Frisvad et al., 2004a).

Aspergillus cf. melleus

Kmeň MD 390 pri prvotnej izolácii tvoril čierne skleróciá. Bol považovaný za bielu mutáciu *A. flavus*, ktorý sa početne vyskytoval vo vzorke (Tab. 74) a bol izolovaný aj z rovnakého zrna ako MD 390. Pri ďalších kultiváciách sa však tento znak neprejavil. Čierne skleróciá v sekcii *Circumdati* vytvára len *A. robustus*, ktorý je v mnohých aspektoch odlišný od ostatných druhov sekcie a vykazuje tiež pozitívny fototrofizmus. Netvorí ochratoxín A (Frisvad et al., 2004a), čo je v rozpore s výsledkom TLC (Tab. 19). Izolát bol podľa morfológie a fyziológie na odporúčanie prof. Frisvada predbežne označený ako *A. cf. melleus*.

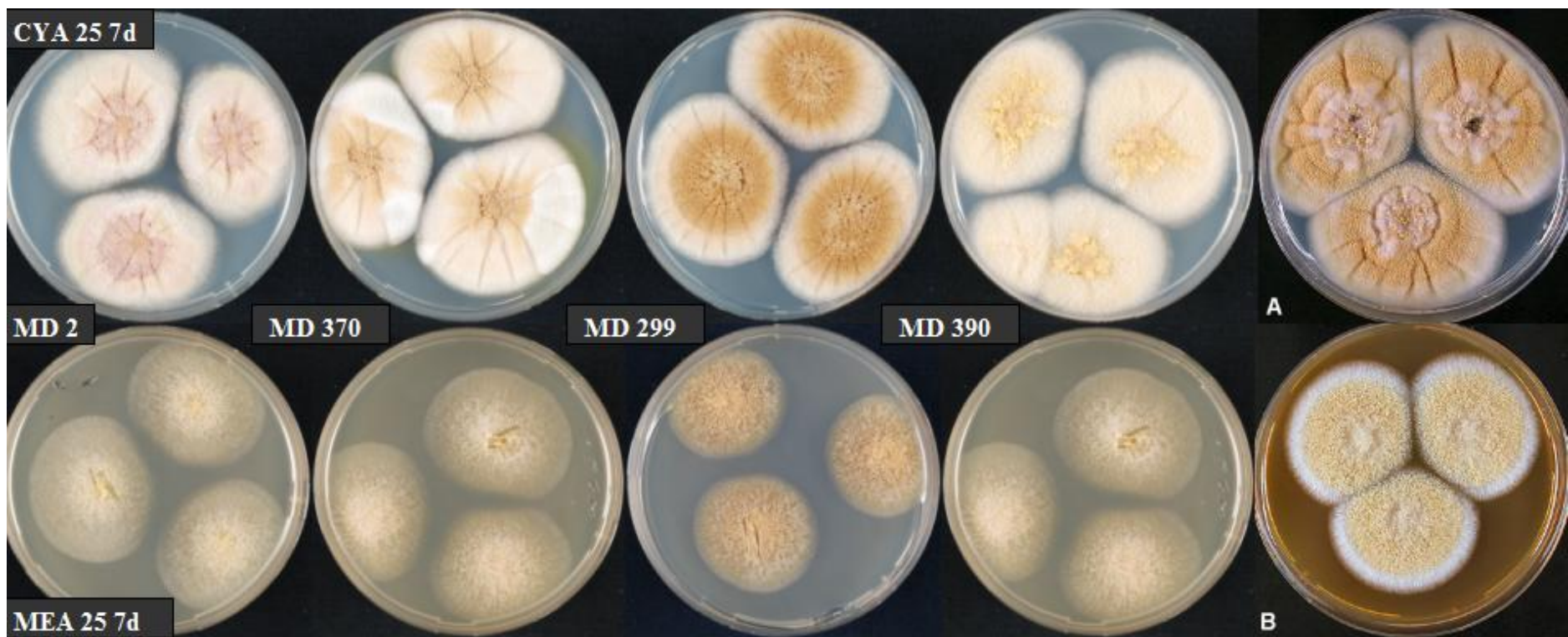
Aspergillus ochraceus sensu lato

Časť izolátov zo sekcie bola pri izolácii morfológicky určená ako *A. ochraceus*. Ako uvádzajú Frisvad et al. (2004a), druhy *A. ochraceus* a *A. westerdijkiae* sú blízko príbuzné a v rôznych štúdiách boli často identifikované ako *A. ochraceus*; viacero publikácií sa týkalo druhu *A. westerdijkiae* a nie *A. ochraceus sensu stricto*. Napr. aj prvý kmeň so zistenou produkciou ochratoxínu A bol neskôr reidentifikovaný ako *A. westerdijkiae*. S ohľadom na možné riziko nepresnej identifikácie sú izoláty, pri ktorých nebola urobená HPLC-DAD analýza, uvedené ako *A. ochraceus sensu lato*.

Tab. 17 Fyziológia a makromorfológia izolátov sekcie *Circumdati* zo slovenskej pšenice

izolát	CYA25	MEA25	YES25	CYA37	CREA25		farba kolónie ^{CYA25}		exsudát	skleróciá
	priemer kolónie, maximálna nameraná hodnota [mm]				rast	tvorba kyselín	obverz	reverz		
<i>A. westerdijkiae</i> MD 2	50	51	62	0	veľmi slabý	-	svetloružový, c. ružovofialový	tmavobordový, c. svetloružový	bezfarebný	ružové
<i>A. ochraceus s. l.</i> MD 18	50	50	76	0	veľmi slabý	-	svetloružový, c. ružovofialový	tmavobordový, c. svetloružový	bezfarebný	ružové
<i>A. westerdijkiae</i> MD 299	46	49	73	0	veľmi slabý	-	svetloružový, c. okrový až žltohnedý	červenohnedý, ružovohnedý pigment	červenohnedý	biele
<i>A. westerdijkiae</i> MD 370	46	63	63	0	veľmi slabý	-	svetloružový, c. okrový	tmavobordový, c. svetloružový	svetložltý	ružové
<i>A. cf. melleus</i> MD 390	41	41	65	22	veľmi slabý	-	svetlo krémový, c. žltý	svetlý zlatistý	zlatožltý	(čierne?)
<i>A. westerdijkiae</i> CBS*	57	47		0			jasný alebo svetlo žltý	krémovo hnedý, bez pigmentu		svetložlté, neskôr svetlooranžové

A.- *Aspergillus*; *s. l.*- *sensu lato*; ^{MD 2}vzorka 22/ 2006, vnútro zrna; ^{MD 18}vz. 16/ 2006, vnútro zrna; ^{MD 299}vz. 25/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 370}vz. 1/ 2008, povrch zrna; ^{MD 390}vz. 30/ 2007, vnútro zrna; ^{CBS*}*A. westerdijkiae* CBS 112803 (Frisvad et al., 2004a); ^{CYA25}Czapkov agar z kvasničným extraktom (Klich, 2002), kultivácia pri teplote 25 °C; ^{MEA25}agar so sladínovým extraktom (Klich, 2002), kultivácia pri teplote 25 °C; ^{YES25}agar s kvasničným extraktom a sacharózou (Samson et al., 2002a), kultivácia pri teplote 25 °C; ^{CYA37}Czapkov agar z kvasničným extraktom (Klich, 2002), kultivácia pri teplote 37 °C; ^{CREA25}agar s kreatínom a sacharózou (Samson et al., 2002a), kultivácia pri teplote 25 °C; c.- centrálne



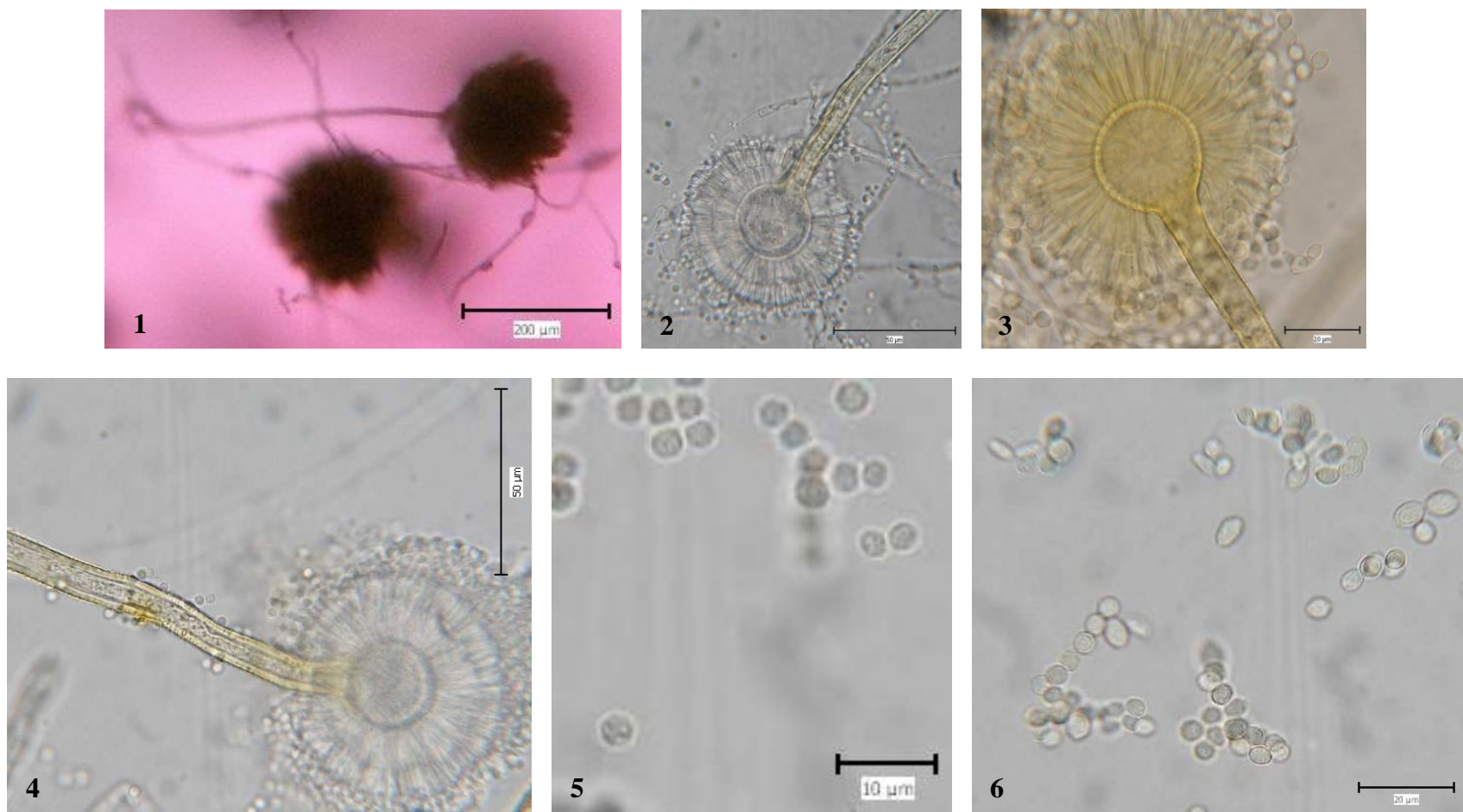
Obr. 14 Vzhľad kolónií slovenských izolátov druhov sekcie *Circumdati* v porovnaní s typovým kmeňom druhu *Aspergillus westerdijkiae*

CYA 25 7d- Czapek agar s kvasničným extraktom, kultivácia pri teplote 25 °C, 7 dní; MEA 25 7d- agar so sladínovým extraktom (BioCentrum DTU), kultivácia pri teplote 25 °C, 7 dní; MD 2- *Aspergillus westerdijkiae*, vzorka 22/ 2006, vnútro zrna; MD 370- *A. westerdijkiae*, vz. 1/ 2008, povrch zrna; MD 299- *A. westerdijkiae*, vz. 25/ 2007, vnútro zrna; MD 390- *A. cf. melleus*, vz. 30/ 2007, vnútro zrna; A, B- *A. westerdijkiae* CBS 112803 (Frisvad et al., 2004a)

Tab. 18 Mikromorfológia izolátov sekcie *Circumdati* zo slovenskej pšenice, MEA 25 7d

izolát	veľkosť [µm]		vzhľad				
	konídie	vezikulum	vezikulum	metuly	konídie	stopka konidioforu	hlavica
<i>A. westerdijkiae</i> MD 2	3 (2; 3) x 3 (3; 4)	šírka: 32 (25; 44)	guľovité, hemisférické	drsne	guľovité, (elipsovité), drsné	drsna, žltohnedá	lúčovitá, hnedoružová
<i>A. ochraceus</i> s. l. MD 18	3 x 3 (3; 4)	šírka: 31 (18; 46)	guľovité, (hemisférické)	drsne	guľovité, (takmer guľovité), drsné	drsna, žltohnedá	lúčovitá, hnedoružová
<i>A. westerdijkiae</i> MD 299	4 (3; 5) x 5 (4; 7)	dĺžka: 18 (14; 29) šírka: 18 (12; 28)	guľovité	drsne	rôzne: vajcovité, elipsovité, guľovité, drsné	výrazne drsná, (žlt)hnedá	lúčovitá, výrazne žltohnedá
<i>A. westerdijkiae</i> MD 370	3 (3; 4) x 3 (3; 4)	šírka: 30 (22; 36)	hemisférické, (lopatovité), guľovité	drsne	guľovité, drsné	drsna, žltohnedá	lúčovitá, hnedoružová
<i>A. cf. melleus</i> MD 390	3 x 3 (3; 4)	dĺžka: 27 (31; 31) šírka: 29 (25; 33)	hemisférické, (lopatovité), guľovité		guľovité, hladké	drsna, svetložltá	lúčovitá, hnedoružová
<i>A. westerdijkiae</i> CBS*	2,5-3 (2,3; 3,1) x 2,3-2,8 (2,2; 3,1)	(16) 20-35 (42)	guľovité až lopatovité		prevažne guľovité, zdrsnené	drsna, bezfarebná až žltá	

MEA 25 7d- agar so sladínovým extraktom (Klich, 2002), kultivácia pri teplote 25 °C, 7 dní; *A.*- *Aspergillus*; *s. l.*- *sensu lato*; ^{MD 2}vzorka 22/ 2006, vnútro zrna; ^{MD 18}vz. 16/ 2006, vnútro zrna; ^{MD 299}vz. 25/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 370}vz. 1/ 2008, povrch zrna; ^{MD 390}vz. 30/ 2007, vnútro zrna; ^{CBS*}*A. westerdijkiae* CBS 112803 (Frisvad et al., 2004a)



Obr. 15 Mikromorfológia izolátov *Aspergillus westerdijkiae* zo slovenskej pšenice

1- konidiofory *in situ* MD 370; konidiálna hlavica: 2- MD 18, 3- MD 299; 4- drsnosť stopky konidioforu MD 2; 5- guľovité drsné konídie MD 370; 6- drsné konídie rôznych tvarov MD 299

Tab. 19 Extrolity produkované izolátmi sekcie *Circumdati*

metóda	extrolit	<i>A. westerdijkiae</i>			<i>A. melleus</i>	<i>A. ochraceus s. l.</i>	
		MD 2	MD 299	MD 370	MD 390	MD 18	MD 158
TLC	ochratoxín A	+	-	+	+	+	-
HPLC-DAD	aspergamidy	+	+	+	+		
	aspergamid A	+	+	+	+		
	cirkumdatín A	+	+	+			
	cirkumdatín C	+	+	+			
	4-hydroxymeleín				+		
	kyselina penicilová	+					
	NB1	+	+	+			
	viomeleín	+	+	+			
	vioxantín		+				
xantomegnín	+		+				

TLC- tenkovrstvová chromatografia (Samson et al., 2002b, s modifikáciou podľa Labuda et Tančinová, 2006); HPLC-DAD- vysokotlaková kvapalinová chromatografia s detekciou sústavou diód (Frisvad et Thrane, 1987, s minoritnými modifikáciami podľa Smedsgaard, 1997); A.- *Aspergillus*; s. l.- *sensu lato*; - výsledok skrínungu negatívny; + výsledok skrínungu pozitívny; ^{MD 18}vzorka 16/ 2006, vnútro zrna; ^{MD 2}vz. 22/ 2006, vnútro zrna; ^{MD 299}vz. 25/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 370}vz. 1/ 2008, povrch zrna; ^{MD 390}vz. 30/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 158}vz. 8/ 2007, povrch zrna

Sekcia *Candidi*- v 73 analyzovaných vzorkách zrna obilnín bolo v 11 vzorkách zrna pšenice zaznamenaných spolu 106 anamorfných izolátov, morfológicky zaradených do sekcie; 71 izolátov bolo identifikovaných ako *A. tritici* B. S. Mehrotra & M. Basu a 35 izolátov ako *A. candidus sensu lato* (Tab. 12).

Aspergillus tritici

Druh bol ako samostatný platný uznaný v roku 2007. Dovedy bol väčšinou autorov považovaný za synonymum *A. candidus*. Hlavnými diagnostickými znakmi, zároveň odlišujúcimi tieto dva druhy, sú rast na CYA teplote 37 °C (*A. tritici* 7–12 mm/ 7 dní, *A. candidus* 0 mm/ 7 dní) a krémové resp. viac žltkasté kolónie a septovaná stopka konidioforu *A. tritici* (Varga et al., 2007b). Pre potvrdenie, resp. vyvrátenie diagnózy bolo spolu 8 reprezentatívnych kmeňov zo 6 vzoriek zrna pšenice morfológicky a fyziologicky študovaných v súlade s citovanou publikáciou. Výsledky sú zaznamenané v Tab. 20 a Tab. 21. Pri izoláte MD 52 boli pozorované hemisférické vezikulá a zdrsnená stopku konidioforu; pri izoláte MD 230 hemisférické aj predĺžené

vezikulá a prevažne uniseriátne konidiálne hlavice. Izoláty MD 230 a MD 496 tvorili svetlo ružové, neskôr tmavnúce skleróciá. Septovanie stopky konidioforov bolo dobre viditeľné na CYA a tiež priamo v Petriho miske pri menšej magnifikácii.

Tab. 20 Mikrometrické charakteristiky izolátov druhu *Aspergillus tritici* zo slovenskej pšenice v porovnaní s charakteristikami typového kmeňa

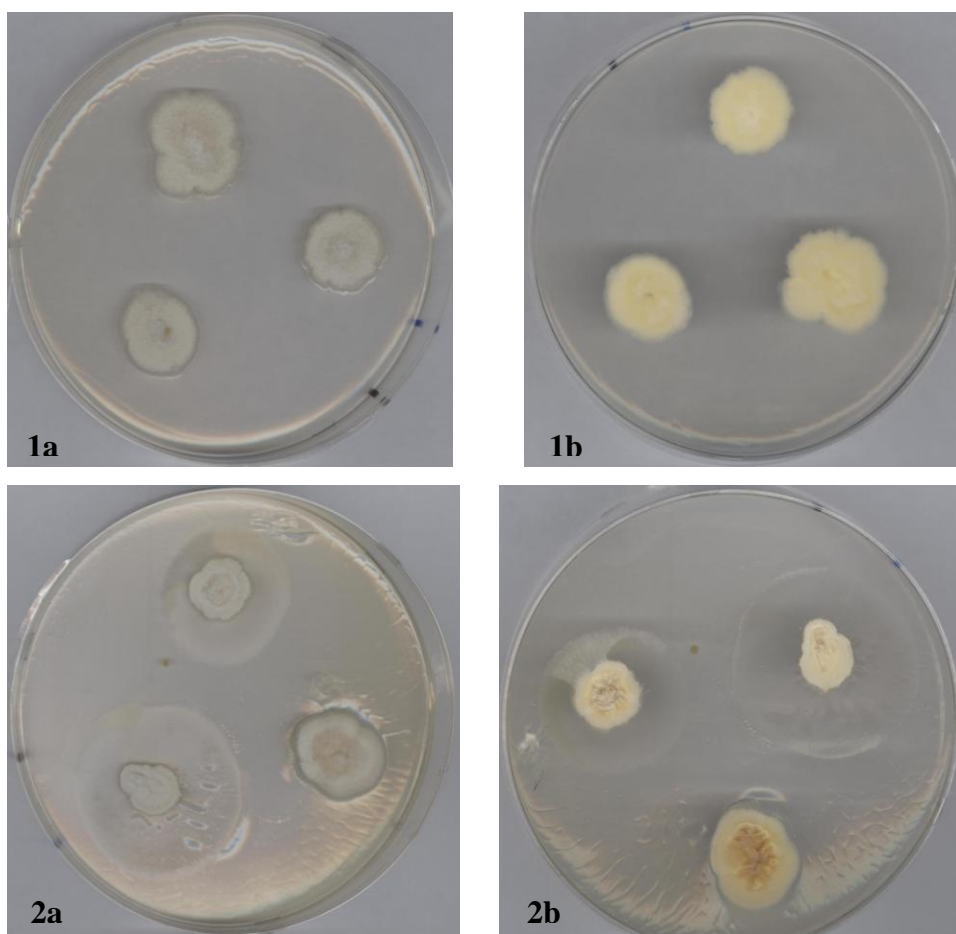
MD	konídie	vezikulum dĺžka x šírka	šírka konidioforu pod vezikulom
	[µm]		
⁶	3 (3; 4); 3 x 4	22 (12; 28) x 19 (11; 25)	6 (4; 7)
⁵²	3 (2; 3)	šírka: 22 (20; 26)	6 (6; 7)
²³⁰	3 (2; 4)	24 (20; 25) x 23 (19; 26)	8 (6; 10)
²⁶⁶	3 (3; 4); 2 x 3	20 (13; 25) x 18 (12; 25)	5 (2; 7)
³⁷¹	3 (2; 3)	23 (21; 25) x 22 (20; 24)	8 (7; 9)
³⁷²	3 (2; 3)	25 (21; 35) x 23 (20; 32)	7 (6; 9)
³⁷⁶	3 (2; 3); 2 x 3	25 (24; 26) x 24 (20; 28)	7 (7; 8)
⁴⁹⁶	3 (2; 3); 2 x 3	26 (21; 30) x 25 (20; 29)	9 (8; 9)
CBS*	2,7-3,5	šírka: 4,8-11	4-8

MD ⁶vzorka 9/ 2006, vnútro zrna; MD ⁵²vz. 17/ 2006, povrch zrna; MD ²³⁰vz. 22/ 2007, vnútro zrna; MD ²⁶⁶vz. 20/ 2007, zomleté zrno; MD ³⁷¹, MD ³⁷²vz. 30/ 2007, vnútro zrna; MD ³⁷⁶vz. 30/ 2007, zomleté zrno; MD ⁴⁹⁶vz. 4/ 2008, povrch zrna; CBS* *Aspergillus tritici* CBS 266.81 (Varga et al., 2007b)

Pri izolátoch MD 6 a MD 371 bolo HPLC-DAD metódou analyzované spektrum tvorených extrolitov. MD 371 produkoval kampestrín A a oba izoláty terfenylín a xantoascín. Terfenylín produkovali v štúdiu Varga et al. (2007b) všetky druhy sekcie *Candidi*. Xantoascín však na médiách CYA a YES produkovali len kmene druhu *Aspergillus candidus* Link. Všetky študované MD izoláty sa od diagnózy *A. tritici* výrazne odlišovali rozmermi vezikula (Tab. 20); v tomto znaku sa prekrývali s popisom druhov *A. campestris* a *A. candidus* (Varga et al., 2007b). Môže teda opäť, podobne ako v prípade izolátov *A. westerdijkiae*, ísť o prechodné kmene medzi druhmi *A. candidus* a *A. tritici*.

