

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVE

2118314

PÔDA AKO ZDROJ POTENCIÁLNE PATOGÉNNYCH HÚB
Z ČEĽADE ARTHRODERMATACEAE (ONYGENALES)

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA

Pôda ako zdroj potenciálne patogénnych húb z čeľade
Arthrodermataceae (Onygenales)

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Študijný program:	Aplikovaná biológia
Študijný odbor:	4.2.1 Biológia
Školiace pracovisko:	Katedra mikrobiológie
Školiteľ:	Ing. Soňa Felšöciová, PhD.
Konzultant:	Ing. Roman Labuda, PhD.

ČESTNÉ VYHLÁSENIE

Podpísaný Ľuboš Hoblík týmto vyhlasujem, že som bakalársku prácu na tému: „Pôda ako zdroj potenciálne patogénnych húb z čeľade *Arthrodermataceae* (*Onygenales*)” vypracoval samostatne s použitím uvedenej literatúry.

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

V Nitre.....

.....

Pod'akovanie

Touto cestou si dovoľujem čo najsrdečnejšie poďakovať svojej školiteľke Ing. Soni Felšöciovej, PhD. a externému konzultantovi Ing. Romanovi Labudovi, PhD., za ochotu, odbornú pomoc, cenné rady a trpezlivosť pri spracovávaní mojej diplomovej práce.

Abstrakt

Predkladaná diplomová práca informuje o výsledkoch dosiahnutých počas trojročnej štúdie zaoberajúcej sa výskytom a biodiverzitou pôdných keratinolytických húb z čeľade *Arthrodermataceae* (rad *Onygenales*) v 12 lokalitách (celkovo 15 vzorkách) na západnom a strednom Slovensku. Huby z tejto čeľade sú dôležité z hľadiska rozkladu refraktilných keratinóznych substancií (špecializovaných tkanív živočíchov ako sú vlasy, chlpy, nechty, sršť a perie) v pôdných ekosystémoch, a teda sú dôležité z pohľadu kolobehu prvkov v prírode. Avšak ich výskyt v prostredí človeka nadobúda aj hygienicko-epidemiologický význam, pretože mnohé z nich sú potenciálnymi patogénmi teplokrvných živočíchov vrátane človeka. Z celkového počtu 12 sledovaných lokalít (15 vzoriek a 150 subvzoriek), ktoré boli predmetom nášho skúmania boli z rodu *Trichophyton* zachytené a diagnostikované druhy *Trichophyton ajelloi* a *Trichophyton terrestre* a z rodu *Microsporum* bol zachytený a diagnostikovaný druh *Microsporum gypseum*. *T. ajelloi* sa vyskytoval v deviatich lokalitách. *T. terrestre* sa vyskytoval len vo vzorkách odobratých v obci Smolenice (Smolenice – ovce, Smolenice – sliepky a Smolenice B). *Microsporum gypseum* sa nachádzalo v lokalite Nitra areál SPU lamy a v dvoch vzorkách v lokalite kompost Hlohovec. V lokalitách SPU lamy, Malá Fatra a Smolenice B (odobratá lesná pôda v blízkosti kŕmidla zveri) bolo zistené teleomorfne štádium *Arthroderma uncinatum*. *Arthroderma quadrifidum* sa nachádzala len v jednej lokalite a to vo Veľkej Fatre.

Z týchto výsledkov, ako aj starších štúdií vykonaných inými autormi sa ukazuje, že pôdy Slovenska sú bohaté na patogénne huby z čeľade *Arthrodermataceae* (nízka druhová rozmanitosť na určitom stanovišti je vyrovnaná vysokou početnosťou jednotlivých zastupiteľov), a že bude potrebné aj naďalej monitorovať ich výskyt najmä v súvislosti s výskytom klinicky dôležitých mikromycét, čo môže napomôcť v prevencii mykotických ochorení zvierat a ľudí. Pôda sa stáva zdrojom štúdia nielen úrodotvorných činiteľov ale aj rezervoáru patogénnych mikroorganizmov.