Aspergillus candidus sensu lato

Spolu 34 izolátov sekcie *Candidi* zo 6 vzoriek, ktoré neboli kultivované pri diferenciálnej teplote 37 °C, sú uvedené ako *A. candidus sensu lato*.



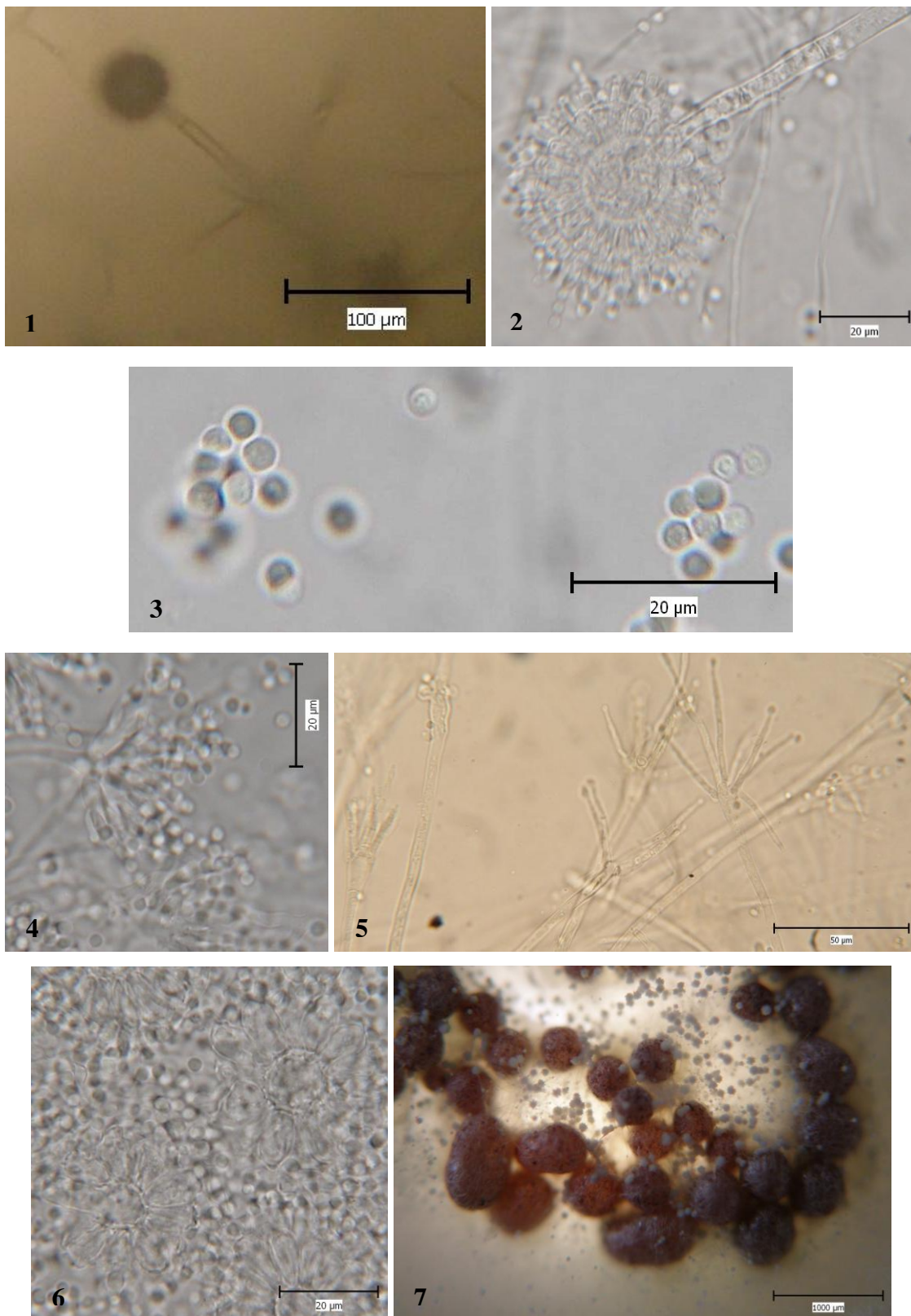
Obr. 16 Kolónie izolátov *Aspergillus tritici* zo slovenskej pšenice

1- MD 372, kultivácia na Czapkovom agare s kvasničným extraktom (CYA; Klich, 2002) v tme, pri teplote 25 °C: a- obverz, b- reverz; 2- MD 372, kultivácia na CYA v tme, pri teplote 25 °C: a- obverz, b- reverz

Tab. 21 Makromorfológia a fyziológia izolátov *Aspergillus tritici* zo slovenskej pšenice v porovnaní s charakteristikami typového kmeňa

MD	CZ25	CYA25	MEA25	YES25	OA25	CYA37	CREA25	farba kolónie ^{CZ25}		
	priemer kolónie (najväčšia nameraná hodnota) [mm]						produkcia kyselín	obverz	reverz	
6	17	24	28	42	24	35	15	veľmi slabá	svetlá krémová	svetložltá
52	15	25	22	39	18	20	17	-	svetlá krémová	pastelovo žltá
230	16	22	23	34	29	20	10	-	svetlá krémová	svetložltá
266	16	22	24	39	24	18	20	veľmi slabá	svetlá krémová	svetložltá
371	12	27	21	32	19	24	16	-	svetlá krémová	svetložltá
372	17	23	22	38	19	28	16	veľmi slabá	svetlá krémová	svetložltá
376	16	14	22	34	20	16	15	-	svetlá krémová	svetložltá
496	17	24	21	31	18	20	15	-	svetlá krémová	svetložltá
CBS*	18-23	16-29	11-17	18-41	13-25	7-21	slabý rast	-	biela až svetlo krémová	svetložltá, neskôr svetlohnedá

^{MD 6}vzorka 9/ 2006, vnútro zrna; ^{MD 52}vz. 17/ 2006, povrch zrna; ^{MD 230}vz. 22/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 266}vz. 20/ 2007, zomleté zrno; ^{MD 371, MD 372}vz. 30/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 376}vz. 30/ 2007, zomleté zrno; ^{MD 496}vz. 4/ 2008, povrch zrna; ^{CBS*}*Aspergillus tritici* CBS 266.81 (Varga et al., 2007b); ^{CZ25}Czapkov agar (Samson et al., 2002a), kultivácia pri teplote 25 °C; ^{CYA25}Czapkov agar z kvasničným extraktom (Klich, 2002), kultivácia pri teplote 25 °C; ^{MEA25}agar so sladínovým extraktom (Klich, 2002), kultivácia pri teplote 25 °C; ^{YES25}agar s kvasničným extraktom a sacharózou (Samson et al., 2002a), kultivácia pri teplote 25 °C; ^{OA25}agar s extraktom z ovsených vločiek (Samson et al., 2002a), kultivácia pri teplote 25 °C; ^{CYA37}Czapkov agar z kvasničným extraktom (Klich, 2002), kultivácia pri teplote 37 °C; ^{CREA25}agar s kreatínom a sacharózou (Samson et al., 2002a), kultivácia pri teplote 25 °C; - absencia sledovaného znaku



Obr. 17 Mikromorfológia izolátov *Aspergillus tritici* zo slovenskej pšenice

1- *in situ* pohľad na konidiofor so septovanou stopkou; 2- konidiálna hlavica; 3- konídie; 4, 5- redukované konidiofory, mierka = 50 μm; 6- veľké metuly niektorých konidiálnych hlavíc, mierka = 20 μm; 7- skleróciá *in situ*, mierka = 1000 μm

Sekcia *Cremeri*- v 73 analyzovaných vzorkách zrna obilnín boli v 2 vzorkách zrna pšenice zaznamenaných 2 zaznamenané 3 anamorfné izoláty morfológicky zaradené do druhu *Aspergillus wentii* Wehmer (Tab. 12).

Aspergillus wentii

Druh pôvodne patril do samostatnej sekcie *Wentii*: konídie žltohnedé alebo olivovo zelené (Klich, 2002). Morfológické a fyziologické charakteristiky izolátu ZB 77 sú uvedené v Tab. 22. Zistená veľkosť konídií bola v porovnaní s diagnózami *sensu* Klich (2002) a Samson et al. (2002a) menšia o 1 až 2 µm. Podobnú charakteristiku slovenských izolátov zistil vo svojich štúdiách aj Labuda (osobná komunikácia). Izolát MD 475 vytváral konídie štandardnej veľkosti. Izoláty ZB 77 (vzorka 3/ 2008, vnútro zrna) a MD 475 (vzorka 6/ 2008, vnútro zrna) boli TLC metódou skrínované na produkciu aflatoxínu B₁, G₁, kyseliny cyklopiazonovej a ZB 77 aj na produkciu ochratoxínu A, sterigmatocystínu a patulínu. Výsledok skríningu bol negatívny, čo je v súlade s literatúrou (Samson et al., 2002b). Frisvad et al. (2004a) uvádza, že produkcia ochratoxínu A druhom, publikovaná Varga et al. (1996), bola dôsledkom nesprávnej identifikácie alebo kontaminácie kmeňov.

Tab. 22 Morfológické a fyziologické charakteristiky *Aspergillus wentii* ZB 77

MAKROMORFOLÓGIA		MIKROMORFOLÓGIA	
priemer kolónie/ 7. deň [mm]		veľkosť [µm]	
CYA 25	31; 31; 31	konídie	3 (2; 4) x 3 (3; 4)
MEA 25	22; 22; 25	vezikulum	28 (21; 48) x 26 (17; 48)
YES 25	34; 40; 56	dĺžka x šírka	
CYA 37	0	vzhľad	
CREA/ 7d		vezikulum	guľovité/ predĺžené
rast	slabý	konídie:	
produkcia kyselín	dobrá	tvar	guľovité
vzhľad kolónie/ CYA 25/ 7. deň		ornamentika	drsne
obverz	biely	stopka konidioforu:	
reverz	žltý	ornamentika	hladká
exsudát	medový	farba	hyalínna
skleróciá	-	hlavica	svetlá žltohnedá

CYA- Czapkov agar s kvasničným extraktom; MEA- agar so sladínovým extraktom (Klich, 2002); YES- agar s kvasničným extraktom a sacharózou; CREA- agar s kreatínom a sacharózou (Samson et al., 2002a); 25- kultivácia pri teplote 25 °C; 37- kultivácia pri teplote 37 °C

Sekcia *Flavi*- v 73 analyzovaných vzorkách zrna obilnín bolo v 31 vzorkách zrna pšenice zaznamenaných spolu viac ako 790 anamorfných izolátov morfológicky zaradených do druhu *Aspergillus flavus* Link a singulárny izolát *Aspergillus parasiticus* Speare (Tab. 12).

Aspergillus flavus

Bol najfrekventovanejším druhom rodu *Aspergillus* a druhým najfrekventovanejším aspergilom (Tab. 5). V práci boli študované izoláty s morfológickými charakteristikami druhu metódou TLC priebežne skrínované na produkciu kyseliny cyklopiazonovej, aflatoxínu B₁ a G₁ (Tab. 23). Aflatoxín G₁ nie je produktom druhu *A. flavus* (Samson et al., 2002a), jeho skrining bol použitý ako diagnostický chemotaxonomický znak na vylúčenie taxónov, ktoré mykotoxín produkujú. Vlastnosti a potencia spolu 17 izolátov: MD 1 (vzorka 15/ 2006, vnútro zrna), MD 10 (vzorka 18/ 2007, vnútro zrna), MD 17 (vzorka 22/ 2006, vnútro zrna), MD 27 (vzorka 19/ 2007, vnútro zrna), MD 29 (vzorka 19/ 2006, vnútro zrna), MD 31 (vzorka 20/ 2006, vnútro zrna), MD 81 (vzorka 6/ 2007, vnútro zrna), MD 161 (vzorka 11/ 2007, povrch zrna), MD 297 (vzorka 25/ 2007, vnútro zrna), MD 312 (vzorka 24/ 2007, vnútro zrna), MD 341 (vzorka 26/ 2007, povrch zrna), MD 381, MD 384, MD 386, MD 388 (vzorka 30/ 2007, vnútro zrna), MD 421 (vzorka 24/ 2007, povrch zrna) a MD 424 (vzorka 29/ 2007, zomleté zrno) boli študované v nadväznosti na publikáciu Giorni et al. (2007). Izoláty boli kultivované na AFPA médiu. Makro- a mikro-morfológické znaky izolátov boli hodnotené po 7 dňoch kultivácie na médiu CZ a konfrontované so Samson et al. (2002a). Tvorba sklerócií bola zaznamenaná po 7 dňoch kultivácie na 5/2 agare. Produkcia kyseliny cyklopiazonovej bola analyzovaná TLC metódou a produkcia aflatoxínov TLC metódou a kultivačnými metódami: fluorescenčnou detekciou na CEA a rýchlou identifikačnou metódou aflatoxín produkujúcich kmeňov parami amoniaku (Kap. 3.3.1.2, Kap. 3.3.1.1). Pri všetkých 17 študovaných izolátoch bola na základe kultivačných, makro- a mikro-morfológických a chemických znakov potvrdená diagnóza druhu *Aspergillus flavus* Link. Farba kolónií na CZ bola trávovo zelená, pri izolátoch MD 81, MD 297, MD 312, MD 384, MD 421 a MD 424 žltá s plochami zelenej. Reverz bol krémovožltý až žltý, pri izolátoch MD 1, MD 10, MD 17 a MD 341 bezfarebný. Vo všetkých izolátoch prevládali biseriálne konidiálne hlavice. Boli pozorované drsné stopky konidioforov; pri MD 81, MD 386 a MD 388 mal určitý podiel konidioforov septovaných stopku. Konídie mali drsnú ornamentiku. Farba mikroštruktúr bola v odtieňoch žltozelenej. Všetky

študované kmene vytvárali na AFPA svetlejší alebo tmavší žltoranžový reverz. Tvorba sklerócií na 5/2 agare nebola pozorovaná, ale s výnimkou MD 312 všetky kmene tvorili skleróciá na médiu CZ. Prítomnosť mladých, menej výrazných sklerócií, bola zisťovaná preparačnou ihlou. Pri 7 zo 16 testovaných kmeňov bola TLC metódou potvrdená *in vitro* produkcia kyseliny cyklopiazonovej; 4 kmene CPA neprodukovali a pri 5 kmeňoch bol výsledok skríningu neistý. Pri žiadnom zo 17 testovaných kmeňov nebola v podmienkach *in vitro* metódou TLC zistená produkcia aflatoxínu B₁. Negatívne boli aj výsledky použitých kultivačných metód (Tab. 23). Tieto výsledky sú v súlade s výsledkami slovenských autorov Tančinová et al. (2007) a Piecková et Jesenská (2001), ktorí pri mykologických vyšetreniach komodít domáceho pôvodu nezaznamenali výskyt aflatoxín produkčných kmeňov z taxonomickej skupiny *Aspergillus* sekcia *Flavi*.

Aspergillus parasiticus

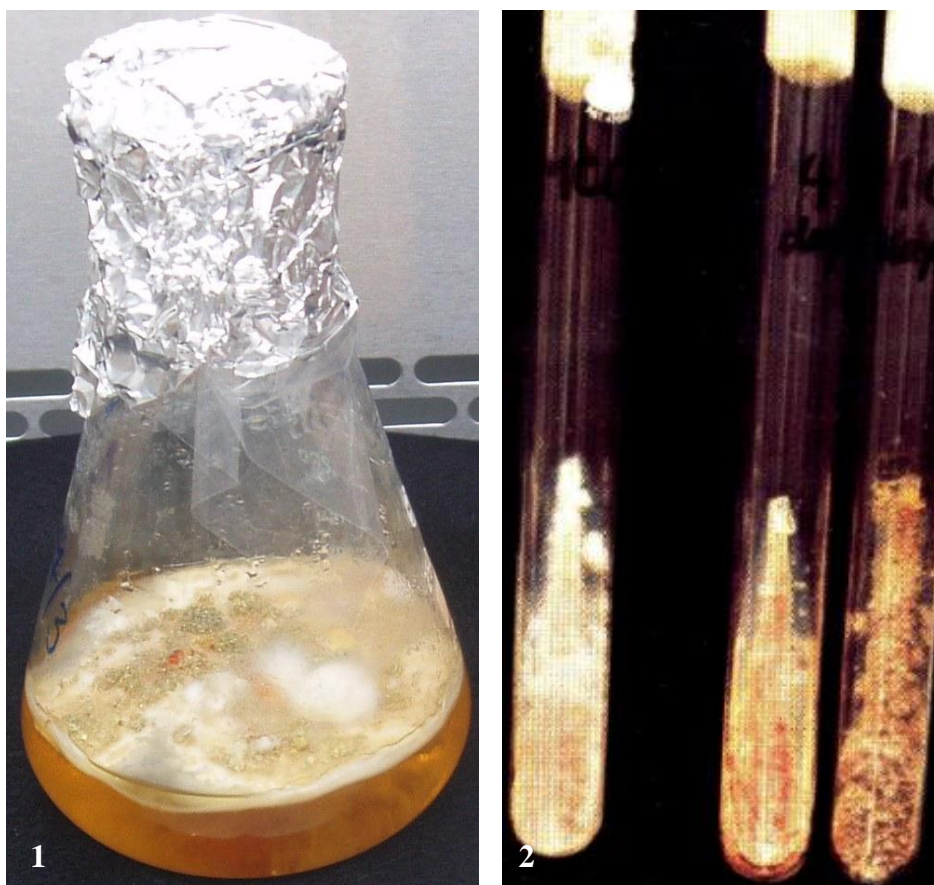
Singulárny izolát bol detegovaný vo vzorke 6/ 2008. TLC metódou bola zistená produkcia aflatoxínov skupiny B a G a zároveň nebola zistená produkcia kyseliny cyklopiazonovej. Zistenú kombináciu metabolitov majú druhy *A. parasiticus*, *A. bombycis*, *A. nomius* (Peterson et al., 2001), *A. arachidicola* (Pildain et al., 2008) a *A. toxicarius* (Frisvad et al., 2006b), ktorý je v Index Fungorum (2010) vedený ako synonymum *A. parasiticus*. Tieto druhy je náročné odlišiť a ľahko môže dôjsť k ich nesprávnej identifikácii (Frisvad et al., 2006b). Keďže izolát dobre rástol pri teplote 42 °C, druh *A. bombycis* bol pri diagnostikovaní vylúčený (Peterson et al., 2001). *A. nomius* (Kurtzman et al., 1987), *A. arachidicola* (Pildain et al., 2008) a *A. toxicarius* (Samson, 1979) tvoria uniseriátne aj biseriátne konidiálne hlavice, *A. parasiticus* prevažne uniseriátne; Klich (2002) uvádza podiel biseriátnych do 20 %. Izolát MD 502 tvoril na MEA pri teplote 25 °C pri niektorých kultiváciách prevahu uniseriátnych, pri niektorých biseriátnych hlavíc. *A. nomius* vytvára nedeterminované, vertikálne predĺžené skleróciá (Kurtzman et al., 1987); v štúdiu Peterson et al. (2001) vytváralo skleróciá 16 z 28 (t. j. 43 %) kmeňov. Pri *A. arachidicola* nebola pozorovaná tvorba sklerócií a v prípade *A. parasiticus* tvoril skleróciá 1 zo 4 kmeňov (Pildain et al., 2008). Druh *A. toxicarius* popísal Murakami (1971). Študoval spolu 6 kmeňov a uvádza, že skleróciá sú zvyčajne tvorené. MD 502 netvoril skleróciá na pevnom, ani tekutom médiu a to ani po niekoľkých týždňoch kultivácie. Autor odčlenil *A. toxicarius* od *A. parasiticus* na základe tvorby prevažne biseriátnych konidiálnych hlavíc a absencie ružového zafarbenia konídií p- anízaldehydom.

Tab. 23 *In vitro* toxinogenita izolátov *Aspergillus flavus* zo zrna pšenice slovenského pôvodu, skrínovaná TLC metódou

izolát	aflatoxín B ₁	aflatoxín G ₁	kyselina cyklopiazonová
1; MD 1; 2; MD 48; MD 20; MD 31; MD 89;	-	-	+
MD 10	-	-	+ ^{**}
MD 398; MD 469; MD 490	-	-	+
MD 27; MD 421; MD 386; MD 388	- [*]	- [*]	+
MD 29; 3; MD 507; MD 506	-	-	±
MD 312; MD 297; MD 424; MD 381; MD 384	- [*]	- [*]	±
MD 30, MD 40; MD 17; 4; MD 59; 5; 6; 7; MD 467; MD 473; MD 505; MD 508; MD 509	-	-	-
MD 81; MD 161; MD 341	- [*]	- [*]	-
MD 82	-	-	-

TLC- tenkovrstvová chromatografia (Samson et al., 2002b, s modifikáciou podľa Labuda et Tančinová, 2006); - výsledok negatívny; + výsledok pozitívny; +^{**} výsledok zhodný s vysokotlakovou kvapalinovou chromatografou s detekciou sústavou diód (Frisvad et Thrane, 1987, s minoritnými modifikáciami podľa Smedsgaard, 1997); -^{*} výsledok zhodný s detekciou parami amoniaku (Saito et Machida, 1999) a fluorescenčnou detekciou na agare s kokosovým extraktom (Davis et al., 1987, Giorni et al., 2007); ± výsledok neistý; ¹vzorka 11/ 2006, vnútro zrna; ^{MD 1, 2}vz. 15/ 2006, vnútro zrna; ^{MD 48}vz. 18/ 2006, zomleté zrno; ^{MD 31}vz. 20/ 2006, vnútro zrna; ^{MD 89}vz. 7/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 10}vz. 18/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 398}vz. 1/ 2008, povrch zrna; ^{MD 469}vz. 11/ 2008, vnútro zrna; ^{MD 490}vz. 12/ 2008, vnútro zrna; ^{MD 27}vz. 19/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 421}vz. 24/ 2007, povrch zrna; ^{MD 386, MD 388}vz. 30/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 29}vzorka 19/ 2006, vnútro zrna; ³vz. 21/ 2006, povrch zrna; ^{MD 507}vz. 13/ 2008, povrch zrna; ^{MD 506}vz. 13/ 2008, vnútro zrna; ^{MD 312}vz. 24/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 297}vz. 25/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 424}vz. 29/ 2007, zomleté zrno; ^{MD 381, MD 384}vz. 30/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 30}vz. 17/ 2006, vnútro zrna; ^{MD 40}vz. 19/ 2006, povrch zrna; ^{MD 17, 4}vz. 22/ 2006, vnútro zrna; ^{MD 59, 5, 6}vz. 1/ 2007, zomleté zrno; ^{MD 7}vz. 4/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 467}vz. 5/ 2008, vnútro zrna; ^{MD 473}vz. 6/ 2008, vnútro zrna; ^{MD 505}vz. 13/ 2008, vnútro zrna; ^{MD 508}vz. 14/ 2008, vnútro zrna; ^{MD 509}vz. 15/ 2008, vnútro zrna; ^{MD 81}vz. 6/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 161}vz. 11/ 2007, povrch zrna; ^{MD 341}vz. 26/ 2007, povrch zrna; ^{MD 82}vz. 6/ 2007, vnútro zrna

Metodika autora bola s opakovaním použitá pri izoláte MD 502. V 1. sérii boli štyri 200 ml Erlenmeyerove banky so 100 ml neautoklávovaného média inokulované približne 2×10^5 konídiami v 1 ml destilovanej vody. Po 2 bankách bolo pozorované oranžové zafarbenie konídií po 2 týždňoch kultivácie, v ďalších 2 na 28. deň kultivácie (Obr. 18).