Kľúčové slová: *Arthrodermataceae*, dermatofyty, huby, keratín, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton ajelloi*, *Trichophyton terrestre*

Abstract

Submitted diploma work informs about results of a still ongoing study that deals with the occurrence and biodiversity of soil keratinolytic fungi from family *Arthrodermataceae* in 12 locations (total of 15 samples) in the west and middle of Slovakia. Fungi from these family are important on the part of their ability to decompose refractile keratinous substances (specialistic animal tissues as hair, pilus, nails, fur and feathers) in soil ecosystems, and so they are important part in circulation of elements. However, their occurrence in human habitat obtain also sanitary-epidemiological meaning, because many of them are potencial pathogenic organisms of haematotherma including humans. From a total of 12 monitored locations (15 samples and 150 subsamples), which were object of our observation, there were diagnosed species *Trichophyton ajelloi* and *Trichophyton terrestre* from *Trichophyton* genera and *Microsporum gypseum* from *Microsporum* genera. *T. ajelloi* occurred in nine locations. *T. terrestre* occurred only in samples from Smolenice (Smolenice – sheep, Smolenice – fowls and Smolenice B). *M. gypseum* occurred in two locations: Nitra (SPU lamas) and Hlohovec compost (in two samples). In locations SPU lamas, Malá Fatra and Smolenice B was found teleomorphic stage *Arthroderma uncinatum*. *Arthroderma quadrifidum* only occurred in Veľká Fatra.

These results, as well as earlier studies performed by other authors, prove that Slovak soils are rich in pathogenic fungi from family *Arthrodermataceae* (low diversity of species in certain locations is balanced by high count of single species), and it will be necessary to monitor their occurrence, especially in connection with presence of clinically important micromycetes, which can help in prevention of mycotic diseases of animals and humans. Hence, soil is becoming an important source for studies that deal not only with the fertility activities but also as a reservoir of human pathogenic microorganisms.

Key words: *Arthrodermataceae*, dermatophytes, fungi, keratine, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton ajelloi*, *Trichophyton terrestre*

Obsah

Úvod.....	8
1 Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky.....	9
1.1 Ekologický význam keratínu.....	9
1.1.1 Rozklad keratínu v pôde.....	10
1.2 Keratinolytické huby.....	12
1.2.1 Výskyt keratinolytických húb.....	14
1.3 Čel'ad' Arthrodermataceae.....	15
1.3.1 Rozdelenie dermatofytov.....	16
1.3.1.1 Rod <i>Epidermophyton</i> Sabour 1907.....	18
1.3.1.2 Rod <i>Trichophyton</i> Malmsten 1848.....	18
1.3.1.3 Rod <i>Microsporum</i> Gruby 1843.....	18
1.3.2 Geofilné druhy.....	18
1.3.2.1 <i>Microsporum fulvum</i>	18
1.3.2.2 <i>Microsporum gypseum</i>	19
1.3.2.3 <i>Microsporum racemosum</i>	20
1.3.2.4 <i>Microsporum vanbreuseghemii</i>	21
1.3.2.5 <i>Microsporum cookei</i>	21
1.3.2.6 <i>Trichophyton ajelloi</i>	21
1.3.2.7 <i>Trichophyton terrestre</i>	22
1.3.2.8 <i>Trichophyton vanbreuseghemii</i>	24
1.4 Ochorenia spôsobené dermatofytmi.....	24
2 Cieľ práce.....	28
3 Materiál a metodika.....	29
3.1 Vzorky a lokalita štúdia.....	29
3.2 Odber a izolácia vzoriek.....	31

3.2.1	<i>Cykloheximid</i>	32
3.2.2	<i>Chloramfenikol</i>	33
3.3	Identifikácia	33
3.3.1	<i>Mikrosnímky a merania</i>	34
3.3.2	<i>Stanovenie indikátorov výskytu geofilných druhov z čeľade</i> <i>Arthrodermataceae</i>	34
4	Výsledky	35
4.1	Izolácia a identifikácia zachytených geofilných húb z čeľade <i>Arthrodermataceae</i>	35
4.1.1	<i>Izolácia</i>	35
4.1.2	<i>Identifikácia</i>	36
4.2	Ekologická štúdia (miesto výskytu a celková početnosť druhov) .	41
5	Diskusia	49
6	Záver	57
7	Použitá literatúra	59

Úvod

Pôda, ako komplexný ekosystém zložený z mnohých mikroprostredí, poskytuje životný priestor pre všetky hlavné taxonomické skupiny húb. Medzi pravé pôdne huby patrí približne 15 000 druhov. Najväčší podiel tvoria huby bazídiové a zostávajúcu časť tvoria zygomycéty a askomycéty s príslušnými anamorfnými druhmi.