Obr. 18 *Aspergillus parasiticus* MD 502 na 28. deň kultivácie podľa Murakami (1971) v porovnaní s výsledkom autora metodiky

1- MD 502 s plochami oranžových konídií; 2- výsledky testu ružového zafarbenia konídií podľa Murakami (1971), označené autorom ako pozitívne

Toto zafarbenie sa neskôr vytratilo a konídie nadobudli tmavozelenú farbu, čo je v súlade s Murakami (1971). V kontrolnej 2. sérii boli štyri 200 ml Erlenmeyerove banky s 50 ml autoklávovaného média (p- anízaldehyd bol pridaný po autoklávovaní) inokulované konidiálnou masou, nanesenou bakteriologickým očkom. Kolónie rástli veľmi pomaly a konidiogéza bola slabá. Vytvorené konídie boli tmavozelené. Na základe prvej série bol výsledok hodnotený ako pozitívny a druh *A. toxicarius* bol vylúčený. Na MEA vytváral izolát MD 502 konidiofory s drsnou stopkou a vezikulom porasteným v hornej polovici až po celej ploche. Konídie mali výraznú drsnú

ornamentiku a bola viditeľná vnútorná a vonkajšia stena (Obr. 19). Veľkosť konídií bola 5,2 (4,5; 6) x 4,9 (4,3; 5,4) μm , dĺžka fialíd 9,5 (7,1; 12,4) μm , vezikulum bolo guľovité, široké 37,5 (24,9; 59) a dlhé 34,1 (20,6; 55,1) μm . Tieto znaky sa pri vyššie uvedených druhoch prekrývajú (Murakami, 1971, Kurtzman et al., 1987, Peterson et al., 2001, Klich, 2002, Samson et al., 2002a, Pildain et al., 2008). Farba mycélia bola na CYA, MEA a Cz s p- anízaldehydom tmavozelená a nezhnedla ani po niekoľkých týždňoch kultivácie, čo by mohlo vylúčiť druh *A. nomius*. Pildain et al. (2008) uvádzajú, že kolónie *A. arachidicola* nie sú také tmavé zelené ako kolónie *A. parasiticus*. *A. arachidicola* má negatívnu reakciu na AFPA (Pildain et al., 2008). MD 502 bol na AFPA testovaný s opakovaním, reakcia bola pozitívna, t. j. kolónie vytvárali žltoranžový reverz, čo by malo vylúčiť druh *A. arachidicola*. Reverz kolónií bol na 7. deň kultivácie na CYA žltoranžový až ružový, na CY20S žltý. Na CYA bol pozorovaný bezfarebný exsudát. Tieto charakteristiky sú zhodné s diagnózou *A. parasiticus sensu* Klich (2002). Vzhľad kolónií na viacerých kultivačných médiách je na Obr. 20. Na obrázku je vidieť vplyv rôznej kvality použitých komponentov médií na makromorfológiu; rozdielny vzhľad kolónií na YES bol pravdepodobne spôsobený rôznym stupňom kvality použitého kvasničného extraktu. Priemery kolónií na 7. deň kultivácie v tme: CYA 25 °C 53 mm, CYA 37 °C 55 mm, CYA 42 °C 21 mm, CY20S 25 °C 48 mm, MEA 25 °C 61 mm, YES 25 °C 69 mm. *A. nomius* je z poľnohospodárskych komodít izolovaný len zriedka; často je izolovaný z mŕtveho alebo chorého hmyzu; druhový názov bol odvodený od samotárskej včely šupinatky (*Nomia melanderi*), ktorá žije na presolených pôdach v USA. U nás sa nevyskytuje (<http://www.agroporadenstvo.sk/zv/vcely/vcely01.htm>). Predpokladá sa, že práve hmyz je primárnym habitatom *A. nomius* a zároveň vektorom prenosu na pôdne stanovišťa (Peterson et al., 2001). *A. arachidicola* (6 kmeňov vrátane typového) bol izolovaný v Argentíne z listov okrasného druhu podzemnice (*Arachis glabrata*) a v USA z chorej včely USA (1 kmeň; Pildain et al., 2008). *A. parasiticus* býva izolovaný z potravín (Pitt et Hocking, 2009). V štúdií Pildain et al. (2008) kmene *A. nomius* neprodukovali parazitikolidy. Tieto boli produkované kmeňmi *A. arachidicola* a *A. parasiticus*, ktorých metabolické profily sa líšili len v produkcii chryzogínu, unikátneho v sekcii *Flavi* pre prvý druh a v produkcii paspalinínu a paspalínu niektorými kmeňmi *A. parasiticus*. Tieto extrolity však neboli v zozname detegovateľných použitou metodikou LC- MS/ MS. Izolát MD 502 bol skrínovaný na produkciu mykotoxínov viacerými metódami (Tab. 24) a kvantita produkovaných aflatoxínov bola porovnaná

s tromi aflatoxín produkujúcimi kmeňmi zo zbierky Romer Labs Division Holding, Tulln (Rakúsko; Kap. 3.4.3; Tab. 25). Izolát bol určený ako *A. parasiticus*.

Tab. 24 *In vitro* toxigenita *Aspergillus parasiticus* MD 502, skrínovaná rôznymi metódami

extrolit	TLC	HPLC- DAD	LC-MS/MS
aflatoxín B ₁	+	+	+
aflatoxín B ₂	+	+	+
aflatoxín G ₁			+
aflatoxín G ₂			+
aflatoxín M ₁			+
kyselina cyklopiazonová	-		
kyselina kojová		+	+
ochratoxín A			-
ochratoxín B			-

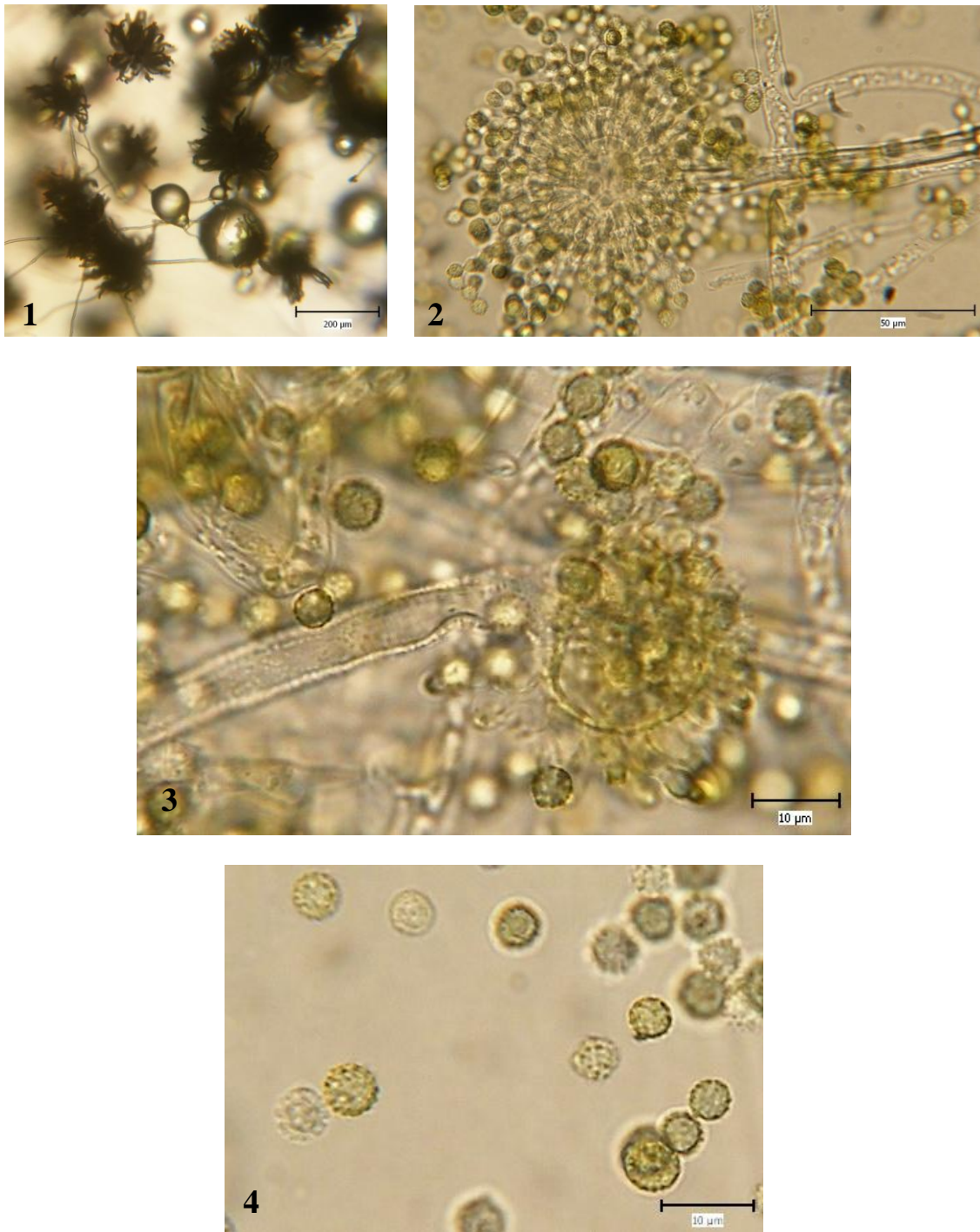
TLC- tenkovrstvová chromatografia (Samson et al., 2002b, s modifikáciou podľa Labuda et Tančinová, 2006); HPLC-DAD- vysokotlaková kvapalinová chromatografia s detekciou sústavou diód (Frisvad et Thrane, 1987, s minoritnými modifikáciami podľa Smedsgaard, 1997); LC-MS/ MS- kvapalinová chromatografia s tandemovou spektrometriou más (Sulyok et al., 2007); - výsledok negatívny; + výsledok pozitívny

Tab. 25 Potencia *Aspergillus parasiticus* MD 502 a porovnávaných kmeňov na modifikovanom AetM médiu, stanovená LC- MS/ MS metódou

kmeň	produkcia mykotoxínu [mg . l ⁻¹]					
	Af B ₁	Af B ₂	Af G ₁	Af G ₂	Af M ₁	KA
<i>A. parasiticus</i> MD 502	15,70 ± 3,25	0,52 ± 0,07	23,40 ± 1,27	0,68	0,18 ± 0,06	227,00 ± 7,07
<i>A. flavus</i> NRRL 3251	18,40 ± 4,67	0,78 ± 0,31	n. d.	n. d.	0,09 ± 0,06	n. d.
<i>A. sekcia Flavi I</i>	15,20 ± 4,24	0,32 ± 0,11	45,65 ± 4,60	1,15 ± 0,24	0,45 ± 0,16	124,50 ± 84,15
<i>A. sekcia Flavi II</i>	12,55 ± 0,92	0,57 ± 0,04	42,05 ± 0,35	2,14 ± 0,08	0,33	152,00 ± 67,88

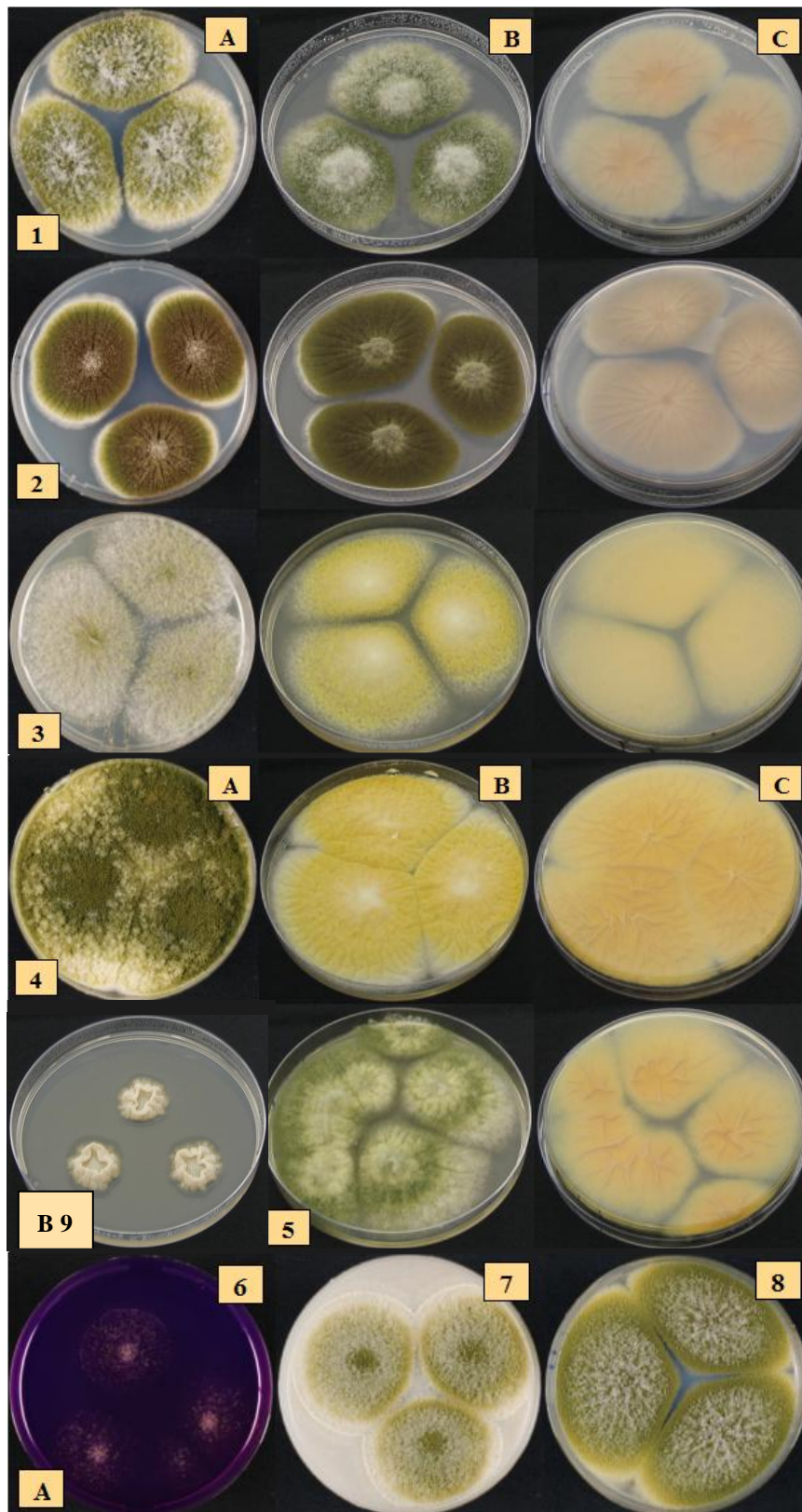
AetM- Adye et Mateles (Johnson et al., 2008); LC-MS/ MS- kvapalinová chromatografia s tandemovou spektrometriou más (Sulyok et al., 2007); Af- aflatoxín; KA- kyselina kojová; n. d.- metabolit nebol detegovaný použitou metódou

Druh je známy producent aflatoxínov a prakticky všetky známe izoláty sú toxínogénne (Frisvad et al., 2006b). Nedávno bola popísaná teleomorfa, heterotalický druh *Petromyces parasiticus* (Horn et al., 2009).



Obr. 19 Mikromorfológia *Aspergillus parasiticus* MD 502

1- konidiálne hlavice in situ; mierka = 200 µm; 2- uniseriálna konidiálna hlavica s drsnou stopkou; mierka = 100 µm; 3- biseriálna konidiálna hlavica; mierka = 50 µm; 4- konídie, niektoré s konektívami; mierka = 10 µm



Obr. 20 *Aspergillus parasiticus* MD 502, 7. deň kultivácie

A- obverz; B a C- obverz a reverz; 1, 2 a 9- Czapekov agar s kvasničným extraktom, kultivácia pri teplote 25, 37 a 42 °C; kultivácia pri teplote 25 °C: 3- agar so sladínovým

(pokračovanie Obr. 15) extraktom; 5- Czapkov agar s kvasničným extraktom a 20 % sacharózy (Klich, 2002); 4- agar s kvasničným extraktom a sacharózou; 6- agar s kreatínom a sacharózou; 7- agar s extraktom z ovsených vločiek (Samson et al., 2002a); 8- Watmanov agar (BioCentrum DTU, Lyngby, Dánsko)

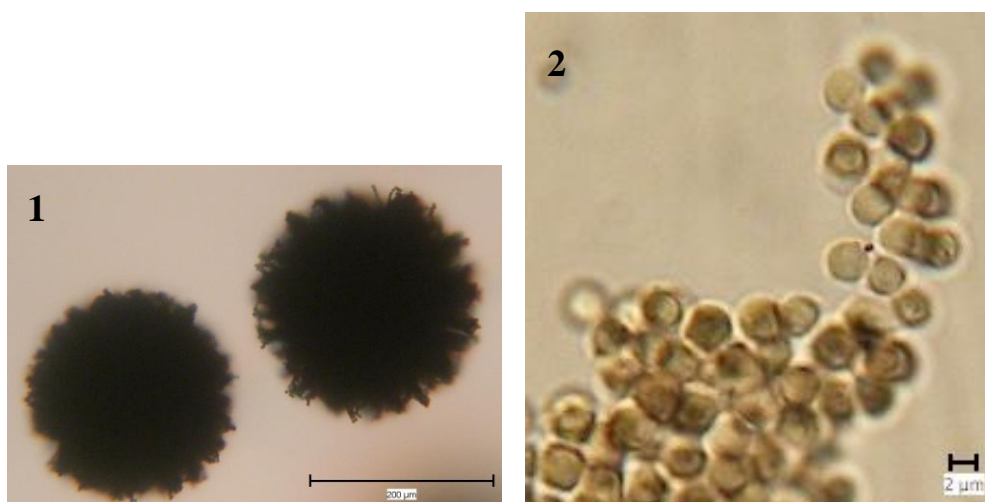
Sekcia *Nigri*- v 73 analyzovaných vzorkách zrna obilnín bolo v 12 vzorkách zrna pšenice zaznamenaných spolu 24 anamorfných izolátov, identifikovaných ako *Aspergillus niger* komplex a *Aspergillus tubingensis* Mosseray (Tab. 12).

***Aspergillus niger* komplex**

Morfologické odlišenie druhov blízkyh *A. niger* je obzvlášť náročné. Na druhej strane, všetky druhy v sekcii *Nigri* môžu byť rozlíšené na základe spektra extrolitov (Samson et al., 2007b). Samson et Varga (2009) odporúčajú v prípade identifikácie, založenej výlučne na morfológii, používať označenie „komplex“, pretože morfológia samotná nepostačuje na rozlíšenie blízko príbuzných druhov. V zmysle uvedeného boli izoláty bez analýzy extrolitov HPLC-DAD metódou zaradené ako „komplex“. Pri niektorých izolátoch bola pozorovaná tvorba bielych sklerócií. *A. niger sensu stricto* skleróciá neprodukuje (Samson et al., 2007b).

Aspergillus tubingensis

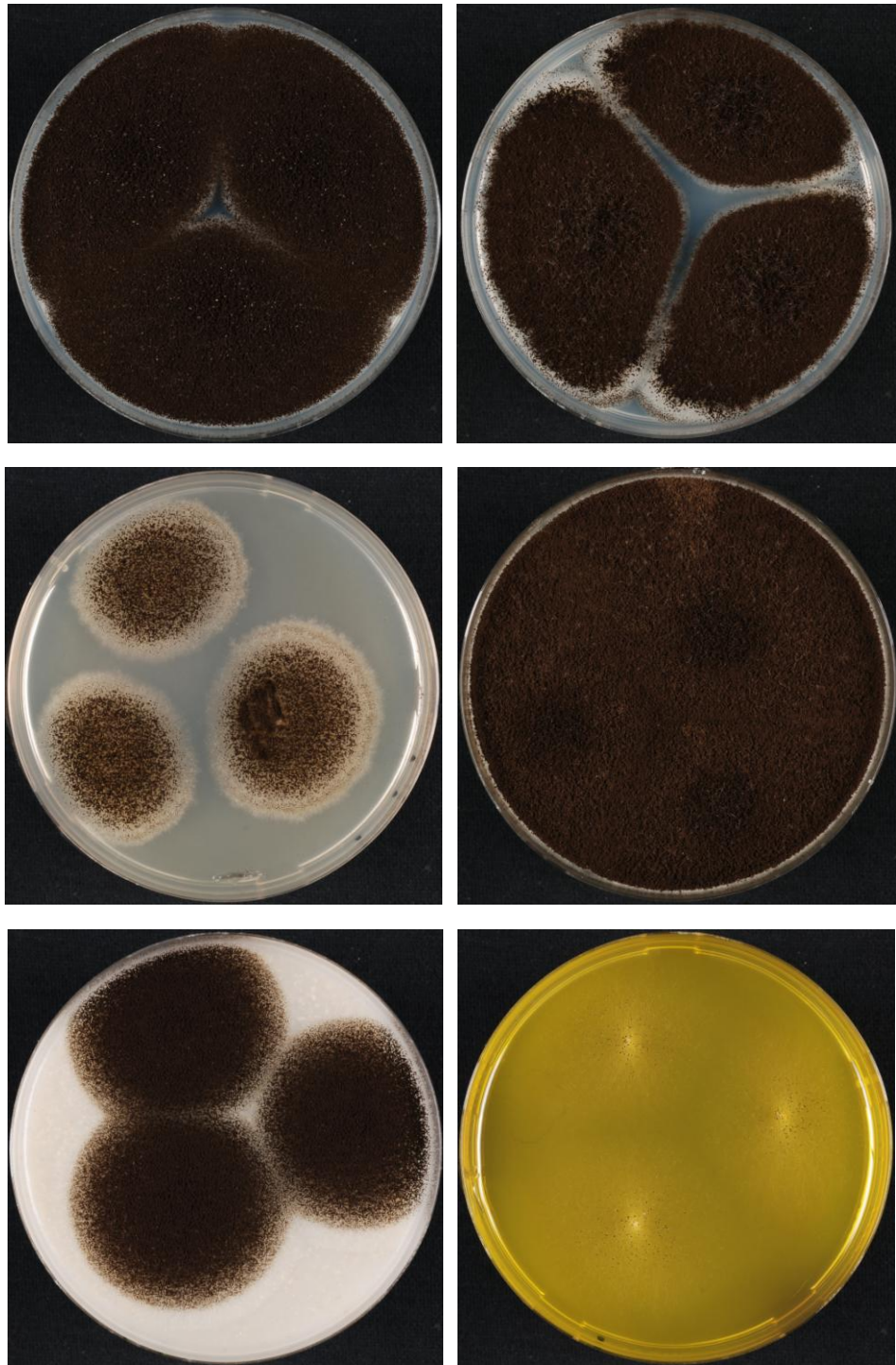
Druh sa vyskytuje bežne a je blízko príbuzný s *A. niger* (Schuster et al., 2002). Extrolit asperazín, detegovaný v kultúrach MD 20 a MD 383 (Tab. 26), produkujú v sekcii *Nigri* len *A. tubingensis* a *A. acidus* (Nielsen et al., 2009).



Obr. 21 Mikromorfológia *Aspergillus tubingensis* MD 20

1- konidiálne hlavice *in situ*; mierka = 200 µm; 2- konídie; mierka = 2 µm

Mikromorfológia, makromorfológia a fyziológia izolátu MD 20 sú na Obr. 21, Obr. 22.