Táto práca je zameraná na keratinolytické huby, ktoré predstavujú skupinu mikroorganizmov so schopnosťou rozkladať keratín a jeho zvyšky v prostredí. Tiež predstavujú mikroorganizmy s potenciálnymi patogénnymi vlastnosťami pre zvieratá a ľudí. Táto unikátna skupina húb môže existovať a aktívne sa rozmnožovať v pôdach za priaznivých podmienok, obzvlášť na miestach, kde môžu využívať rôzne formy keratínu. Frekvencia výskytu keratinolytických húb je podmienená množstvom biotických a abiotických faktorov. Medzi najaktívnejšie keratinolytické huby patria dermatofyty (*Epidermofyton*, *Microsporum* a *Trichophyton*) a fylogeneticky príbuzné rody v rámci radu *Onygenales* (oddelenie *Ascomycota*) ako sú *Aphanoascus*, *Chrysosporium*, *Geomyces*, *Gymnoascus*, *Malbranchea* a *Myceliphthora*, hoci určitú keratinolytickú aktivitu vykazujú aj druhy rodov mitotických húb *Alternaria*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* a *Scopulariopsis*, prípadne aj niektoré zygomycéty rodu *Mucor*. Huby s keratinolytickou aktivitou majú výnimočnú vlastnosť v rámci kolobehu prvkov v prírode, no zároveň môžu predstavovať isté riziko ako potenciálne patogény, schopné vyvolávať dermatofytické infekcie kože u ľudí a zvierat.

Ekologické poslanie húb spočívajúce v rozklade keratínových zvyškov (vlasy, nechty, srst', rohy, šupiny, perie, atď.) má primárne postavenie resp. dôležitosť, i keď ich aktivitu je len ťažko kvantifikovať.

Úlohou predkladanej práce je monitorovať výskyt geofilných dermatofytov a dermatofytoidov z čeľade *Arthrodermataceae*, stanoviť ich druhové zastúpenie (frekvenciu a početnosť) a klasifikovať potenciálne riziko výskytu niektorých medicínsky významných taxónov.

1 Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky

1.1 Ekologický význam keratínu

Kolobeh látok v prírode je základným predpokladom pre život na Zemi. Bez neustálej recyklácie všetkých biotických zložiek prírody by sa prostriedky pre rast a rozmnožovanie organizmov už dávno zdegradovali. Túto dôležitú skutočnosť si uvedomovali už v starom Grécku, čo výborne vystihuje Heraklitov koncept „plynutia“, ktorý je presne použiteľný a experimentálne potvrdený aj v biológii. Keďže v prírode nič nie je nehybné, všetko tečie, má svoj priebeh, a pretvára sa. Z toho jasne vyplýva, že prežitie organizmov na tejto planéte je úplne závislé na dvoch faktoroch:

- na neobmedzenej dodávke energie z externého zdroja: slnka
- na kolobehu látok v prírode, ktorý môžeme chápať ako cyklus premeny hmoty z anorganickej na organickú a naopak

Prvá fáza tohto cyklu v podstate prechádza cez fotosyntézu: najdôležitejšie sú zelené rastliny a sinice, ktoré s pomocou slnečnej energie produkujú organickú hmotu a tá je následne transformovaná potravinovým reťazcom k zvieratú a k človeku. Druhú fázu tvorí respirácia, ktorej hlavnou zložkou sú všetky organizmy, najmä mikroflóra pôdy (Marchisio, 2000).

Pôda je hlavným prostredím pre život saprotrofných organizmov, ktoré pretvárajú organické látky pochádzajúce zo živočíchov a rastlín na anorganickú formu, opäť prístupnú pre rastliny. Hlavnými dekompozitérmi organických látok v prírode sú baktérie a huby (Carlile et Watkinson, 1996).