Obr. 22 Makromorfológia a fyziológia *Aspergillus tubingensis* MD 20 na 7. deň kultivácie v tme

Czapkov agar s kvasničným extraktom a 20 % sacharózy, kultivácia pri teplote: 1- 25 °C; 2- 37 °C; kultivácia pri teplote 25 °C: 3- agar so sladivým extraktom; 4- agar s kvasničným extraktom a sacharózou; 5- agar s extraktom z ovsených vločiek; 6- agar s kreatínom a sacharózou (BioCentrum DTU, Lyngby, Dánsko)

Tab. 26 Produkcia extrolitov izolátmi druhov, blízkych druhu *Aspergillus niger*

metóda	extrolit	izolát									
		MD 20	MD 383	MD 19	1	MD 137	MD 365	MD 455	MD 454	MD 504	2
TLC	ochratoxín A				-	-	-	-	-	-	-
HPLC-DAD	asperazín	+	+								
	pyranonigrín A	+	+								
LC-MS/MS	fumonizín B ₂	-		-							
	ochratoxín A	-		-							

TLC- tenkovrstvová chromatografia (Samson et al., 2002b, s modifikáciou podľa Labuda et Tančinová, 2006); HPLC-DAD- vysokotlaková kvapalinová chromatografia s detekciou sústavou diód (Frisvad et Thrane, 1987, s minoritnými modifikáciami podľa Smedsgaard, 1997); LC-MS/MS- kvapalinová chromatografia s tandemovou spektrometriou más (Sulyok et al., 2007); - výsledok skríningu negatívny; + výsledok skríningu pozitívny; ^{MD 20}vzorka 15/ 2006, vnútro zrna; ^{MD 383}vz. 30/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 19}vz. 17/ 2006, vnútro zrna; ¹vz. 20/ 2006, povrch zrna; ^{MD 137}vz. 19/ 2007, povrch zrna; ^{MD 365}vz. 30/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 455, MD 454}vz. 1/ 2008, povrch zrna; ^{MD 504}vz. 13/ 2008, povrch zrna; ²vz. 13/ 2008, vnútro zrna

Vybrané izoláty druhov sekcie *Nigri* boli skrínované na produkciu extrolitov, najmä ochratoxínu A. Po publikovaní produkcie fumonizínu B₂ niektorými kmeňmi *A. niger* Frisvad et al. (2007b) boli kmene zo zbierky preskrínované aj na produkciu toho metabolitu (Tab. 26). Potencia produkovať ochratoxín A a fumonizín B₂ bola zistená pri singulárnom kmeni, izolovaného z ovzdušia laboratória.

Sekcia *Terrei*- v 73 analyzovaných vzorkách zrna obilnín boli v 1 vzorke zrna pšenice zaznamenané 3 izoláty druhu *Aspergillus terreus* Thom (Tab. 12).

Aspergillus terreus

Druh sa v potravinách vyskytuje zriedkavo (Frisvad et al., 2007c). Izolát MD 63 (vzorka 30/ 2007, zomleté zrno) bol TLC metódou skrínovaný na produkciu citrinínu a patulínu. Výsledok bol negatívny, resp. neistý. Frisvad et al. (2007c) uvádzajú, že citrinín produkujú len izoláty chemotypu II a produkcia patulínu druhom je otázna. *A. terreus* sa javí ako kozmopolitná huba s niekoľkými hojne rozšírenými genotypmi. Od morfoloicky veľmi podobného druhu *A. alabamensis* sa odlišuje produkciou mevinolínu a citreoviridínu. *A. alabamensis* typicky produkuje citrinín (Bajalee et al., 2009). V citovanej štúdii bolo analyzovaných spolu 94 izolátov z krajín všetkých kontinentov. 11 zo 14 izolátov druhu boli klinické izoláty, detegované na Univerzite štátu Alabama (USA), 2 pochádzali z pôdy v Argentíne a 1 izolát bol neznámeho pôvodu. 23 klinických izolátov z Rakúska patrilo do druhu *A. terreus*.

Podrod *Nidulantes*

Sekcia *Nidulantes*- v 73 analyzovaných vzorkách zrna obilnín bolo v 18 vzorkách zrna pšenice zaznamenaných spolu 8 teleomorfných izolátov druhu *Emericella nidulans* (Eidam) Vuill. (Tab. 27) a 34 anamorfných izolátov druhov *Aspergillus sydowii* (Bainier & Sartory) Thom & Church a *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tirab. (Tab. 12).

Emericella nidulans

Anamorfa: *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter. Pôdna huba, nazvaná podľa uloženia kleistotécia v Hülle bunkách, pripomínajúceho uloženie v hniezde (Webster et Weber, 2007). Druh bol jedným z prvých modelových organizmov v genetike. Vo výskume sa používa viac 50 rokov (Hofman, 2005) a je známa kompletná sekvencia genómu (Galagan et al., 2005. Zdroj: Andersen et Nielsen, 2009). Charakteristiky izolátov boli zhodné s diagnózami *sensu* Klich (2002) a Samson et al. (2002a).

Aspergillus sydowii

Druh neprodukuje žiadne známe toxíny (Frisvad et Thrane, 2010). Je významným patogénom koralovcov vejárovníkov rodu *Gorgonia* (Alker et al., 2001); spôsobil epidémie

a výrazne ovplyvnil populácie koralovcov v Karibskom mori (Ein-Gil et al., 2009). V potravinách sa v porovnaní s *A. versicolor* vyskytuje oveľa menej (Klich, 2002), s výnimkou v južnej Ázii, kde je jeho výskyt v potravinách častý (Samson et al., 2002a). Podobným druhom je *A. versicolor*. *A. sydowii* sa odlišuje modrozelenými kolóniami (MEA), výraznejšie drsnými konídiami a častejšie sa vyskytujúcimi redukovanými konidiálnymi hlavicami (Samson et al., 2002a). Študované izoláty tvorili tmavý, hnedo červený pigment a zreteľný biely sterilný lem. Pri dvoch izolátoch bola pozorovaná tvorba guľovitých Hülle buniek. Niektoré bunky mali stopku a vyzerali ako abortované konidiofory. Tvorba Hülle buniek nie je v použitej diagnostickej literatúre uvedená. Pri druhoch *A. sydowii*, rovnako aj *A. versicolor*, sa o nej zmieňujú Domsch et al. (1980); Thom et Raper (1945) príležitostne v kultúrach izolátov uvedených druhov pozorovali tvorbu Hülle buniek, pripomínajúcich bunky tvorené druhmi skupiny *Aspergillus nidulans*.

Aspergillus versicolor

O uvádzaní izolátov v skupinách vid' Kap. 4.2.

Produkcia sterigmatocystínu izolátmi druhov sekcie *Nidulantes* bola priebežne skrínovaná TLC metódou. Vybrané izoláty boli skrínované aj HPLC-DAD metódou. S výnimkou izolátov druhu *A. sydowii* bola pri všetkých testovaných izolátoch najmenej jednou z použitých metód potvrdená produkcia sterigmatocystínu (Tab. 28). Zo zistených aristolitov je zaujímavá produkcia austdiolu dvomi izolátmi druhu *Emericella nidulans*. Klich (2002) uvádza, že austdiol produkuje len druh *A. ustus*. Produkciu metabolitu druhom publikovali Vleggaar et al. (1974. Zdroj: Houbraken et al., 2007). V štúdiu Houbraken et al. (2007) však nebola zistená ani pri jednom z analyzovaných kmeňov *A. ustus*, ako ani pri žiadnom kmeni ostatných druhov sekcie *Usti*.

Tab. 27 Izoláty rodu *Emericella* zo zrna pšenice, zberanej v rokoch 2006-2008, bez ohľadu na izolačné médium

rok	2006								2007								2008								spolu 2006-2008	
	osídlenie zrna		vnútro		povrch		zoml. z.		spolu		vnútro		povrch		zoml. z.		spolu		vnútro		povrch		spolu			
taxón	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ	+	Σ		
<i>E. nidulans</i>	1	1					1	1	3	3	1	2	1	1	3	6			1	1	1	1	5	8		
<i>Emericella</i>	1	1					1	1	3	3	1	2	1	1	3	6			1	1	1	1	5	8		

zoml. z.- zomleté zrno; + pozitívne vzorky; Σ súčet izolátov; E.- *Emericella*

Tab. 28 Skrining extrolitov izolátov druhov sekcie *Nidulantes*

		<i>Emericella nidulans</i>				<i>Aspergillus sydowii</i>				<i>Aspergillus versicolor</i> II			<i>Aspergillus versicolor</i> n. sk.			
		MD 15	MD 159	MD 369	ZB 61	1	2	MD 155	MD 448	MD 5	MD 265	MD 68	MD 4	MD 157	MD 308	MD 425
TLC	sterigmatocystín	+	+	+		-	-	-		-		+	+	+	+	+
HPLC-DAD	aspergamid A										+	+				
	aspergamidy									+	+	+				
	austdiol	+			+											
	? fenylahistín									+		+				
	kys. sydoová?							+	+							
	shami- xantón				+											
	sterigmatocystín	+			+					+	+	+				
	<i>cf.</i> sterigmatocystín										+					

TLC- tenkovrstvová chromatografia (Samson et al., 2002b, s modifikáciou podľa Labuda et Tančinová, 2006); HPLC-DAD- vysokotlaková kvapalinová chromatografia s detekciou sústavou diód (Frisvad et Thrane, 1987, s minoritnými modifikáciami podľa Smedsgaard, 1997); II- skupina II; n. sk.- neurčená skupina; - výsledok negatívny; + výsledok pozitívny; ^{MD 15}vzorka 19/ 2006, vnútro zrna; ^{MD 159}vz. 6/ 2007, povrch zrna; ^{MD 369}vz. 30/ 2007, zomleté zrno; ^{ZB 61}vz. 1/ 2008, povrch zrna; ¹vz. 18/ 2006, vnútro zrna; ²vz. 1/ 2007, vnútro zrna; ^{MD 155}vz. 9/ 2007, zomleté zrno; ^{MD 448}vz. 11/ 2008, povrch zrna; ^{MD 5}vz. 21/ 2006, zomleté zrno; ^{MD 265}vz. 20/ 2007, povrch zrna; ^{ZB 68}vz. 2/ 2008, povrch zrna; ^{MD 4}vz. 21/ 2006, povrch zrna; ^{MD 157}vz. 8/ 2007, povrch zrna; ^{MD 308}vz. 24/ 2007, povrch zrna; ^{MD 425}vz. 30/ 2007, povrch zrna

4.4 Extrolity detegované v metabolickom profile izolátov

Skríning extrolitov je súčasťou polyfázickej koncepcie druhu (Obr. 2). Extrolity sú použiteľné pri rozlišovaní druhov, pretože majú vysokú druhovú špecifitu (Frisvad, 1989, Larsen et al., 2005. Podľa: Samson et Varga, 2009). Ako uvádzajú Samson et al. (2006), každý taxón rodu *Aspergillus* má špecifický profil extrolitov. Kontrolné mechanizmy expresie génov enzýmov sekundárneho metabolizmu sú zvyčajne spojené s fyziológiou produkčného organizmu (Magan et Aldred, 2007). Extrolity môžu byť produkované na niektorých médiách vo veľkých množstvách, na niektorých médiách vôbec (Frisvad et al., 2007). Je pravdepodobné, že použité kultivačné médiá, najmä CYAS (Kap. 3.4.2), ukázali ich limitované spektrum. Niektoré extrolity sú toxické pre stavovce (Kap. 1.2.8.1). Medzi extrolitmi, detegovanými v čistých kultúrach MD a ZB izolátov, sú okrem mykotoxínov a toxínov tiež potenciálne liečivá, antioxidanty, antibakteriálne a antifungálne substancie. Aktivita, prípadne vlastnosti extrolitov uvádzané v prácach iných autorov, sú sumarizované v Tab. 29.

Tab. 29 Známa aktivita extrolitov, detegovaných v čistých kultúrach izolátov aspergilov zo zrna obilnín slovenského pôvodu (žatva 2006-2008)

extrolit	detegovaný v taxóne	známa aktivita, vlastnosť	referencia
aflatoxín B₁, B₂, G₁, G₂, M₁	<i>Aspergillus parasiticus</i>	- mykotoxíny - extracelulárne	JECFA (1997, 2001) Purchase (Podľa: Filtenborg et al., 1983) Kap. 1.2.8.1
antrachinóny, červené antrachinóny	<i>Eurotium chevalieri</i> <i>Eurotium repens</i> <i>Eurotium rubrum</i>	- potenciálne liečivá Alzheimerovej choroby - antioxidanty - (?) genotoxická aktivita - inhibitory produkcie sulfidov desulfurikačnými baktériami <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Pickhardt et al. (2005) Paramenswaran et al. (2004) Wu et Yen (2004) Weimer et al. (1995)
asperazín	<i>Aspergillus tubingensis</i>	- selektívna <i>in vitro</i> cytotoxicita voči ľudskej leukémii - v sekcii <i>Nigri</i> produkovaný druhmi <i>A. tubingensis</i> a <i>A. acidus</i> , chemotaxonomický znak	Varoglu et al. (1997. Podľa: Govek et Overman, 2007) Nielsen et al. (2009)
asperentíny A (=kladosporín)	<i>Eurotium rubrum</i>	- insekticídna, antibakteriálna, antifungálna aktivita - inhibícia klíčenia spór niektorých druhov rodov <i>Penicillium</i> a <i>Aspergillus</i> pri koncentrácii $\leq 40 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ v tekutom médiu	Podľa: Slack et al. (2009) Scott et al. (1971)
aspergamidy, aspergamid A (= avraínvilamidy, stefacidíny)	<i>Aspergillus versicolor</i> ¹ <i>Aspergillus westerdijikae</i> <i>Aspergillus cf. melleus</i>	- potenciálna aktivita proti rôznym druhom rakoviny	Frisvad et al. (2004a)
austdiol	<i>Emericella nidulans</i>	- gastrointestinálny toxín - spolu s austamidom, austínmi a austocystínmi tvorí skupinu mutagénnych a/ alebo toxických extrolitov	Steyn (1973. Podľa: Engel et Kruger, 1976) Klich (2002)

(pokračovanie Tab. 29)

extrolit	detegovaný v taxóne	známa aktivita, poznámka	referencia
auroglaucín	<i>Eurotium amstelodami</i>	- deriváty auroglaucínu sú antioxidanty - gastrointestinálny toxín - oranžovo-červený pigment	Paramenswaran et al. (2004) Steyn (1973. Podľa: Engel et Kruger, 1976) Hanson (2008) Kap. 4.3
echinulín	<i>Eurotium amstelodami</i>	- toxický - aktívny voči <i>Mycobacterium tuberculosis</i> - bezfarebný	Frisvad et Thrane (2010) Talapatra et al. (2001. Podľa: Paramenswaran et al., 2004) Mapari (2009)
epihevedrid, epihevedrid A	<i>Eurotium amstelodami</i> <i>Eurotium chevalieri</i>	- silná antifungálna aktivita voči <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Penicillium marneffeii</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> a <i>T. mentagrophytes</i> - extracelulárne extrolity	Hosoe et al. (2004a. Podľa: Slack et al., 2009) Slack et al. (2009)
? fenylahistín	<i>Aspergillus versicolor</i> ¹	- <i>in vivo</i> a <i>in vitro</i> antitumorová aktivita voči 8 tumorovým bunkovým líniam	Kanoh et al. (1999)
cf. fischerín	<i>Aspergillus fumigatus</i>	fischerín- toxín; po experimentálnom podaní indukoval letálny zápal pobrušnice u myši	Fujimoto et al. (1993. Podľa: Han et Na, 2008)
flavoglaucín	<i>Eurotium amstelodami</i>	- slabá cytotoxicita voči HeLa bunkám, poškodenie pečene u králikov, inhibícia mitochondriálnej respirácie, indukcia opuchu mitochondrií, antioxidačná aktivita, synergizmus s tokoferolom - inhibičná aktivita vzniku tumoru v dvojfázovom teste karcinogenézy na myšiach; pravdepodobne sú antitumorové promotéry - intracelulárny - žltý pigment	Umeda et al., 1974; Nazar et al., 1984; Kawai et al., 1986; Ishikawa et al., 1984 (Podľa: Slack et al., 2009) Miyake et al. (2010) Slack et al. (2009) Mapari (2009)

(pokračovanie Tab. 29)

extrolit	detegovaný v taxóne	známa aktivita, poznámka	referencia
fumagilín	<i>Aspergillus fumigatus</i>	- antibiotikum, používané v boji proti <i>Nosema apis</i> , parazitovi včely medonosnej - inhibítor bujnenia endotelových buniek a angiogenézy; skúmaný ako možné liečivo intestinálnej mikrosporidiózy	Kochansky et Nasr (2004), Fumagillin... (2001) Fumagillin (2010)
fumigaklavín, fumigaklavín C	<i>Aspergillus fumigatus</i>	- mykotoxíny - priamy periférny účinok na hladké svalstvo (kontrakcie maternice a konstriktoria ciev), nepriame periférne účinky (humorálny a serotonínový antagonizmus, blokáda produkcie adrenalínu), účinky na centrálnu nervovú sústavu (bulbomedulárne a mezoencefalické zložky); vakuolizácia pečňových parenchymálnych buniek u jednodňových kohútov, prežívajúcich po orálnom podaní LD ₅₀ bola spôsobená fumigaklavínom C alebo anorexiou	Frisvad et Thrane (2010) Cole et Schweichert (2003a)
fumigatín A	<i>Aspergillus fumigatus</i>	- pigment, v alkalickom prostredí sa jeho farba mení zo žltohnedej na výrazne purpurovú	Hanson (2008) Kap. 4.3
fumiquinazolín, fumiquinazolín A	<i>Aspergillus fumigatus</i>	- v taxonomickej skupine <i>Aspergillus</i> sekcia <i>Fumigati</i> jedinečné pre <i>A. fumigatus</i> - stredne silná <i>in vitro</i> cytotoxicita voči bunkám línie P 388.	Samson et al. (2007a) Cole et al. (2003)
fumitremorgín A a B	<i>Aspergillus fumigatus</i>	- mykotoxín - tremorgénne účinky; vnútropobrušnicová aplikácia 1 mg spôsobila zreteľné triašky a rovnakým spôsobom aplikovaná dávka 5 mg nepretržitú triašku a 70 % úmrtnosť u myši	Frisvad et Thrane (2010) Cole et Schweichert (2003a)
fyscion	<i>Eurotium repens</i>	- toxický - žltý	Frisvad et Thrane (2010) Mapari (2009)
4-hydroxymeleín	<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	- nie je považovaný za mykotoxín	Frisvad et al. (2004a)
kampestrín A	<i>Aspergillus tritici</i>	- antibiotické účinky voči G ⁺ aj G ⁻ baktériám	Campestrin,... (2010)

(pokračovanie Tab. 29)

extrolit	detegovaný v taxóne	známa aktivita, poznámka	referencia
kotanín	<i>Aspergillus clavatus</i>	- toxický pre 10 dňové kohúty	Culter et al. (1979)
kyselina cyklopiazonová	<i>Aspergillus flavus</i>	- mykotoxín - intracelulárny	Frisvad et Thrane (2010) Filtenborg et al. (1983) Kap. 1.2.8.1
kyselina helvolová	<i>Aspergillus fumigatus</i>	- antibiotická aktivita najmä voči G ⁺ baktériám, G ⁻ sú menej citlivé	Cole et Schweikert (2003b)
kyselina kojová	<i>Aspergillus parasiticus</i>	- toxín - potravinárske aditívum a konzervans, kozmetické bielenie pleti, regulátor rastu rastlín, chemický intermediát; evidencia karcinogenity u ľudí je nedostatočná a u pokusných zvierat limitovaná - extracelulárny extrolit	Frisvad et Thrane (2010) IARC (2001) Purchase (Podľa: Filtenborg et al., 1983)
kyselina penicilová	<i>Aspergillus westerdijikae</i>	- mykotoxín, cytotoxický a pravdepodobne karcinogénny, antibiotická, antivirálna a antitumorová aktivita - možný aditívny alebo synergický účinok s xantomegnínom, viomeleínom a vioxantínom - možný synergický toxický efekt s ochratoxínom A - extracelulárny extrolit - bezfarebná	Frisvad et al. (2004b), Cole et al. (2003) Frisvad et al., 2007c Lindelfelser et al., 1973, Stoev et al., 2001. (Podľa: Frisvad et al., 2007c) Purchase (Podľa: Filtenborg et al., 1983) Mapari (2009)
? kyselina sydoová	<i>Aspergillus sydowii</i>	- slabá antibakteriálna aktivita - antioxidant - bezfarebná, s brómfenolovou modrou tvorí žltú farbu a s etanolovým roztokom chloridu železitého hnedú farbu	Wei et al. (2010) Ishikawa et al. (1984. Podľa: Wei et al., 2010) Hamasaki et al. (1975)

(pokračovanie Tab. 29)

extrolit	detegovaný v taxóne	známa aktivita, poznámka	referencia
3-o-metyl-súlochrín	<i>Aspergillus fumigatus</i>	- metabolit je v sekcii <i>Fumigati</i> produkovaný len druhom <i>A. fumigatus</i>	Samson et al. (2007a)
NB1	<i>Aspergillus westerdijikiae</i>	- čiastočne charakterizovaný extrolit, produkovaný všetkými kmeňmi <i>A. westerdijikiae</i> , ale žiadnym kmeňom <i>A. ochraceus</i>	Frisvad et al. (2004a)
neoechinulín A	<i>Eurotium amstelodami</i>	- antioxidačná aktivita vyššia ako pri tokoferole, cytoprotektívna aktivita pred bunkovou smrťou indukovanou peroxynitritom a ďalšie	Podľa: Slack et al. (2009)
ochratoxín A	<i>Aspergillus westerdijikiae</i> <i>Aspergillus cf. melleus</i>	- mykotoxín - extracelulárny - bezfarebný	Frisvad et Thrane (2010) Purchase (Podľa: Filtenborg et al., 1983) Mapari, 2009 Kap. 1.2.8.1
orlandín	<i>Aspergillus clavatus</i>	- významná inhibícia rastu pšeničného koleoptylu, nebol toxický pre 10 dňové kohúty - pravdepodobne prekursor kotanínu	Culter et al. (1979)
patulín	<i>Aspergillus clavatus</i> ? <i>Aspergillus terreus</i>	- mykotoxín - extracelulárny	Frisvad et Thrane (2010) Purchase (Podľa: Filtenborg et al., 1983) Kap. 1.2.8.1
pseurotín A	<i>Aspergillus fumigatus</i>	- antifungálna aktivita, inhibítor angiogenézy	Frisvad et al. (2004b)
pyranonigrín A	<i>Aspergillus tubingensis</i>	- antioxidant	Miyake et al. (2007)
questín	<i>Eurotium chevalieri</i>	- antibiotická aktivita, inhibícia nukleozidového importu tumorovou bunkovou líniou a v myšacích lymfocytoch	Su et al. (2004. Podľa: Slack et al., 2009)
shami- xantón	<i>Emericella nidulans</i>	- polyketid, rozšírený v rode <i>Emericella</i>	Zalar et al. (2008)
siderín	<i>Aspergillus clavatus</i>	- fytotoxická aktivita voči fotosyntéze	Veiga et al. (2007)

(pokračovanie Tab. 29)

extrolit	detegovaný v taxóne	známa aktivita, poznámka	referencia
sterigmatocystín	<i>Emericella nidulans</i> <i>Aspergillus versicolor</i> ¹ <i>A. versicolor</i> ²	- mykotoxín - intracelulárny - silná cytotoxicita voči 5 ľudským tumorovým bunkovým líniam - žltý	Frisvad et Thrane (2010) Filtenborg et al. (1983) Lee et al. (2010) Mapari (2009) Kap. 1.2.8.1
terfenylín	<i>Aspergillus tritici</i>	- antioxidačná aktivita, inhibítor rastu rastlín, slabá aktivita voči HIV integráze	Terphenyllin (2010)
TR-2/ fumitremorgín C	<i>Aspergillus fumigatus</i>	TR-2: ústne podanie vyvolalo zreteľné triašky u jednodňových kohútov už pri dávke 12,5 mg . kg ⁻¹ fumitremorgín C: tremorgénne účinky na jednodňové kohúty už pri dávke 25 mg . kg ⁻¹	Cole et Schweichert (2003a)
trypacidín	<i>Aspergillus fumigatus</i>	- antibiotikum s <i>in vitro</i> aktivitou voči <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Leptospira pomona</i> , <i>L. icterohaemorrhagiae</i> a <i>L. canicola</i>	Balan et al. (1964)
tryptoquivalíny	<i>Aspergillus clavatus</i>	- toxické - ? tremorgénne mykotoxíny - typy A až C podané vnútrobrušnicovo navodili sústavné triašky u potkanov už pri dávke 50 µl, tremorgénna aktivita je spájaná aj s typmi D až J	Frisvad et Thrane (2010) Samson et Frisvad (2004), Frisvad et al. (2004b) Cole et Schweichert (2003a)
tryptoquivalón A (= nortryptoquivalón)	<i>Aspergillus clavatus</i>	- kontinuálne triašky u potkanov už pri dávke 50 µl pri vnútrobrušnicovej distribúcii	Cole et Schweichert (2003a)
verukulogén	<i>Aspergillus fumigatus</i>	- mykotoxín - veľmi silný tremorgén	Frisvad et Thrane (2010) Frisvad et al. (2007c)

(pokračovanie Tab. 29)

extrolit	detegovaný v taxóne	známa aktivita, poznámka	referencia
viomeleín	<i>Aspergillus westerdijikiae</i>	- mykotoxín - hepato- a nefrotoxický - intracelulárny - červenasto-hnedý	Frisvad et Thrane (2010) Frisvad et al. (2002) Filtenborg et al. (1983) Mapari (2009)
vioxantín	<i>Aspergillus westerdijikiae</i>	- mykotoxín - hepato- a nefrotoxický	Frisvad et Thrane (2010) Frisvad et al. (2007c)
xantoascín	<i>Aspergillus tritici</i>	- hepato- a kardiotoxický, teratogénny na pokusných zvieratách	Ohtsubo et al., 1976, Takahashi et al., 1976 (Podľa: Scott, 2004)
xantomegnín	<i>Aspergillus westerdijikiae</i>	- mykotoxín - hepato- a nefrotoxický - intracelulárny - oranžový	Frisvad et al. (2004a) Samson et Frisvad (2004), Frisvad et al. (2007c) Filtenborg et al. (1983) Mapari (2009)

o- orto; cf.- *cōnfer*; A.- *Aspergillus*; ¹skupina II; ²neurčená skupina; HeLa- bunková línia, odvodená od buniek cervikálnej rakoviny, odobraných od pacientky Henrietty Lacks († r. 1951); LD₅₀- letálna dávka pre 50 % z testovaných organizmov; P 388- bunková línia, odvodená od buniek leukémie; G⁺ Gram pozitívne; G⁻ Gram negatívne; HIV- vírus nedostatku ľudskej imunity; Kap.- kapitola

4.5 Spektrum a územná distribúcia druhov

Spektrum detegovaných taxónov spolu s referenciami ich doterajších záznamov na území Slovenska je uvedené v Tab. 30. Farebne sú zvýraznené druhy, detegované prvý krát na území Slovenska: *Eurotium appendiculatum*, *E. cristatum*, *Aspergillus tubingensis* a donedávna kryptické druhy, prvý krát diagnostikované pre Slovensko: *Aspergillus tritici* a *A. westerdijkiae*.

Porovnanie druhového spektra aspergilov, izolovaných z komodít z rokov 2006–2008 so spektrom, sumarizovaným Jesenskou ku roku 1987 (Tab. 31) neukázalo početné rozdiely. Druhy *Aspergillus tritici*, resp. *A. westerdijkiae* a pravdepodobne aj *A. cf. melleus*, detegované v predkladanej práci, mohli v publikácii Jesenskej (1987) figurovať ako *A. candidus*, resp. *A. ochraceus*. Nálezy *A. parasiticus* sú na území Slovenska z domácich substrátov zriedkavé; dosiaľ boli publikované len dva- autormi Franková et Šimonovičová (1999) a Čerňanský et al. (2006); tieto nálezy sumarizovala tiež Šimonovičová (2001, 2003; Tab. 30) v zoznamoch mikroskopických húb Slovenska. *A. sydowii* sa v potravinách v našich zemepisných šírkach nevyskytuje často (Klich, 2002, Samson et al., 2002a). V Tab. 32 je územná distribúcia aspergilov, odvodená od endogénneho osídlenia zrn vzoriek so známym pôvodom. Ako je uvedené v Kap. 1.1.1, huby môžu byť prinesené do skladu vo vnútri obilia (Lacey, 1989). Druhý najčastejšie detegovaný druh, *Aspergillus flavus*, je schopný rásť ako komenzál v pletivách rastlín (Pitt et Hocking, 1999; Kap. 4.2). Druh bol endogénne detegovaný v 22 vzorkách, pochádzajúcich najmenej zo 7 krajov.

Tab. 30 Detegované taxóny aspergilov a záznam o ich predošlej identifikácii na území Slovenska. Taxóny sú zoradené v zmysle vnútorodového členenia rodu *Aspergillus* (Peterson, 2008)

podrod	sekcia	druh; pomocný taxón	referencia výskytu na území Slovenska
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangin ¹	4, 5, 6, 8, 10, 11, 12
		<i>Eurotium appendiculatum</i> Blaser ¹	*
		<i>Eurotium chevalieri</i> L. Mangin ¹	3, 5, 6, 8, 10, 12
		<i>Eurotium cristatum</i> (Raper & Fennell) Malloch & Cain ¹	*
		<i>Eurotium repens</i> de Bary ¹	3, 5, 6, 8, 10, 11, 12
		<i>Eurotium rubrum</i> W. Bremer ¹	5, 6, 8
		<i>Eurotium herbariorum</i> skupina	
		<i>Eurotium herbariorum/ repens</i>	
		<i>Eurotium herbariorum/ rubrum</i>	
		<i>Eurotium cf. amstelodami</i>	
		<i>Eurotium cf. chevalieri</i>	
		<i>Eurotium amstelodami/ chevalieri</i>	
			Restricti
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen. ¹	2, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12
	<i>Clavati</i>	<i>Aspergillus clavatus</i> Desm. ¹	3, 6, 8, 10, 12
<i>Circumdati</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus westerdijkiae</i> Frisvad & Samson ¹	9
			**
		<i>Aspergillus cf. melleus</i> Yukawa ¹	<i>A. melleus</i> Yukawa ³ 9
		<i>Aspergillus ochraceus sensu lato</i>	<i>A. ochraceus</i> K. Wilh. ² <i>A. ochraceus</i> Wilhelm ^{5, 10, 11, 12} 6, 8

(pokračovanie Tab. 30)

podrod	sekcia	druh; pomocný taxón	referencia výskytu na území Slovenska
	<i>Candidi</i>	<i>Aspergillus tritici</i> B. S. Mehrotra & M. Basu ¹	8, 9
		<i>Aspergillus candidus sensu lato</i>	** <i>A. candidus</i> Link ^{1, 2, 5} <i>A. candidus</i> ^{10, 12} 6
	<i>Cremeri</i>	<i>Aspergillus wentii</i> Wehmer ¹	2, 4, 5, 9
	<i>Flavi</i>	<i>Aspergillus flavus</i> Link ¹	2, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12
		<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare ¹	3, 5
	<i>Nigri</i>	<i>Aspergillus tubingensis</i> Mosseray ¹	*
		<i>Aspergillus niger</i> agregát	<i>A. niger</i> Tiegh. ^{1, 2, 10, 11, 12} <i>A. niger</i> var. <i>cinnamomeus</i> (Schiemann) Thom et Raper ^{1, 3, 5} 6, 8
	<i>Terrei</i>	<i>Aspergillus terreus</i> Thom ¹	2, 5, 8, 10, 12
<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i>	<i>Emericella nidulans</i> (Eidam) Vuill. ¹	5, 6, 8, 11
		<i>Aspergillus sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church ¹	<i>A. sydowii</i> Kita ² 5, 6, 8, 10, 12
		<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab. ¹ skupina II	<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab. ^{2, 5, 10, 11, 12}
		<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab. ¹ neurčená skupina	<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab. ^{2, 5, 10, 11, 12} 6, 8

cf.- *cōnfer*; ¹Index Fungorum (2010); ²Lizoň et Bacigálová (1998); ³Šimonovičová (2001); ⁴Šimonovičová (2002); ⁵Šimonovičová (2008); ⁶Dovičičová et al. (2008); ⁷Dovičičová et Tančinová (2008); ⁸Dovičičová et al. (2009a); ⁹Dovičičová et al. (2009b); ¹⁰Tančinová et Labuda, 2009; ¹¹Tančinová et al., 2001; ¹²Tančinová et Labuda, 2006; *druh dosiaľ nebol zaznamenaný na území Slovenska; **druhy prvý krát diagnostikované na území Slovenska autorkou (a uvedenými spoluautormi)

Tab. 31 Spektrum aspergilov, zachytené v zrne obilnín, dopestovaných na území Slovenska v rokoch 2006-2008 v porovnaní so spektrom zo slovenských požívatin, sumarizovaným Jesenskou ku roku 1987

zrno obilnín, žatva 2006, 2007 a 2008	požívatiny s pôvodom vo vtedajšej Slovenskej socialistickej republike, vyšetrené do roku 1987
<i>Eurotium amstelodami</i>	<i>Aspergillus glaucus</i> skupina: povrch mäsových výrobkov (Západoslovenský kraj), sušené mlieko na kŕmne účely, vzorky múky a krupice- žatva 1981 (dobré klimatické podmienky), detská dehydratovaná krupica, instantné cereálne kaše, strúhanka (menej často až zriedkavo), kukuričný škrob, pšeničný škrob, prášok jahodového pudingu, BB- pudingový prášok, včelí peľ
<i>Eurotium appendiculatum</i>	
<i>Eurotium chevalieri</i>	
<i>Eurotium cristatum</i>	
<i>Eurotium repens</i>	
<i>Eurotium rubrum</i>	
<i>Eurotium herbariorum</i> skupina	
<i>Eurotium herbariorum/ repens</i>	
<i>Eurotium herbariorum/ rubrum</i>	
<i>Eurotium cf. amstelodami</i>	
<i>Eurotium cf. chevalieri</i>	
<i>Eurotium amstelodami/ chevalieri</i>	
<i>Aspergillus restrictus</i>	vzorky múky a krupice- žatva 1981 (dobré klimatické podmienky)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	sušené mlieko na kŕmne účely, vzorky múky a krupice- žatva 1981 (dobré klimatické podmienky), detská dehydratovaná krupica (menej často až zriedkavo)
<i>Aspergillus clavatus</i>	sušené mlieko na kŕmne účely, vzorky múky a krupice- žatva 1981 (dobré klimatické podmienky), detská dehydratovaná krupica (menej často až zriedkavo), instantné cereálne kaše, kukuričný škrob, pšeničný škrob
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i> : sušené mlieko na kŕmne účely, vzorky múky a krupice- žatva 1981 (dobré klimatické podmienky), detská dehydratovaná krupica (menej často až zriedkavo), kukuričný škrob, včelí peľ
<i>Aspergillus ochraceus sensu lato</i>	
<i>Aspergillus cf. melleus</i>	–

(pokračovanie Tab. 31)

<i>Aspergillus tritici</i> <i>Aspergillus candidus sensu lato</i>	<i>Aspergillus candidus</i> : vzorky múky a krupice- žatva 1981 (dobré klimatické podmienky), detská dehydratovaná krupica, kukuričný škrob, pšeničný škrob, prášok jahodového pudingu, BB-pudingový prášok, včelí peľ
<i>Aspergillus wentii</i> <i>Aspergillus flavus</i>	vzorky múky a krupice- žatva 1981 (dobré klimatické podmienky) vzorky sušeného mlieka, sušené mlieko na kŕmne účely, vzorky múky a krupice- žatva 1981 (dobré klimatické podmienky), detská dehydratovaná krupica, instantné cereálne kaše, strúhanka (menej často až zriedkavo), kukuričný škrob, pšeničný škrob, prášok jahodového pudingu, BB-pudingový prášok, mak, včelí peľ
<i>Aspergillus parasiticus</i> –	– <i>Aspergillus tamarii</i> : včelí peľ
<i>Aspergillus tubingensis</i> <i>Aspergillus niger</i> komplex	<i>Aspergillus niger</i> skupina: povrch mäsových výrobkov (Západoslovenský kraj), sušené mlieko na kŕmne účely, strúhanka, pšeničný škrob, prášok jahodového pudingu, BB- pudingový prášok, včelí peľ
<i>Aspergillus terreus</i>	sušené mlieko na kŕmne účely, vzorky múky a krupice- žatva 1981 (dobré klimatické podmienky), detská dehydratovaná krupica (menej často až zriedkavo), včelí peľ
<i>Emericella nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i> : vzorky múky a krupice- žatva 1981 (dobré klimatické podmienky), detská dehydratovaná krupica, BB- pudingový prášok, včelí peľ
<i>Aspergillus sydowii</i> –	– <i>Aspergillus ustus</i> : vzorky múky a krupice- žatva 1981 (dobré klimatické podmienky)
<i>Aspergillus versicolor</i> skupina II <i>Aspergillus versicolor</i> neurčená skupina	<i>Aspergillus versicolor</i> : sušené mlieko na kŕmne účely, vzorky múky a krupice- žatva 1981 (dobré klimatické podmienky), detská dehydratovaná krupica, kukuričný škrob, pšeničný škrob, BB-pudingový prášok, včelí peľ

cf.- *cōnfer*

Tab. 32 Územná distribúcia druhov, odvodená od endogénneho osídlenia zrn

región:		západoslovenský				stredoslov.		východoslov.	
kraj:		BA	TT	NR	TN	ZA	BB	PE	KE
taxón:	počet vzoriek:	2	5	17	5	6	2	5	3
<i>Aspergillus candidus sensu lato</i>						+	+		+
<i>Aspergillus clavatus</i>			+	+					
<i>Aspergillus flavus</i>			+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>				+		+			
<i>Aspergillus cf. melleus</i>						+			
<i>Aspergillus niger</i> komplex			+	+		+			+
<i>Aspergillus ochraceus sensu lato</i>				+					
<i>Aspergillus parasiticus</i>							+		
<i>Aspergillus sydowii</i>				+					
<i>Aspergillus tritici</i>		+				+			
<i>Aspergillus tubingensis</i>						+			
<i>Aspergillus versicolor</i> ¹							+		
<i>Aspergillus wentii</i>			+				+		
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>			+						
<i>Aspergillus</i> sp.		+	+	+				+	
<i>Emericella nidulans</i>						+		+	
<i>Eurotium amstelodami</i>			+	+		+	+	+	+
<i>Eurotium cf. amstelodami</i>			+		+				
<i>Eurotium appendiculatum</i>								+	
<i>Eurotium amst./chevalieri</i>				+					
<i>Eurotium chevalieri</i>			+	+		+		+	+
<i>Eurotium cf. chevalieri</i>				+					
<i>Eurotium herbariorum</i> skupina			+	+	+	+	+	+	+
<i>Eurotium herbariorum/ rubrum</i>			+			+	+		
<i>Eurotium repens</i>			+	+	+	+	+	+	
<i>Eurotium rubrum</i>			+	+		+	+	+	+
<i>Eurotium</i> sp.			+	+	+	+	+	+	+

Kraje: BA- Bratislavský; TT- Trnavský; NR- Nitriansky; TN- Trenčiansky; ZA- Žilinský; BB- Banskobystrický; PE- Prešovský, KE- Košický; stredoslov.- stredoslovenský; východoslov.- východoslovenský; sp.- neurčený druh; cf.- *cōnfer*; ¹neurčená skupina; + zaznamenaný výskyt

5 Záver

- ❖ V predkladanej práci bolo mykologicky zanalyzovaných spolu 70 vzoriek zrna pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.), 2 vzoriek zrna pšenice špaldovej (*Triticum spelta* L.) a singulárnej vzorky zrna jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.). Obilniny boli zožaté na najmenej 24 rôznych lokalitách Slovenska v rokoch 2006–2008. Vzorky boli odobrané priamo po žatve a počas skladovania. Spolu 57 vzoriek zrna pšenice letnej, 2 vzorky zrna pšenice špaldovej a singulárna vzorka jačmeňa siateho z najmenej 23 lokalít bolo osídlených minimálne jedným druhom rodu *Aspergillus* Fr.: Fr. a/ alebo asociovaných perfektných rodov *Eurotium* Link: Fr. a *Emericella* Berk., čo sa prejavilo jednopočetnou alebo mnohonásobnou izoláciou daného druhu použitými metódami. Spolu bolo detegovaných 20 *sensu stricto* a 12 pomocných taxónov s najvyššou frekvenciou výskytu *Eurotium amstelodami* (45,21 %), *Aspergillus flavus* (42,47 %) a *E. repens* (34,25 %), ďalej *E. rubrum* (24,66 %), *E. herbariorum* skupina (23,29 %), *E. chevalieri* (21,92 %), *A. fumigatus* (17,81 %), *A. niger* komplex, *A. versicolor* neurčená skupina (15,07 %), *A. tritici*, *E. herbariorum/ rubrum*, *A. candidus sensu lato*, *A. clavatus*, *A. sydowii*, *Emericella nidulans*, *A. ochraceus sensu lato*, *A. westerdijkiae*, *A. versicolor* skupina II, *A. tubingensis*, *A. wentii*, *A. cf. amstelodami* (< 13,7 %), *A. cf. melleus*, *A. parasiticus*, *A. restrictus*, *A. terreus*, *Eurotium amstelodami/ chevalieri*, *E. appendiculatum*, *E. cf. chevalieri*, *E. cristatum*, *E. herbariorum/ repens* (= 1,37 %). Vo vzorkách zo všetkých troch rokov zberu boli izolované *A. flavus*, *A. niger* komplex, *E. amstelodami* a *E. chevalieri* (endogénne), ďalej *A. clavatus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus sensu lato*, *A. sydowii*, *A. tritici*, *A. versicolor* neurčená skupina a skupina II, *A. westerdijkiae*, *Emericella nidulans*, *Eurotium chevalieri*, *E. repens* a *E. rubrum*.
- ❖ Aflatoxín B₁ a G₁ produkčný izolát *A. parasiticus* bol detegovaný vo vzorke z Banskobystrického kraja. Ochratoxín A produkčné izoláty *A. westerdijkiae* a *A. ochraceus sensu lato* vo vzorkách z Trnavského, Nitrianskeho kraja a v dvoch vzorkách s neznámym pôvodom. Kyselinu cyklopiazonovú produkčné izoláty *A. flavus* vo vzorkách z Trenčianskeho, Nitrianskeho, Žilinského a Prešovského kraja. Patulín produkčné izoláty *A. clavatus* vo vzorkách z Trnavského a Nitrianskeho kraja. Sterigmatocystín produkčné izoláty *A. versicolor* neurčená

skupina a skupina II a *Emericella nidulans* vo vzorkách z Trnavského, Nitrianskeho, Žilinského a Prešovského kraja.

- ❖ Druhy *Eurotium appendiculatum*, *E. cristatum*, *Aspergillus tubingensis*, *A. tritici* a *A. westerdijkiae* boli na území Slovenska prvý krát zaznamenané v priebehu riešenia dizertačnej práce. Izolácia aflatoxinogénneho kmeňa druhu *A. parasiticus* zo zrna pšenice slovenského pôvodu je prvým nálezom tohto druhu v potravinárskej komodite slovenského pôvodu.
- ❖ V čistých kultúrach reprezentatívnych izolátov jednotlivých druhov bolo detegovaných 68 rôznych extrolitov, z nich aflatoxín B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, fumigaklavín, fumigaklavín C, fumitremorgín A a B, kyselina cyklopiazonová, kyselina penicilová, ochratoxín A, patulín, sterigmatocystín, verukulogén, viomeleín, vioxantín a xantomegnín sú mykotoxíny *sensu stricto*. Toxická aktivita bola inými autormi popísaná pri detegovaných extrolitoch antrachinónoch, austdiole, auroglaucíne, echinulíne, flavoglaucíne, fycione, kotaníne, kyseline kojovej, TR-2/ fumitremorgíne C, tryproquivalínoch, tryptoquivalóne A a xantoascíne. Detegované antrachinóny boli ďalšími autormi popísané ako potenciálne liečivá Alzheimerovej choroby. Antikarcinogénne aktivita bola inými autormi zaznamenaná pri detegovaných extrolitoch asperazíne, aspergamidoch, flavoglaucíne, fumagilíne, fumiquinazolíne, fumiquinazolíne A, kyseline penicilovej, questíne a sterigmatocystíne. Antibiotická aktivita bola ďalšími autormi popísaná pri asperentínoch A, echinulíne, epiheveadride, fumagilíne, kampestríne A, kyseline helvolovej, kyseline penicilovej, pseurotíne A, questíne a trypacidíne. Detegované extrolity antrachinóny, flavoglaucín, neoechinulín A, pyranonigrín A a terfenylín sú inými autormi popísané ako antioxidanty.
- ❖ Metódou LC-MS/ MS bola stanovená toxinogénna potencia kmeňa *A. parasiticus* MD 502 na modifikovanom syntetickom tekutom médiu AetM [v mg . l⁻¹]: aflatoxín B₁ 15,7; aflatoxín G₁ 23,4; aflatoxín B₂ 0,52; aflatoxín G₂ 0,68; aflatoxín M₁ 0,18; kyselina kojová 227. Aflatoxinogénna potencia nebola metódou tenkovrstvovej chromatografie zistená pri žiadnom zo 41 izolátov *Aspergillus flavus* z 28 vzoriek.
- ❖ Reprezentatívne izoláty diagnostikovaných taxónov sú disponované v kolekcii kultúr mikroorganizmov na Katedre mikrobiológie Slovenskej poľnohospodárskej

univerzity v Nitre pod označením MD a v IBT kolekcii kultúr Dánskej technickej univerzity.

6 Zoznam použitej literatúry

- ABRAMSON, D. 1998. Mycotoxin formation and environmental factors. In SINHA, K. and BHATNAGAR, D.: *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. New York : Marcel Dekker, Inc., 1998. p. 225-277.
- ALKER, A., SMITH, G. W., KIM, K. 2001. Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Caribbean sea fan corals. In *Hydrobiologia*, 2001, vol. 460, p. 105-111.
- ANDERSEN, M. R., NIELSEN, J. 2009. Current status of systems biology in Aspergilli. In *Fungal Genetics and Biology*. 2009, vol. 46, S180-S190.
- BALAJEE, S. A., BADDLEY, J. W., PETERSON, S. W., NICKLE, D., VARGA, J., BOEY, A., LASS-FLÖRL, C., FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A., THE ISHAM WORKING GROUP ON A. *TERREUS*. 2009. *Aspergillus alabamensis*, a New Clinically Relevant Species in the Section *Terrei*. In *Eukaryotic Cell*. 2009, vol. 8, no. 5, p. 713-722.
- BALAN, J., EBRINGER, L. NEMEC, P. 1964. Trypacidin a new antiprotozoal antibiotic. In *Naturwissenschaften* [online]. 1964, vol. 51, no. 9, p. 227 [cit. 2010-05-27]. Náhl'ad dostupný na: <<http://www.springerlink.com/content/j2m38q26h612302h/>>.
- BETINA, V. 1990. *Mykotoxíny. Chémia-biológia-ekológia*. Bratislava : Alfa, 1990. 284 s. ISBN 80-05-00631-4.
- BHATNAGAR, D., YU, J., EHRLICH, K. C. 2002. Toxins of filamentous fungi. In *Chemical Immunology*. 2002, vol. 81, p. 167-206.
- BLASER, P. 1974/75. Taxonomische und physiologische Untersuchungen über die Gattung *Eurotium* Link ex Fries. In *Sydowia*. 1974/75, vol. 28, p. 1-49.
- BRANDHORST, T. T., KENEALY, W. R. 1992. Production and localization of restrictocin in *Aspergillus restrictus*. In *Journal of General Microbiology*. 1992, vol. 138, p. 1429-1435.
- BURGESS, L. W., LIDDEL, C. M., SUMMERELL, B. A. 1988. *Laboratory manual for Fusarium research*, 2nd ed. Sydney : University of Sydney. 1988, 156 p.
- BUTINAR, L., ZALAR, P., FRISVAD, J. C., GUNDE-CIMERMAN, N. 2005. The genus *Eurotium*- members of indigenous fungal community in hypersaline waters of salterns. In *FEMS Microbiology Ecology*. 2005, vol. 51, p. 155-166.
- CAMPESTRIN,... 2010. [online] [cit. 2010-05-27]. Dostupné na: <<http://www.nature.com/nature/journal/v175/n4454/abs/175468a0.html>>.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology). 2003. *Mycotoxins: Risks in Plant and Animal Systems* : Taks Force Report 139. Ames : Council for Agricultural Science and Technology, 2003.

-
- COLE, R. J., JARVIS, B. B., SCHWEIKERT, M. A. 2003. *Handbook of Secondary Fungal Metabolites. Volume III*. San Diego : Academic Press, 2003. 672 p. ISBN 0-12-179463-6.
- COLE, R. J., SCHWEIKERT, M. A. 2003a. *Handbook of secondary Fungal Metabolites Volume I*. San Diego : Academic Press, 2003a. 1006 p. ISBN 0-12-179461-X.
- COLE, R. J., SCHWEIKERT, M. A. 2003b. *Handbook of secondary Fungal Metabolites Volume II*. San Diego : Academic Press, 2003b. 819 p. ISBN 0-12-179462-8.
- COUSIN, M. A., RILEY, R. T., PESTKA, J. J. 2005. Foodborne Mycotoxins: Chemistry, Biology, Ecology, and Toxicology. In FRATAMICO, P. M., BHUNIA, A. K., SMITH, J. L.: *Foodborne Pathogens Microbiology and Molecular Biology*. Wymondham : Caister Academic Press, 2005. p. 163-226. ISBN 1-904455-00-X.
- CREPPY, E. E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. In *Toxicology Letters*. 2002, vol. 127, p. 19-28.
- CULTER, H. G., CRUMLEY, J. W., COX, R. H., HERNANDEZ, O., COLE, R. J., DORNER, J. W. 1979. Orlandin: A nontoxic fungal metabolite with plant growth inhibiting properties. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online], 1979, vol. 27, no. 3, p. 592-595 [cit. 2010-05-27]. Abstrakt dostupný na: <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~EWIwGF:4>>.
- ČERŇANSKÝ, S., URÍK, M., ŠEVC, J., ŠIMONOVICHOVÁ, A., LITTERA, P. 2006. Mikroskopické vlákňité huby v oblasti Pezinok- Kolársky Vrch- ich druhové zastúpenie a schopnosť biovolatilizácie arzénu. In *Acta Environmentalica Universitatis Comenianiae*. 2006, vol. 14, no. 2, p. 11-18.
- D'MELLO, J. P. F., MACDONALD, A. M. C. 1997. Mycotoxins. In *Animal Feed Science Technology*. 1997, vol. 69, p. 155-166.
- D'MELLO, J. P. F., PORTER, J. K., MACDONALD, A. M. C., PLACINTA, C. M. 1997. *Fusarium* mycotoxins. In D'MELLO, J. P. F.: *Handbook of Plant and Fungal Toxicants*. Boca Raton : CRC Press, 1997. p. 287-301.
- DAVIS, N. D., IYER, S. K., DIENER, U. L. 1987. Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. In *Applied and Environmental Microbiology*. 1987, vol. 53, p. 1593-1595.
- DE HOOG, G. S., GUARRO, J., GENÉ, J., FIGUERAS, M. J. 2000. *Atlas of clinical fungi*. 2nd ed. Utrecht : Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. 1126 p. ISBN 90-70351-43-9.
- DIEKMAN, M. A., GREEN, M. L. 1992. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. In *Journal of Animal Science*. 1992, vol. 70, p. 1615-1627.
- DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T. H. 1980. *Compendium of soil fungi. Vol. 1*. London : Academic Press, 1980. 859 p. ISBN 0-12-220401-8.
-

-
- DOVIČIČOVÁ, M., ŠULIKOVÁ, Z., TANČINOVÁ, D., PIOVARČIOVÁ, Z., FELŠÖCIOVÁ, S. 2009a. Aspergily izolované zo pšenice slovenského pôvodu z úrody roku 2007 a ich možný vplyv na bezpečnosť a kvalitu zrna. In *Acta fytotechnica et zootechnica*. 2009a, vol. 12, supplement, p. 114-121. ISSN 1335-258X.
- DOVIČIČOVÁ, M., TANČINOVÁ, D. 2008. Vlastnosti izolátov *Aspergillus flavus* zo zrna pšenice slovenského pôvodu. In *III. Vedecká konferencia doktorandov s medzinárodnou účasťou*. Nitra : SPU, 2008. s. 114-117. ISBN 978-80-552-0138-2.
- DOVIČIČOVÁ, M., TANČINOVÁ, D., FELŠÖCIOVÁ, S., MAŠKOVÁ, Z., BARBORÁKOVÁ, Z., ŠTEFÁNIKOVÁ, K. 2009b. Druhové spektrum rodu *Aspergillus* Mich. zo slovenskej pšenice v zmysle súčasných taxonomických poznatkov so zameraním na sekcie *Circumdati*, *Candidi* a *Fumigati*. In *Mykologické listy, supplementum. Česko-Slovenská vedecká mykologická konferencie*. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2009b. s. 16-17. ISBN 978-80-254-6038-2.
- DOVIČIČOVÁ, M., TANČINOVÁ, D., LABUDA, R. 2008. Výskyt druhov rodov *Aspergillus*, *Eurotium* a *Emericella* v potravinárskej pšenici slovenského pôvodu v úrode 2006. In *Zborník z III. Vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou Bezpečnosť a kvalita surovín a potravín*. Nitra : SPU, 2008. s. 117-121. ISBN 978-80-8069-996-3.
- DU PONT DE NE MOURS, E. I., AND CO. US. *Anthraquinones as inhibitors of sulfide production by sulfate reducing bacteria in sewage, oil wals, process tanks or biomass fermentation*. WEIMER, P. J., ODOM, J. M., COOLING, F. B., ANDERSON, A. G. US Patent No 5385842. 31. 01. 1995
- DUTTON, M. F., EHRLICH, K., BENNETT, W. Biosynthetic Relationship among Aflatoxins B₁, B₂, M₁, and M₂. In *Applied and Environmental Microbiology*. 1985, vol. 49, no. 6, p. 1392-1395.
- EIN-GIL, N., ILAN, M., CARMELI, S., SMITH, G. W., PAWLIK, J. R., YARDEN, O. 2009. Presence of *Aspergillus sydowii*, a pathogen of gorgonian sea fans in the marine sponge *Spongia obscura*. In *The ISME Journal*. 2009, p. 1-4.
- ENGEL, D. W., KRUGER, G. J. 1976. The Crystal Structure of 5-Bromo-austdiol C₁₁H₁₁O₄Br. In *Acta Crystallographica* [online], 1976, vol. 32, p. 2545-2548 [cit. 2010-05-27]. Náhl'ad dostupný na: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0567740876008212>>.
- FAO (Food and Agriculture Organization), 2001. Manual of the Application of the HACCP System in Mycotoxin Prevention and Control. In *FAO Food and Nutrition Paper 73*. Rome : International Atomic Energy Agency. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Food and Agricultural Organization, 2001.
- FASSATIOVÁ, O. 1979. *Plísne a vláknité houby v technické mikrobiológii (Príručka k určovaniu)*. Praha : SNTL- Nakladatelství technické literatury, 1979. 240 s.
- FILTENBORG, O., FIRSVAD, J. C., SAMSON, R. A. 2002. Specific association of fungi to foods and influence of physical environmental factors. In SAMSON, R. A.,
-

HOEKSTRA, E. S., FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O.: *Introduction to food- and airborne fungi*. 6th revised ed. (with some corrections). Utrecht : Centraalbureau voor Schimmecultures, 2002. p. 306-320.

FILTENBORG, O., FRISVAD, J. C., SVENDSEN, J. A. 1983. Simple Screening Method for Molds Producing Intracellular Mycotoxins in Pure Cultures. In *Applied and Environmental Microbiology*. 1983, vol. 45, no. 2, p. 581-585.

FILTENBORG, O., FRISVAD, J. C., THRANE, U. 1996. Moulds in food spoilage. In *International Journal of Food Microbiology*. 1996, vol. 33, p. 85-102.

FRANKOVÁ, E., ŠIMONOVICHOVÁ, A. 1999. Výskyt mikromycétov v životnom prostredí so zreteľom na zdravotné riziká. In *Bulletin Československej spoločnosti mikrobiologickej suplement Aktuálne problémy mikrobiológie a imunológie Vedecká konferencia s medzinárodnou účasťou*. Košice, 1999. ISBN 80-88985-08-0. S. 189-190.

FRISVAD, J. C. 1995. Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Storage. In JAYAS, D. S., WHITE, N. D. G, MUIR, W. E.: *Stored-Grain Ecosystems*. New York : Marcell Dekker, Inc. 1995. p. 251-288.

FRISVAD, J. C., FRANK, J. M., HOUBRAKEN, J. A. M. P., KUIJPERS, A. F. A., SAMSON, R. A. 2004a. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. In *Studies in Mycology*. 2004a, vol. 50, p. 23-43.

FRISVAD, J. C., LARSEN, T. O., DE VRIES, R., MEIJER, M., HOUBRAKEN, J., CABAÑES, F. J., EHRLICH, K., SAMSON, R. A. 2007a. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. In *Studies in Mycology*. 2007a, vol. 59, p. 31-37.

FRISVAD, J. C., NIELSEN, K. F. 2009. Biodiversity and accurate identification of mycotoxin producing fungi: lecture. *ISM Conference*. Tulln, 2009.

FRISVAD, J. C., NIELSEN, K. F., SAMSON, R. A. 2006a. Recommendations concerning the chronic problem of misidentification of mycotoxigenic fungi associated with foods and feeds. In HOCKING, A. D., PITT, J., SAMSON, R. A., THRANE, U.: *Advances in Food Mycology*, vol. 571. Berlin : Springer, 2006a, p. 33-46.

FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. In *Studies in Mycology*. 2004, vol. 49, p. 1-174.

FRISVAD, J. C., SMEDSGAARD, J., LARSEN, T. O., SAMSON, R. A. 2004b. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. In *Studies in Mycology*. 2004b, vol. 49, p. 201-241.

FRISVAD, J. C., SMEDSGAARD, J., SAMSON, R. A., LARSEN, T. O., THRANE, U. 2007b. Fumonisin B₂ Production by *Aspergillus niger*. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007b, vol. 55, p. 9727-9732.

FRISVAD, J. C., THRANE, U. 1987. Standardized high performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on

alkylphenoneretention indices and UV-VIS spectra (diode array detection). In *Journal of Chromatography*. 1987, vol. 404, p. 195-214.

FRISVAD, J. C., THRANE, U. 2010. *Mycotoxin production by common filamentous fungi*. [online] [cit. 2010-05-27]. Dostupné na: <http://www.cbs.knaw.nl/service/food_mycotoxins.aspx>.

FRISVAD, J. C., THRANE, U., SAMSON, R. A. 2007c. Mycotoxin producers. In DIJKSTERHUIS, J., SAMSON, R. A. (eds.): *Food Mycology A Multifaceted Approach to Fungi and Food*. Boca Raton : CRC Press, 2007c. p. 135-159. ISBN 978-08493-9818-6.

FRISVAD, J. C., THRANE, U., SAMSON, R. A., PITT, J. I. 2006b. Important mycotoxins and the fungi which produce them. In HOCKING, A. D., PITT, J., SAMSON, R. A. et al.: *Advances in Food Mycology. Vol. 571*. Berlin : Springer, 2006b. p. 1-31.

FUMAGILLIN. 2010. [online] [cit. 2010-05-27]. Dostupné na: <<http://www.agscientific.com/fumagillin-aspergillus-fumigatus.html>>.

FUMAGILLIN: The Material that Controls *Nosema apis*. 2001. In *Apis* [online], 2001, vol. 19, no. 3, p. 1. [cit. 2010-05-27]. Dostupné na: <http://entomology.ifas.ufl.edu/sanford/apis/apis_2001/pdf/mar_ap01.pdf>.

GEISER, D. M. 2009. Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. In *Medical Mycology*. 2009, vol. 47. Supplement 1, S21-S26.

GEISER, D. M., KLICH, M. A., FRISVAD, J. C., PETERSON, S. W., VARGA, J., SAMSON, R. A. 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. In *Studies in Mycology*. 2007, vol. 59, p. 1-10.

GIORNI, P., MAGAN, N., PIETRI, A., BERTUYYI, T., BATTILANI, P. 2007. Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. In *International Journal of Food Microbiology*. 2007, vol. 113, p. 330-338.

GOVEK, S. P., OVERMAN, L. E. 2007. Total synthesis of (D)-asperazine. In *Tetrahedron*. 2007, vol. 63, p. 8499-8513.

HAMASAKI, T., SATO, Y., HATSUDA, Y. 1975. Isolation of New Metabolites from *Aspergillus sydowi* and Structure of Sydowic Acid. In *Agricultural and Bioical Chemistry*. 1975, vol. 39, no. 12, p. 2337-2340.

HAN, J.-I., NA, K.-J. 2008. Dermatitis Caused by *Neosartorya hiratsukae* Infection in a Hedgehog. In *Journal of Clinical Microbiology*. 2008, vol. 46, no. 9, p. 3119-3123.

HANSON, J. R. 2008. *The Chemistry of Fungi*. [online] [cit. 2010-05-27]. Náhl'ad dostupný na: <http://books.google.sk/books?id=nYNPSSc-sFQC&pg=PA129&lpg=PA129&dq=auroglaucin&source=bl&ots=hV-CdxF7Yc&sig=qsgPNzjOAriOuR19234PEXFn4rU&hl=sk&ei=i3j7S5m4NJCROLv9hcwB&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=4&ved=0CC0Q6AEwAw#v=onepage&q=auroglaucin&f=false>.

-
- HOCKING, A. D., PITT, J. I., SAMSON, R. A., THRANE, U. 2006. *Advances in Food Mycology*, vol. 571. Berlin : Springer, 2006. 378 p. ISBN 0-387-28385-4.
- HOFMAN, G. 2005. *Aspergillus nidulans: Growth and Metabolic Regulation* : Ph. D. Thesis. Lyngby : DTU, 2005. 126 p.
- HORN, B. W., MOORE, G. G., CARBONE, I. 2009a. Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. In *Mycologia*. 2009a, vol. 101, no. 3, p. 423-429.
- HORN, B. W., RAMIREZ-PRADO, J. H., CARBONE, I. 2009b. The sexual state of *Aspergillus parasiticus*. In *Mycologia*. 2009b, vol. 101, no. 2, p. 275-280.
- HOUBRAKEN, J., DUE, M., VARGA, J., MEIJER, M., FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A. 2007. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Usti*. In *Studies in Mycology*. 2007, vol. 59, p. 107-128.
- CHRISTENSEN, C. M., SAUER, D. B. 1982. Microflora in storage of cereal grains and their products. In CHRISTENSEN, C. M.: *The American Association of Cereal Chemists*. St. Paul, MN : Eagan Press, 1982.
- IARC (WHO International Agency for Research on Cancer). 2001. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Tyrotropic Agents. Vol. 79*. Lyon : IARC, 2001. 773 p. ISSN: 1017-1606.
- INDEX FUNGORUM. 2010. [online] [cit. 2010-05-27]. Dostupné na: <<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>>.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 1997. *Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants*. Forty-Sixth Meeting of the JECFA. WHO Technical Report Series No. 868, 1997.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 2001. *Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food*. Fifty-Sixth Meeting of the JECFA. FAO Food and Nutrition Paper 74, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2001.
- JESENSKÁ, Z. 1987. *Mikroskopické huby v požívatinách a v krmivách*. Bratislava : Alfa, 1987. 319 s.
- JOHNSON, D. N., EGNER, P. A., OBRIAN, G., GLASSBROOK, N., ROEBUCK, B. D., SUTTER, T. R., PAYNE, G. A., KENSLER, T. W., GROOPMAN, J. D. 2008. Quantification of urinary aflatoxin B₁ dialdehyde metabolites formed by aflatoxin aldehyde reductase using isotope dilution tandem mass spectrometry. In *Chemical research in toxicology*. 2008, vol. 21, no. 3, p. 752-760.
- KANO, K., KOHNO, S., KATADA, J., HAYASHI, Y., MURAMATSU, M., UNO, I. 1999. Antitumor Activity of Phenylahistin *in Vitro* and *in Vivo*. In *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*. 1999, vol. 63, no. 6, p. 1130-1133.
- KIRK, P. M., CANNON, P. F., DAVID, J. C., STALPERS, J. A. 2001. *Dictionary of the Fungi*. 9th ed. Wallingford : CAB INTERNATIONAL, 2001. 655 p. ISBN 085199377 X.
-

-
- KLICH, M. A. 2002. *Identification of common Aspergillus species*. Utrecht : Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116 p. ISBN 90-70351-46-3.
- KOCHANSKY, J., NASR, M. 2004. Laboratory studies on the photostability of fumagillin, the active ingredient of Fumidil B₁. In *Apidologie*. 2004, vol. 35, p. 301-310.
- KONG, H., QI, Z. 1995a. Two new species of *Eurotium* isolated from Xizang (Tibet), China. In *Acta Mycologica Sinica*. 1995a, vol. 14, no. 2, p. 86-91.
- KONG, H., QI, Z. 1995b. Two new species of *Eurotium* Link. In *Acta Mycologica sinica*. 1995b, vol. 14, no. 1, p. 10-16.
- KOZAKIEWICZ, Z. 1989. *Aspergillus species on stored products*. Walingford : CAB International, 1989. 188 p. ISBN 0 85198 632 3.
- KOZAKIEWICZ, Z. 2001. *Aspergillus*. In HUI, Y. U., SMITH, R. A., SPOERKE, D. G.: *Foodborne Disease Handbook. Vol. 3*. New York : Marcell Dekker, Inc., 2001. p. 471-501.
- KUBÁTOVÁ, A. 2006. *Atlas mikroskopických saprotrofních hub (Ascomycota)*. [online] [cit. 2010-05-27]. Dostupné na: <http://www.botany.natur.cuni.cz/cz/lide/kubatova_atlas.php>.
- KURTZMAN, C. P., HORN, B. W., HESSELTINE, C. W. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. In *Antonie van Leeuwenhoek*. 1987, vol. 53, p. 147-158.
- LABUDA, R. 2010. Toxinogénne huby a ich metabolity v potravinovom reťazci : habilitačná prednáška. Nitra: SPU, 2010
- LABUDA, R., TANČINOVÁ, D. 2006. Fungi recovered from slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenity. In *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2006, vol. 13, p. 193-200.
- LACEY, J. 1989. Pre-harvest and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. In *Journal of Applied Bacteriology*. 1989, vol. 67, p. 11-25.
- LEE, Y. M., LI, H., HONG, J., CHO, H., Y., BAE, K. S., KIM, M. A., KIM, D. K., JUNG, J. H. 2010. Bioactive Metabolites from the Sponge-Derived Fungus *Aspergillus versicolor*. In *Archives of Pharmacal Research*. 2010, vol 33, no. 2, p. 231-235.
- LINDER, M. B., SZILVAY, G. R., NAKARI-SETÄLÄ, T., PENTTILÄ, M. E. 2005. Hydrophobins: the , protein-amphiphiles of filamentous fungi. In *FEMS Microbiol Reviews*. 2005, vol. 29, no. 5, p. 877-96.
- LIZOŇ, P., BACIGÁLOVÁ, K. 1998. Fungi. In MARHOLD, K., HINDÁK, F. (Eds.) *Checklist of non vascular and vascular plants of Slovakia*. Bratislava : Veda, 1998, s. 101-227.
- LUND, F., FRISVAD, J. C. 2003. *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxín A. In *Journal of Applied Microbiology*. 2003, vol. 95, p. 117-123.
-

MAGAN, N., ALDRED, S. 2007. Why do fungi produce mycotoxins? In DIJKSTERHUIS, J., SAMSON, R. A. (eds.): *Food Mycology A Multifaceted Approach to Fungi and Food*. Boca Raton : CRC Press, 2007. p. 123-133. ISBN 978-08493-9818-6.

MALÍŘ, F., OSTRÝ, V. et al. 2003. *Vláknité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. Brno : Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003. 349 s.

MAPARI, S. A. S. 2009. *Chemotaxonomic Exploration of Fungal Biodiversity for Polyketide Natural Food Colorants... Discovery & ivaluation of cell factories, and characterization of pigments* : Ph.D. Thesis. Lyngby : DTU, 2009. 152 p.

MAPY KRAJOV. 2010. [online] [cit. 2010-05-27]. Dostupné na: <http://www.google.sk/imgres?imgurl=http://www.cdb.sk/files/img/sr-kraje-590.jpg&imgrefurl=http://www.cdb.sk/sk/Vystupy-CDB/Mapy-a-data-o-cestnej-sieti/Mapy-krajov.alej&usg=__cU5kZOTRD-X10P3_vJKK0xkyPfQ=&h=290&w=589&sz=40&hl=sk&start=1&sig2=RmYUSzBBHyggFkDMt9ySVw&um=1&itbs=1&tbnid=MoJ_yFGsSetUDM:&tbnh=66&tbnw=135&prev=/images%3Fq%3Dmapa%2Bkraje%2Bsr%26um%3D1%26hl%3Dsk%26client%3Dfirefox-a%26sa%3DX%26rls%3Dorg.mozilla:sk:official%26channel%3Ds%26tbs%3Disch:1&ei=aV0HTLr3M4qSmwOfq4DdCw>.

MARÍN, S., ABELLANA, M., RUBINAT, M., SANCHIS, V., RAMOS, A. J. 2003. Efficacy of sorbates on the control of the growth of *Eurotium* species in bakery products with near neutral pH. In *Internation Journal of Food Microbiology*. 2003, vol. 87, p. 251-258.

MILLER, J. D. 2002. Aspects of the ecology of *Fusarium* toxins in cereals. In DE VRIES, J. W., TRUCKSESS, M. W., JACKSON, L. S.: *Mycotoxins and Food Safety*. New York : Kluver Academic/ Plenum Publishers, 2002. p. 19-27.

MILOVÁ, V. 2010. Štúdium vybraných druhov rodu *Eurotium* : diplomová práca. SPU : Nitra, 2010. 105 s.

MIYAKE, Y., ITO, C., ITOIGAWA, M., OSAWA, T. 2007. Isolation of the antioxidant pyranonigrin-A from rice mold starters used in manufacturing process of fermented foods. In *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*. [online] 2007, vol. 71, no. 10, p. 2515-2521. [cit. 2010-05-27]. Abstrakt dostupný na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17928714>>.

MIYAKE, Y., ITO, CH., TOKUDA, H., OSAWA, T., ITOIGAWA, M. 2010. Evaluation of Flavoglucanin, Its Derivates and Pyranonigrins Produced by Molds Used in Fermented Foods for Inhibiting Tumor Promotion. In *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*. 2010, vol. 74, no. 5, p. 1120-1122.

-
- MOSS, M. O. 1991. The environmental factors controlling mycotoxin formation. In SMITH, J. E., HENDERSON, R. S.: *Mycotoxins and Animal Foods*. Boca Raton : CRC Press, 1991. p. 37-56.
- MURAKAMI, H. 1971. Classification of the koji mold. In *The Journal of General and Applied Microbiology*. 1971, vol. 17, p. 281-309.
- NAGEL, C. H., SEMENIUK, G. 1947. Some mold-induced changes in shelled corn. In *Plant Physiology*. 1947, vol. 22, p. 20-23.
- NIELSEN, K. F., MOGENSEN, J. M., JOHANSEN, M., LARSEN, T. O., FRISVAD, J. C. 2009. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, vol. 395, p. 1225-1242.
- O'GORMAN, C. M., FULLER, H. T., DYER, P. S. 2008. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. In *Nature*. 2009, vol. 475, p. 471-474.
- OMINSKI, K. H., MARQUARDT, R. R., SINHA, R. N., ABRAMSON, D. 1994. Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. In MILLER, J. D., TRENHOLM, H. L.: *Mycotoxins in Grain Compounds Other Than Aflatoxin*. St. Paul, MN : Eagan Press, 1994. p. 287-312.
- OSOBNÁ ÚSTNA KOMUNIKÁCIA. FRISVAD, J. C. 2007.
- OSOBNÁ ÚSTNA KOMUNIKÁCIA. FRISVAD, J. C. 2009.
- OSOBNÁ ÚSTNA KOMUNIKÁCIA. LABUDA, R. 2009.
- OSOBNÁ ÚSTNA KOMUNIKÁCIA. PITT, J. I. 2009.
- PARAMENSWARAN, P. S., GAWAS, D., TILVI, S., NAIK, CH. G. 2004. Biological Active Anthraquinone Analogs from the Fungus *Eurotium* Sp. In *Proceedings of MBR 2004 National Seminar on New Frontiers in Marine Bioscience Research*. 2004. p 3-9.
- PARIDE, A., YOSHIKAZU, H., YAN, H., KAZUKO, N., RUOYU, L. 2001. New and interesting species of *Eurotium* from Chinese soil. In *Mycoscience*. 2001, vol. 42, p. 289-294.
- PENA, G. A., PEREYRA, C. M., ARMANDO, M. R., CHIACCHIERA, S. M., MAGNOLI, C. E., ORLANDO, J. L., DALCERO, A. M., ROSA, C. A. R., CAVAGLIERI, L. R. 2009. *Aspergillus fumigatus* toxicity and gliotoxin levels in feedstuff for domestic animals and pets in Argentina. In *Letters in Applied Microbiology*. 2009, vol. 50, no. 1, p. 77-81.
- PERAICA, M., DOMIJAN, A.-M., JURCEVIĆ, Ž., CVJETKOVIĆ, B. 2002. Prevention of exposure to mycotoxins from food and feed. In *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 2002, vol. 53, no. 3, p. 229-237.
- PERRONE, G., SUSCAL, A., COZZIL, G., EHRLICH, K., VARGA, J., FRISVAD, J. C., MEIJER, M., NOONIM, P., MAHAKARNCHANAKUL, W., SAMSON, R. A. 2007. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. In *Studies in Mycology*. 2007, vol. 59, p. 53-66.
-

-
- PESHIN, S. S., LALL, S. B., GUPTA, S. K. 2002. Potential food contaminants and associated health risks. In *Acta Pharmacologica Sinica*. 2002, vol. 23, p. 193-202.
- PETERSON, S. W. 2008. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. In *Mycologia*. 2008, vol. 100, no. 2, p. 205-226.
- PETERSON, S. W., ITO, Y., HORN, B. W., GOTO, T. 2001. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. In *Mycologia*. 2001, vol. 93, no. 4, p. 689-703.
- PICKHARDT, M., GAZOVA, Z., VON BERGEN, M., KHLISTUNOVA, I., WANG, Y., HASCHER, A., MANDELKOV, E.-M., BIERNAT, J., MANDELKOW, E. 2005. Anthraquinones Inhibit Tau Aggregation and Dissolve Alzheimer's Paired Helical Filaments *in Vitro* and in Cells. In *The Journal of Biological Chemistry*. 2005, vol. 280, no. 5, p. 3628-3635.
- PIECKOVÁ, E., JESENSKÁ, Z. 2001. *Fusarium moniliforme*, *F. subglutinans* and *Aspergillus flavus* in maize products in Slovakia. In *Czech Mycology*. 2001, vol. 53, p. 229-235.
- PILDAIN, M. B., FRISVAD, J. C., VAAMONDE, G., CABRAL, D., VARGA, J., SAMSON, R. A. 2008. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. In *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2008, vol. 58, p. 725-735.
- PITT, J. I. 1985. Nomenclatorial and taxonomic problems in the genus *Eurotium*. In SAMSON, R. A., PITT, J. I.: *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. New York and London : Plenum Press, 1985. p. 383-396.
- PITT, J. I. 2000. Toxigenic fungi: which are important? In *Medical Mycology*. 2000, vol. 38, p. 17-22.
- PITT, J. I., BASÍLICO, J. C., ABARCA, M. L., LÓPEZ, C. 2000. Mycotoxins and toxigenic fungi. In *Medical Mycology*. 2000, vol. 38, p. 41-46.
- PITT, J. I., HOCKING, A. D. 1999. *Fungi and Food Spoilage*. 2nd ed. Maryland : An Aspen Publication, 1999. 593 p. ISBN 0-8342-1306-0.
- PITT, J. I., HOCKING, A. D. 2009. *Fungi and Food spoilage*. 3rd ed. New York : Springer, 2009. 519 p. e-ISBN 978-0-378-92207-2.
- PITT, J. I., SAMSON, R. A. 1990. Taxonomy of *Aspergillus* section *Restricta*. In SAMSON, R. A., PITT, J. I. (eds): *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*. New York : Plenum Press, 1990. P. 249-257.
- RAMACHANDRA PAI, M., JAYANTHI BAI, N., VENKITASUBRAMANIAN, T. A. Production of Aflatoxin M in a Liquid Medium. In *Applied Microbiology*. 1975, vol. 29, no. 6, p. 850-851.
- SAITO, M., MACHIDA, S. 1999. A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. In *Mycoscience*. 1999, vol. 40, p. 205-208.
-

-
- SAMSON, R. A. 1979. A compilation of the aspergilli described since 1965. In *Studies in Mycology*. 1979, vol. 18, 38 p.
- SAMSON, R. A., FRISVAD, J. C. 2004. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. In *Studies in Mycology*. 2004, vol. 49, 251 p.
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O. 2002a. *Introduction to Food- and Airborne Fungi*. 6th revised ed. (with some corrections). Utrecht : Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 389 p. ISBN 90-70351-42-0.
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., LUND, F., FILTENBORG, O., FRISVAD, J. C. 2002b. Method for the detection, isolation and characterisation of food-borne fungi. In SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O.: *Introduction to food- and airborne fungi*. 6th revised ed. (with some corrections). Utrecht : Centraalbureau voor Schimmecultures, 2002. p. 283-297.
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E., HOUBRAKEN, J., FRISVAD, J. C., SEIFERT, K. A. 2003-2010. Biodiversity of *Penicillium*, *Aspergillus* and related genera : Project IFA 2.01.01. [online] [cit. 2010-05-27]. Dostupné na: <<http://www.cbs.knaw.nl/Research/appliedProjects.aspx>>.
- SAMSON, R. A., HONG, S. B., FRISVAD, J. C. 2006. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. In *Medical Mycology*. 2006, vol. 44, S133-S148.
- SAMSON, R. A., HONG, S., PETERSON, S. W., FRISVAD, J. C., VARGA, J. 2007a. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. In *Studies in Mycology*. 2007a, vol. 59, p. 147-203.
- SAMSON, R. A., NOONIM, P., MEIJER, M., HOUBRAKEN, J., FRISVAD, J. C., VARGA, J. 2007b. Diagnostic tools to identify black aspergilli. In *Studies in Mycology*. 2007b, vol. 59, p. 129-145.
- SAMSON, R. A., VARGA, J. 2009. What is a species in *Aspergillus*? In *Medical Mycology*. 2009, S1-S8.
- SAMSON, R. A., VARGA, J. eds. 2007. Preface. *Aspergillus* systematics in the genomic era. In *Studies in Mycology*. 2007, vol. 59.
- SCOTT, P. M. 2004. Other mycotoxins. In MAGAN, N., OLSEN, M. (eds.): *Mycotoxins in food. Detection and control*. Cambridge : Woodhead Publishing Limited, 2004. P. 406-440. ISBN (e-book) 1 85573 908 9.
- SCOTT, P. M., VAN WALBEEK, W., MACLEAN, W. M. 1971. Cladosporin, a new antifungal metabolite from *Cladosporium cladosporioides*. In *The Journal of Antibiotics*. 1971, vol. 24, no. 2, p. 747-755.
- SCHUSTER, E., DUNN-COLEMAN, N., FRISVAD, J. C., VAN DIJCK, P. W. M. 2002. On the safety of *Aspergillus niger*- a review. In *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002, vol. 59, p. 426-435.
- SINGH, K., FRISVAD, J. C., THRANE, U., MATHUR, S. B. 1991. *An Illustrated Manual on Identification of some Seed-borne Aspergilli, Fusaria, Penicillia and their*
-

Mycotoxins. Hellerup : Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, 1991. 133 p. ISBN 87-7026-3175.

SLACK, G. J., PUNIANI, E., FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A., MILLER, J. D. 2009. Secondary metabolites from *Eurotium* species, *Aspergillus calidoustus* and *A. insuetus* common in Canadian homes with a review of their chemistry and biological activities. In *Mycological research*. 2009, vol. 113, p. 480-490.

SMEDSGAARD, J. 1997. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. In *Journal of Chromatography*. 1997, vol. 760, p. 264-270.

SMITH, J. E., ROSS, K. 1991. The toxigenic aspergilli. In SMITH, J. E., HENDERSON, R. S.: *Mycotoxins and Animal Foods*. Boca Raton : CRC Press, 1991. p. 101-118.

STN 56 0087 (ISO 7954) R – 12: 2010. Dôkaz potenciálnych toxinogénnych húb rodov *Aspergillus* a *Penicillium*. [online] [cit. 2010-05-27]. Dostupné na: <http://test.uvtip.sk/mpsrarchiv/slovak/menu/vestniky_2004/1_35.pdf>.

STUBBLEFIELD, R. D., SHANNON, G. M., SHOTWELL, O. L. 1970. Aflatoxins M₁ and M₂: Preparation and purification. In *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1970, vol. 47, no. 10, p. 389-390.

SULYOK, M., KRŠKA, R., SCHUHMACHER, R. 2007. Application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method to multi-mycotoxin determination in raw cereals and evaluation of matrix effects. In *Food Additives and Contaminants*. 2007, vol. 24, no. 10, p. 1184-1195.

SUN, Z., QI, Z. 1994. New taxa and a new record of *Aspergillus* and *Eurotium*. In *Acta Mycologica Sinica*. 1994, vol. 13, no. 2, p. 81-87.

ŠIMONOVÍČOVÁ, A. 2001. Supplement to the Checklist of non-vascular and vascular plants of Slovakia. The species of microscopic fungi of the order *Eurotiales*. In *Czech Mycology*. 2001, vol. 53, no. 2, p. 173-187.

ŠIMONOVÍČOVÁ, A. 2002. Pôdne mikroskopické huby nové pre Slovensko (rad *Eurotiales*, čeľaď *Trichocomaceae*). In *Život v pôde 3*. Bratislava, 2002. s. 22-23.

ŠIMONOVÍČOVÁ, A. 2008. *Soil microscopic fungi of Slovakia I. Letter of alphabet from A to N*. Kežmarok : Tlačiareň Kežmarok, 2008. 128 s. ISBN 978-80-969678-5-8.

ŠTEVLÍKOVÁ, T., JAVOREKOVÁ, S., TANČINOVÁ, D., VJATRÁKOVÁ, J. 2001. *Mikrobiológia I. časť. 2*. vyd. Nitra : Vydavateľské a edičné stredisko SPU, 2001. 105 s. ISBN 80-7137-843-7.

TANČINOVÁ, D., DOVIČIČOVÁ, M., LABUDA, R. 2007. *Aspergillus* Sekcia *Flavi-* potenciálny producent mykotoxínov. In *Zborník z medzinárodnej konferencie Rizikové faktory potravného reťazca*. Nitra : SPU, 2007, s. 219-223.

TANČINOVÁ, D., KAČÁNIOVÁ, M., JAVOREKOVÁ, S. 2001. Natural occurrence of fungi in feeding wheat after harvest and during storage in the agricultural farm facilities. In *Biologia*. 2001, vol. 56, p. 247-250.

-
- TANČINOVÁ, D., LABUDA, R. 2006. Mykotická kontaminácia vybraných surovín rastlinného pôvodu. In Kolektív autorov: *Výživná a technologická kvalita rastlinných produktov a ich potravinárske využitie*. Nitra : SPU, 2006, s. 167-194.
- TANČINOVÁ, D., LABUDA, R. 2009. Fungi on wheat bran and their toxinogenity. In *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2009, vol. 16, p. 325-331.
- TANČINOVÁ, D., LABUDA, R., DOVIČIČOVÁ, M. 2006. Mykotická kontaminácia potravinárskej pšenice. In *Zborník z XI. ročníka medzinárodného vedeckého seminára Aktuálne problémy riešené v agrokomplexe*. Nitra : SPU, 2006, s. 213-220.
- TERPHENYLLIN. 2010. [online] [cit. 2010-05-27]. Dostupné na: <<http://www.bioaustralis.com/pdfs/terphenyllin.pdf> >.
- THOM, Ch., RAPER, K. B. 1945. *A Manual of the Aspergilli*. Baltimore : The Williams & Wilkins Company, 1945. 373 p.
- VARGA, J., FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A. 2007a. Taxonomic revision of *Aspergillus* section *Clavati* based on molecular, morphological and physiological data. In *Studies in Mycology*. 2007, vol. 59, p. 89-106. 2007.
- VARGA, J., FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A. 2007b. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Candidi* based on molecular, morphological and physiological data. In *Studies in Mycology*. 2007b, vol. 59, p. 75-88.
- VARGA, J., KEVEI, E., RINYU, E., TÉREN, J., KOZAKIEWICZ, Z. 1996. Ochratoxin Production by *Aspergillus* Species. In *Applied and environmental microbiology*. 1996, vol. 62, no. 12, p. 4461-4464.
- VEIGA, T. A. M., GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, R., NETO, J. O., SILVA, M., F. G. F., KING-DÍAZ, B., LOTINA-HENNSEN, B. 2007. Siderin from *Toona ciliata* (Meliaceae) as photosystem II inhibitor on spinach thylakoids. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online] 2007, vol. 465, no. 1, p. 38-43 [cit. 2010-05-27].
Abstrakt dostupný na:
<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WB5-4NT9J8N-2&_user=7292406&_coverDate=09%2F01%2F2007&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1356650864&_rerunOrigin=google&_acct=C000061504&_version=1&_urlVersion=0&_userid=7292406&md5=2ac7b3b7d14253ee7eca837f659f0a1d>.
- VESONDER, R. F., LAMBERT, R., WICKLOW, D. T., BIEHL, M. L. 1988. *Eurotium* spp. and Echinulin in Feed Refused by Swine. In *Applied and Environmental Microbiology*. 1988, vol. 54, no. 3, p. 830-831.
- VOTAVA, M. et al. 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno : Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
- WEBSTER, J., WEBER, R., W., S. 2007. *Introduction to Fungi*. 3rd ed. p. cm. Cambridge : Cambridge University Press, 2007. 841 p. ISBN-13 978-0-521-01483-0; ISBN-10 0-521-01483-2.
-

-
- WEI, M.-Y., WANG, CH.-Y., LIU, Q.-A., SHAO, CH.-L., SHE, Z.-G., LIN, Y.-CH. 2010. Five Sesquiterpenoids from a Marine-Derived Fungus *Aspergillus* sp. Isolated from a Gorgonian *Dichotella gemmacea*. In *Marine Drugs*. 2010, vol. 8, p. 941-949.
- WELTY, R. E., CHRISTENSEN, C. M. 1965. Negatively Phototropic Growth of *Aspergillus restrictus*. [online] [cit. 2010-05-27]. Dostupné na: <<http://www.jstor.Org/pss/3756832>>.
- WÖSTEN, H. A. B. 2001. Hydrophobins: Multipurpose Proteins. In *Annual Review of Microbiology*. 2001, vol. 55, p. 625-646.
- WÖSTEN, H. A. B., DE VOCHT, M. L. 2000. Hydrophobins, the fungal coat unravelled. In *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*. 2000, vol. 1469, no. 2, p. 79-86.
- WU, CH.-H., YEN, G.-CH. 2004. Antigenotoxic properties of Cassia tea (*Cassia tora* L.): Mechanism of action and the influence of roasting process. In *Life Sciences*. 2004, vol. 76, no. 1, p. 85-101.
- ZALAR, P., FRISVAD, J. C., GUNDE-CIMERNA, N., VARGA, J., SAMSON, R. A. 2008. Four new species of *Emericella* from the Mediterranean region of Europe. In *Mycologia*. 2008, vol. 100, no. 5, p. 779-795.

7 Prílohy

Príloha 1 Výsledky izolácií aspergilov z jednotlivých vzoriek zrna

Príloha 2 CD-ROM s elektronickým plným textom dizertácie

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA
3003783

**ŠTÚDIUM POTENCIÁLNE TOXINOGENNÝCH DRUHOV
RODU *ASPERGILLUS* A ASOCIOVANÝCH TELEOMORF
IZOLOVANÝCH ZO ZRNA PŠENICE SLOVENSKÉHO
PÔVODU**

PRÍLOHA 1
**VÝSLEDKY IZOLÁCIÍ ASPERGILOV Z JEDNOTLIVÝCH
VZORIEK ZRNA**

2010

Mária Dovičičová, Ing.

Tab. 33 Aspergily izolované zo vzorky 1/ 2006 (*Triticum aestivum* L., odroda Arida, žatva 2006, Veľké Lovce)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus fumigatus</i>			1				
<i>Aspergillus niger</i> komplex				1			

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 34 Aspergily izolované zo vzorky 5/ 2006 (*Triticum aestivum* L., odroda Axis, žatva 2006, Oponice)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus ochraceus sensu lato</i>			1				

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 35 Aspergily izolované zo vzorky 6/ 2006 (*Triticum aestivum* L., odroda Axis, žatva 2006, Oponice)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus versicolor</i> neurčená skupina		1					

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 36 Aspergily izolované zo vzorky 11/ 2006 (*Triticum aestivum* L., žatva 2006)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné		
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC	DCPA
<i>Aspergillus flavus</i>								1 ¹
<i>Eurotium amstelodami</i>		1	1					
<i>Eurotium chevalieri</i>		1	3				3	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); DCPA- agar

(pokračovanie Tab. 35) s dichlóranom, chloramfenikolom a peptónom (Burgess et al., 1988); ¹producent kyseliny cyklopiazonovej, nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁

Tab. 37 Aspergily izolované zo vzorky 13/ 2006 (*Triticum aestivum* L., odroda Axis, žatva 2006)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrna		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus clavatus</i>		1 ¹					
<i>Eurotium amstelodami</i>		1		1		9	1
<i>Eurotium chevalieri</i>						1	
<i>Eurotium repens</i>							1
<i>Eurotium rubrum</i>						1	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹nebola zistená produkcia patulínu

Tab. 38 Aspergily izolované zo vzorky 14/ 2006 (*Triticum aestivum* L., odroda Capo, žatva 2006)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrna		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus niger</i> komplex			1				

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 39 Aspergily izolované zo vzorky 15/ 2006 (*Triticum aestivum* L., odroda Josef, žatva 2006)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrna		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>						2 ^{1,2}	
<i>Aspergillus tubingensis</i>							1

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ^{1,2}producent kyseliny cyklopiazonovej, nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁

Tab. 40 *Aspergily izolované zo vzorky 16/ 2006 (Hordeum vulgare L., odroda Epsom, žatva 2006)*

osídlenie zrna:	povrchové		zomleté zrna		vnútorné			
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC	DCPA
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>								1 ¹

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); DCPA- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a peptónom (Burgess et al., 1988); ¹producent ochratoxínu A

Tab. 41 *Aspergily izolované zo vzorky 17/ 2006 (Triticum spelta L., odroda Francenkorn, žatva 2006)*

osídlenie zrna:	povrchové		zomleté zrna		vnútorné		
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus clavatus</i>		2 ¹					
<i>Aspergillus flavus</i>							1 ²
<i>Aspergillus fumigatus</i>		1 ³					
<i>Aspergillus niger</i> komplex						1 ⁴	
<i>Aspergillus tritici</i>		1					
<i>Eurotium amstelodami</i>		2 ⁵				4	1
<i>Eurotium chevalieri</i>		5				3	
<i>Eurotium repens</i>						2	
<i>Eurotium</i> sp.		1				1	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹producent patulínu, tryptoquivalínov a tryptoquivalónu A; ²nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁ a kyseliny cyklopiazonovej; ³producent fumigaklavínu, fumiquinazolínu A, pseurotínu A, (TR-2/ fumitremorgínu C, verukulogénu); ⁴nebola zistená produkcia ochratoxínu A a fumonizínu B₂; ⁵producent echinulínu a flavoglaucínu

Tab. 42 Aspergily izolované zo vzorky 18/ 2006 (*Triticum aestivum* L., odroda Capo, žatva 2006)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>					1 ¹		
<i>Aspergillus sydowii</i>						1	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹producent kyseliny cyklopiazonovej, nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁

Tab. 43 Aspergily izolované zo vzorky 19/ 2006 (*Triticum aestivum* L., žatva 2006)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>		2 ¹				1 ²	
<i>Aspergillus tritici</i>							1 ³
<i>Emericella nidulans</i>							1 ⁴
<i>Eurotium amstelodami</i>		1				1	1
<i>Eurotium cristatum</i>						3	1
<i>Eurotium chevalieri</i>							3
<i>Eurotium</i> sp.				2			

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁ a kyseliny cyklopiazonovej; ²? producent kyseliny cyklopiazonovej (±), nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁; ³producent terfenylínu a xantoascínu; ⁴producent austdiolu a sterigmatocystínu

Tab. 44 Aspergily izolované zo vzorky 20/ 2006 (*Triticum aestivum* L., odroda Axis, žatva 2006)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>							1 ¹
<i>Aspergillus niger</i> komplex		2 ²					1
<i>Aspergillus</i> sp.		1					
<i>Eurotium amstelodami</i>		2				7	
<i>Eurotium chevalieri</i>						1 ³	
<i>Eurotium rubrum</i>						1	

(pokračovanie Tab. 43)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrna		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Eurotium</i> sp.				1		3	1

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹producent kyseliny cyklopiazonovej, nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁; ²nebola zistená produkcia ochratoxínu A; ³producent pravdepodobne questínu a metabolitu podobného questínu

Tab. 45 *Aspergily izolované zo vzorky 21/ 2006 (Triticum aestivum L., odroda Josef, žatva 2006)*

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrna		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>		1 ¹					
<i>Aspergillus fumigatus</i>		1					
<i>Aspergillus versicolor</i> skupina II					1 ²		
<i>Aspergillus versicolor</i> neurčená skupina		2 ³					

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹? producent kyseliny cyklopiazonovej (±), nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁; ²producent sterigmatocystínu; ³producent sterigmatocystínu

Tab. 46 *Aspergily izolované zo vzorky 22/ 2006 (Triticum aestivum L., odroda Axis, žatva 2006)*

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrna		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>						2 ^{1,2}	
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>						1 ³	
<i>Eurotium repens</i>						1	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ^{1, 2}nebola

(pokračovanie Tab. 45) zistená produkcia aflatoxínu B₁ a kyseliny cyklopiazonovej;
³producent kyseliny penicilovej, viomeleínu, xantomegnínu a ochratoxínu A

Tab. 47 Aspergily izolované zo vzorky 1/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odroda Banquet, žatva 2007, Oponice)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus clavatus</i>		3					
<i>Aspergillus flavus</i>			1	3 ^{1,2}	2 ³		1
<i>Aspergillus niger</i> komplex			1				
<i>Aspergillus sydowii</i>							1
<i>Aspergillus</i> sp.							1

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ^{1, 2, 3}nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁ a kyseliny cyklopiazonovej

Tab. 48 Aspergily izolované zo vzorky 4/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odroda Sana, žatva 2007, Oponice)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>						1	3 ¹
<i>Aspergillus niger</i> komplex						1	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁

Tab. 49 Aspergily izolované zo vzorky 5/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odroda Karolinum, žatva 2007, Oponice)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus ochraceus sensu lato</i>							1

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 50 Aspergily izolované zo vzorky 6/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odroda Axis, žatva 2007, Oponice)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>							2 ¹
<i>Emericella nidulans</i>		1 ²					
<i>Eurotium repens</i>						1	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁ a kyseliny cyklopiazonovej; ²producent sterigmatocystínu

Tab. 51 Aspergily izolované zo vzorky 7/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odroda Hana, žatva 2007, Veľké Lovce)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné		
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC	DCPA
<i>Aspergillus flavus</i>								1 ¹
<i>Aspergillus fumigatus</i>		1	2					

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); DCPA- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a peptónom (Burgess et al., 1988); ¹producent kyseliny cyklopiazonovej, nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁

Tab. 52 Aspergily izolované zo vzorky 8/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odroda Karolinum, Veľké Lovce)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus ochraceus sensu lato</i>			1 ¹				
<i>Aspergillus versicolor</i> neurčená skupina			1 ²				
<i>Eurotium amstelodami</i>						12	2
<i>Eurotium chevalieri</i>						1	
<i>Eurotium herbariorum</i> skupina						5	
<i>Eurotium herbariorum/ rubrum</i>						1	
<i>Eurotium repens</i>						48	
<i>Eurotium rubrum</i>						7	
<i>Eurotium</i> sp.						8	2

(pokračovanie Tab. 51) DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹ nebola zistená produkcia ochratoxínu A; ² producent sterigmatocystínu

Tab. 53 Aspergily izolované zo vzorky 9/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odroda Anduril, žatva 2007, Bodorová)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrna		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus sydowii</i>					6		
<i>Eurotium repens</i>						2	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 54 Aspergily izolované zo vzorky 10/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odroda Evelina, žatva 2007, Bodorová)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrna		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus fumigatus</i>					1		
<i>Aspergillus</i> sp.							2
<i>Eurotium repens</i>						3	
<i>Eurotium rubrum</i>						1	
<i>Eurotium</i> sp.						1	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 55 Aspergily izolované zo vzorky 11/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odroda Ilias, žatva 2007, Bodorová)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrna		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>			1 ¹				
<i>Aspergillus</i> sp.		1					
<i>Eurotium herbariorum</i> skupina						2	
<i>Eurotium herbariorum/ rubrum</i>							1
<i>Eurotium repens</i>					1	2	
<i>Eurotium rubrum</i>						1	

(pokračovanie Tab. 54)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Eurotium</i> sp.						10	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁ a kyseliny cyklopiazonovej

Tab. 56 Aspergily izolované zo vzorky 12/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odroda Mv Vekni, žatva 2007, Bodorová)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Eurotium amstelodami</i>						2	
<i>Eurotium herbariorum/ rubrum</i>						1	
<i>Eurotium repens</i>						2	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 57 Aspergily izolované zo vzorky 13/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odroda Bosorka, žatva 2007, Bodorová)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus</i> sp.			3				
<i>Eurotium herbariorum</i> skupina					4	15	
<i>Eurotium repens</i>			6	1	6	7	
<i>Eurotium rubrum</i>			2			13	
<i>Eurotium</i> sp.			1			45	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 58 Aspergily izolované zo vzorky 14/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odroda Armelis, žatva 2007, Oponice)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus</i> sp.						1	
<i>Eurotium amstelodami</i>			1			5	
<i>Eurotium rubrum</i>						1	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 59 Aspergily izolované zo vzorky 15/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odroda Sana, žatva 2007, Oponice)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus fumigatus</i>		1					
<i>Aspergillus</i> sp.						1	
<i>Eurotium amstelodami</i>			1			1	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 60 Aspergily izolované zo vzorky 16/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odroda Banquet, žatva 2007, Oponice)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Eurotium amstelodami</i>		1				11	
<i>Eurotium repens</i>						1	
<i>Eurotium rubrum</i>						1	
<i>Eurotium</i> sp.						6	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 61 Aspergily izolované zo vzorky 17/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odroda Karolinum, žatva 2007, Oponice)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus fumigatus</i>					1		
<i>Eurotium amstelodami</i>						4	
<i>Eurotium repens</i>					1	1	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 62 Aspergily izolované zo vzorky 18/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odroda Axis, žatva 2007, Oponice)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>						1 ¹	1
<i>Aspergillus</i> sp.							1
<i>Eurotium amstelodami</i>						3	
<i>Eurotium repens</i>						2	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹producent kyseliny cyklopiazonovej, nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁

Tab. 63 Aspergily izolované zo vzorky 19/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odber Hana, žatva 2007, Veľké Lovce)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>		1				1 ¹	
<i>Aspergillus fumigatus</i>		1					
<i>Aspergillus niger</i> komplex		2 ²					
<i>Eurotium</i> sp.						1	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹producent kyseliny cyklopiazonovej, nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁; ²nebola zistená produkcia ochratoxínu A

Tab. 64 Aspergily izolované zo vzorky 20/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odroda Karolinum, žatva 2007, Veľké Lovce)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus fumigatus</i>						1	
<i>Aspergillus restrictus</i>		7					
<i>Aspergillus tritici</i>					1		
<i>Aspergillus versicolor</i> skupina II			1 ¹				
<i>Aspergillus versicolor</i> neurčená skupina					2		
<i>Aspergillus</i> sp.		1					
<i>Eurotium amstelodami</i>						6	
<i>Eurotium chevalieri</i>		1					
<i>Eurotium herbariorum</i> skupina						4	3
<i>Eurotium</i> sp.						7	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹producent sterigmatocystínu

Tab. 65 Aspergily izolované zo vzorky 21/ 2007 (*Triticum aestivum* L., vzorka Torysa, žatva 2007, Poprad)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus</i> sp.			1	1	1		
<i>Emericella nidulans</i>							1
<i>Eurotium chevalieri</i>						1	
<i>Eurotium herbariorum</i> skupina						1	
<i>Eurotium</i> sp.						1	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 66 Aspergily izolované zo vzorky 22/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odroda Saturnus, žatva 2007, Senec)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus tritici</i>						1	

(pokračovanie Tab. 65) DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 67 Aspergily izolované zo vzorky 23/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odroda Mv Suveges, žatva 2007, Komárno)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrna		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Eurotium amstelodami</i>						1	
<i>Eurotium chevalieri</i>						2	
<i>Eurotium repens</i>						1	
<i>Eurotium rubrum</i>						3	
<i>Eurotium</i> sp.						1	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 68 Aspergily izolované zo vzorky 24/ 2007 (*Triticum spelta* L., odroda Ceralio, žatva 2007, Stará Ľubovňa)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrna		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>		1 ¹					2 ²
<i>Aspergillus versicolor</i> neurčená skupina		3 ³		1			
<i>Aspergillus</i> sp.							10
<i>Eurotium appendiculatum</i>						9	
<i>Eurotium herbariorum</i> skupina		7	2	1		69	20
<i>Eurotium repens</i>						3	5
<i>Eurotium rubrum</i>		6				15	
<i>Eurotium</i> sp.						6	1

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹producent kyseliny cyklopiazonovej, nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁; ²? producent kyseliny cyklopiazonovej, nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁; ³producent sterigmatocystínu

Tab. 69 Aspergily izolované zo vzorky 25/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odroda Axis, žatva 2007, Galanta)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>							2 ¹
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>							1 ²
<i>Aspergillus</i> sp.						1	1
<i>Eurotium amstelodami</i>						4	
<i>Eurotium repens</i>						2	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹? producent kyseliny cyklopiazonovej (±), nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁; ²producent ochratoxínu A, viomeleínu a vioxantínu

Tab. 70 Aspergily izolované zo vzorky 26/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odrody Arida a Venistar, žatva 2007, Senec)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>		1 ¹					

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁ a kyseliny cyklopiazonovej

Tab. 71 Aspergily izolované zo vzorky 27/ 2007 (*Triticum aestivum* L., odrody Venistar a Jozef, žatva 2007, Senec)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrno		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus</i> sp.						1	
<i>Eurotium amstelodami</i>			1				

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 72 Aspergily izolované zo vzorky 28/ 2007 (*Triticum aestivum* L., žatva 2007, Dunajská Streda)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrna		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Eurotium amstelodami</i>						1	1

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 73 Aspergily izolované zo vzorky 29/ 2007 (*Triticum aestivum* L., žatva 2007, Nitra)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrna		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>					1 ¹		
<i>Eurotium herbariorum</i> skupina						1	
<i>Eurotium repens</i>						2	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹? producent kyseliny cyklopiazonovej (\pm), nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁

Tab. 74 Aspergily izolované zo vzorky 30/ 2007 (*Triticum aestivum* L., žatva 2007, Martin)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrna		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus candidus sensu lato</i>		1					1
<i>Aspergillus flavus</i>			1			30 ^{1,2,3}	24 ⁴
<i>Aspergillus fumigatus</i>				3 ⁵		1 ⁶	2 ⁷
<i>Aspergillus cf. melleus</i>							1 ⁸
<i>Aspergillus niger</i> komplex						1	1 ⁹
<i>Aspergillus terreus</i>			2	1 ¹⁰			
<i>Aspergillus tritici</i>		32	2	3		6 ¹¹	1
<i>Aspergillus tubingensis</i>							1
<i>Aspergillus versicolor</i> neurčená skupina		4 ¹²					
<i>Aspergillus</i> sp.		15	34	8		8	9
<i>Emericella nidulans</i>		1		1 ¹³			2
<i>Eurotium amstelodami</i>		3	1		1	8	
<i>Eurotium chevalieri</i>					1	1	

(pokračovanie Tab. 73)

osídlenie zrna:		povrchové		zomleté zrna		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Eurotium herbariorum</i>	skupina				1	12	
<i>Eurotium herbariorum/ rubrum</i>						1	
<i>Eurotium repens</i>			1			8	
<i>Eurotium rubrum</i>						2	
<i>Eurotium</i>	sp.	5	1			95	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ^{1, 2}producent kyseliny cyklopiazonovej, nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁; ^{3, 4}? producent kyseliny cyklopiazonovej (±), nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁; ⁵producent fumigaklavínu C, fumiquinazolínu, fumitremorgínov A a B, (TR-2/ fumitremorgínu C); ⁶producent fumigaklavínu C, fumitremorgínov A a B, pseurotínu A, (TR-2/ fumitremorgínu A) a ? verukulogénu; ⁷producent fumigaklavínu C, fumiquinazolínu A a fumitremorgínu A; ⁸producent ochratoxínu A; ⁹nebola zistená produkcia ochratoxínu A; ¹⁰? producent patulínu (±); ¹¹producent terfenylínu a xantoascínu; ^{12, 13}producent sterigmatocystínu

Tab. 75 Aspergily izolované zo vzorky 1/ 2008 (*Triticum aestivum* L., odroda Alfa, žatva 2008, Kolárovo)

osídlenie zrna:		povrchové		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	CY20S	DRBC
<i>Aspergillus clavatus</i>		1 ¹		1	
<i>Aspergillus flavus</i>		4 ²	4	4	7
<i>Aspergillus niger</i> komplex		4 ^{3, 4}			
<i>Aspergillus ochraceus sensu lato</i>		8			
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>		2 ⁵			
<i>Aspergillus</i> sp.		51	14		
<i>Emericella nidulans</i>			1 ⁶		
<i>Eurotium amstelodami</i>		4	20	23	5
<i>Eurotium amstelodami/ chevalieri</i>				3	
<i>Eurotium chevalieri</i>		1	34	31	4
<i>Eurotium cf. chevalieri</i>				4	
<i>Eurotium herbariorum</i> skupina				7	3
<i>Eurotium repens</i>				6	

(pokračovanie Tab. 74)

osídlenie zrna:		povrchové		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	CY20S	DRBC
<i>Eurotium</i> sp.		18	11	4	12

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); CY20S- Czapkov agar s kvasničným extraktom a obsahom sacharózy navýšeným na 20 % (Klich, 2002); ¹producent patulínu a tryptoquivalínu; ²producent kyseliny cyklopiazonovej, nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁; ^{3,4}nebola zistená produkcia ochratoxínu A; ⁵producent ochratoxínu A, viomeleínu a xantomegnínu; ⁶producent austdiolu a sterigmatocystínu

Tab. 76 Aspergily izolované zo vzorky 2/ 2008 (*Triticum aestivum* L., odroda Tapos, žatva 2008, Trnava)

osídlenie zrna:		povrchové		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus clavatus</i>					1 ¹
<i>Aspergillus versicolor</i> skupina II		1 ²			
<i>Aspergillus</i> sp.		1			
<i>Eurotium amstelodami</i>				1	
<i>Eurotium herbariorum</i> skupina				2	
<i>Eurotium rubrum</i>				7	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹producent patulínu; ²producent sterigmatocystínu

Tab. 77 Aspergily izolované zo vzorky 3/ 2008 (*Triticum aestivum* L., žatva 2008, Trnava)

osídlenie zrna:		povrchové		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus niger</i> komplex					1
<i>Aspergillus sydowii</i>			1		
<i>Aspergillus wentii</i>					1
<i>Aspergillus</i> sp.		2		77	6
<i>Eurotium amstelodami</i>		1	1	12	6
<i>Eurotium cf. amstelodami</i>					1
<i>Eurotium chevalieri</i>				3	1
<i>Eurotium herbariorum</i> skupina				1	

(pokračovanie Tab. 76)

osídlenie zrna:		povrchové		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Eurotium</i> sp.			1	1	12

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 78 Aspergily izolované zo vzorky 4/ 2008 (*Triticum aestivum* L., žatva 2008, Dolná Krupá)

osídlenie zrna:		povrchové		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus tritici</i>			3		
<i>Eurotium amstelodami</i>				1	
<i>Eurotium herbariorum/ rubrum</i>				2	
<i>Eurotium rubrum</i>				1	
<i>Eurotium</i> sp.				4	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 79 Aspergily izolované zo vzorky 5/ 2008 (*Triticum aestivum* L., odroda Alacris, žatva 2008, Poprad)

osídlenie zrna:		povrchové		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>					1 ¹
<i>Aspergillus fumigatus</i>		2			
<i>Aspergillus</i> sp.			1		
<i>Eurotium amstelodami</i>				12	
<i>Eurotium herbariorum</i> skupina				4	1
<i>Eurotium repens</i>				2	
<i>Eurotium repens/ herbariorum</i>				4	
<i>Eurotium rubrum</i>				2	
<i>Eurotium</i> sp.			1	4	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹ nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁ a kyseliny cyklopiazonovej

Tab. 80 Aspergily izolované zo vzorky 6/ 2008 (*Triticum aestivum* L., odroda Hana, žatva 2008, Poltár)

osídlenie zrna:		povrchové		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>				1 ¹	1
<i>Aspergillus parasiticus</i>					1 ²
<i>Aspergillus versicolor</i> neurčená skupina		1			1
<i>Aspergillus wentii</i>				2	
<i>Eurotium amstelodami</i>				1	
<i>Eurotium herbariorum</i> skupina				100	
<i>Eurotium herbariorum/ rubrum</i>				1	
<i>Eurotium rubrum</i>				63	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁ a kyseliny cyklopiazonovej; ²producent aflatoxínov B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ a kyseliny kojovej

Tab. 81 Aspergily izolované zo vzorky 7/ 2008 (*Triticum aestivum* L., odroda Baroko, žatva 2008, Beluša)

osídlenie zrna:		povrchové		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Eurotium herbariorum</i> skupina				1	
<i>Eurotium repens</i>				2	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 82 Aspergily izolované zo vzorky 8/ 2008 (*Triticum aestivum* L., odroda Etela, žatva 2008, Beluša)

osídlenie zrna:		povrchové		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus fumigatus</i>		1			
<i>Eurotium</i> sp.				1	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 83 Aspergily izolované zo vzorky 11/ 2008 (*Triticum aestivum* L., odroda Bosorka, žatva 2008, Beluša)

osídlenie zrna:		povrchové		vnútorné		
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DYSG	DRBC	DCPA
<i>Aspergillus flavus</i>						1 ¹
<i>Aspergillus sydowii</i>			1 ²			

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); DCPA- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a peptónom (Burgess et al., 1988); ¹producent kyseliny cyklopiazonovej, nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁; ²? producent kyseliny sydoovej

Tab. 84 Aspergily izolované zo vzorky 12/ 2008 (*Triticum aestivum* L., odroda Margaret, žatva 2008, Sokolce)

osídlenie zrna:		povrchové		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>					3 ¹
<i>Eurotium cf. amstelodami</i>				1	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹producent kyseliny cyklopiazonovej, nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁

Tab. 85 Aspergily izolované zo vzorky 13/ 2008 (*Triticum aestivum* L., žatva 2008, Smižany)

osídlenie zrna:		povrchové		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus candidus sensu lato</i>		11	1		
<i>Aspergillus flavus</i>		x + 34 ¹	x	107	91 ^{2, 3}
<i>Aspergillus niger</i> komplex		1 ⁴		3 ⁵	1
<i>Aspergillus tritici</i>		10	4		
<i>Aspergillus versicolor</i> neurčená skupina		2			
<i>Aspergillus</i> sp.		18	2		
<i>Eurotium amstelodami</i>				2	
<i>Eurotium</i> sp.		1		13	

(pokračovanie Tab. 84) DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ^{1,2}? producent kyseliny cyklopiazonovej (\pm), nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁; ³nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁ a kyseliny cyklopiazonovej; ^{4, 5}nebola zistená produkcia ochratoxínu A

Tab. 86 Aspergily izolované zo vzorky 14/ 2008 (*Triticum aestivum* L., žatva 2008, Smižany)

osídlenie zrna:		povrchové		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus candidus sensu lato</i>		x + 11	2	1	
<i>Aspergillus flavus</i>			x + 8	85	92 ¹
<i>Aspergillus</i> sp.		x + 1	x + 3		
<i>Eurotium amstelodami</i>				11	
<i>Eurotium chevalieri</i>				2	
<i>Eurotium herbariorum</i> skupina				17	
<i>Eurotium rubrum</i>				1	
<i>Eurotium</i> sp.				26	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁ a kyseliny cyklopiazonovej

Tab. 87 Aspergily izolované zo vzorky 15/ 2008 (*Triticum aestivum* L., žatva 2008, Smižany)

osídlenie zrna:		povrchové		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus candidus sensu lato</i>		1			
<i>Aspergillus flavus</i>		x + 48	3	91	101 ¹
<i>Aspergillus tritici</i>		5	1		
<i>Aspergillus versicolor</i> neurčená skupina		3			
<i>Eurotium amstelodami</i>				4	
<i>Eurotium chevalieri</i>				16	
<i>Eurotium herbariorum</i> skupina				1	
<i>Eurotium</i> sp.		19		1	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom,

(pokračovanie Tab. 86) kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003); ¹ nebola zistená produkcia aflatoxínu B₁ a kyseliny cyklopiazonovej

Tab. 88 Aspergily izolované zo vzorky 16/ 2008 (*Triticum aestivum* L., žatva 2008, Matejovce)

osídlenie zrna:		povrchové		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus candidus sensu lato</i>		4			
<i>Aspergillus</i> sp.			1		
<i>Eurotium amstelodami</i>		1		4	
<i>Eurotium chevalieri</i>				1	
<i>Eurotium herbariorum</i> skupina				2	
<i>Eurotium herbariorum/ rubrum</i>		1		6	
<i>Eurotium repens</i>			1	32	1
<i>Eurotium rubrum</i>				8	
<i>Eurotium</i> sp.		5	1		

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 89 Aspergily izolované zo vzorky 17/ 2008 (*Triticum aestivum* L., žatva 2008, Spišské Bystré)

osídlenie zrna:		povrchové		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Eurotium repens</i>				1	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 90 Aspergily izolované zo vzorky 18/ 2008 (*Triticum aestivum* L., odroda Driffter C1, žatva 2008, Turčianske Teplice)

osídlenie zrna:		povrchové		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>				1	1
<i>Aspergillus fumigatus</i>					1
<i>Aspergillus</i> sp.		1	2		1
<i>Eurotium amstelodami</i>				14	2
<i>Eurotium repens</i>				3	

(pokračovanie Tab. 89)

osídlenie zrna:		povrchové		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Eurotium</i> sp.			2	3	6

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 91 *Aspergily izolované zo vzorky 20/ 2008 (Triticum aestivum L., odroda Ilias, žatva 2008, Podtureň)*

osídlenie zrna:		povrchové		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus flavus</i>			1		
<i>Aspergillus</i> sp.					1
<i>Eurotium amstelodami</i>				2	
<i>Eurotium chevalieri</i>				1	
<i>Eurotium</i> sp.				2	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)

Tab. 92 *Aspergily izolované zo vzorky 21/ 2008 (Triticum aestivum L., odroda Atrium, žatva 2008, Závada)*

osídlenie zrna:		povrchové		vnútorné	
taxón:	izolačné médium:	DRBC	SL	DYSG	DRBC
<i>Aspergillus candidus sensu lato</i>				1	
<i>Aspergillus flavus</i>		3	1		
<i>Eurotium amstelodami</i>				1	
<i>Eurotium herbariorum</i> skupina				2	
<i>Eurotium herbariorum/ rubrum</i>				1	
<i>Eurotium repens</i>				3	
<i>Eurotium rubrum</i>				2	
<i>Eurotium</i> sp.				1	

DRBC- agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou (Merck, Nemecko); SL- sladínový agar (BiomarkTM, India); DYSG- agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (Lund et Frisvad, 2003)