Každá organická látka v pôde je postupom času mineralizovaná na jednoduchšie látky pôsobením mikroorganizmov alebo skupín mikroorganizmov a teda žiadna prírodná zložka sa nemôže v zemskej kôre nahromadiť (Marchisio, 2000). Z tohto pohľadu je veľmi dôležitá aktivita húb, ktoré dopĺňajú zásoby oxidu uhličitého a ďalších anorganických zložiek a zároveň zohrávajú dôležitú úlohu pri odstraňovaní zvyškov a odpadu prirodzeného pôvodu. Bez tejto aktivity by bol svet veľmi skoro zaplavený rastlinným a živočíšnym odpadom, čo by pravdepodobne znamenalo elimináciu väčšiny živých organizmov z ich prirodzeného prostredia (Marchisio, 2000).

Rovnako to platí aj pre veľmi refraktilné organické látky – k e r a t í n y. Keratín je jeden z najstabilnejších živočíšnych proteínov na zemi, je súčasťou vonkajších tkanív plazov, vtákov a cicavcov (Rajak et Sharma, 2003). Keratíny sú jedny z najpočetnejšie zastúpených proteínov v epiteliálnych bunkách stavovcov a sú hlavnou zložkou kože a jej derivátov ako sú nechty, vlasy, perie a vlna. Keratíny patria do skupiny vláknitých proteínov. Vysoký počet priečných disulfidických väzieb, hydrofóbných interakcií a vodíkových väzieb stabilizuje keratínové vláknité štruktúry. Vďaka tomu je keratinózny materiál vo vode nerozpustný a extrémne rezistentný voči degradácii proteolytickými enzýmami ako sú trypsín, pepsín a papaín (Gradišar et al, 2005).

Keratín patrí do skupiny tzv. f i b r i l á r n y ch (vláknitých) proteínov, ktoré majú silne pretiahnuté molekuly, a ktorých sekundárna štruktúra má dominantný charakter (Voet et Voet, 1990). Keratín, elastín a kolagén tvorí takmer 25 % hmotnosti tela cicavcov (Simpanya, 2000). Je hlavnou zložkou epidermy kože, vlasov, peria, šupiny plazov, rohov, kopýt a nechťov, ktorý tvoria iba zvieratá. Keratíny rozdeľujeme na α -keratíny, ktoré sa vyskytujú u cicavcov a β -keratíny, vyskytujúce sa u vtákov a plazov.

α -keratín: hlavné zložky sú aminokyseliny, ktoré sú bohaté na cystín, a vytvárajú disulfidové mostíky. V rohoch a nechtoch má keratín pevnú, lámavú a drobivú formu a obsahuje viac ako 22 % cystínu. Jemnú, ohybnú formu keratínu môžeme nájsť vo vlasoch a srsti, obsahuje 10 až 14 % cystínu. α -keratín je vďaka hustému a pevnému polypeptidovému reťazcu s vysokým počtom disulfidových mostíkov vysoko rezistentný a ťažko degradovateľný (Marchisio, 2000).

β -keratín: má nedostatok cystínu a cysteínu, ale je bohatý na aminokyseliny s krátkym postranným reťazcom, ako napr. glycín, alanín a serín. Môžeme ich nájsť vo vláknach pavúkov a hodvábe, v pazúroch, čeľustiach plazov a v vtáčích zobákoch (Marchisio, 2000).

1.1.1 Rozklad keratínu v pôde

Vďaka sile a stabilite keratínu existuje len málo organizmov schopných degradovať keratín. Iba pár druhov hmyzu, baktérií, aktinomycét a húb môže využívať keratín ako zdroj potravy (Rajak et Sharma, 2003). Medzi ne patria napríklad niektoré

druhy rodu *Bacillus*, termofilný druh *Fervidobacterium pennavorans*. Degradovať keratín v prírode dokážu aj niektoré druhy živočíchov, ako napríklad larva priadky morušovej, alebo moľa, ktorá dokáže rozložiť perie a srst'. Z húb ide najmä o dermatofyty a niektoré druhy pôdných askomycét (rad *Onygenales*) a zástupcovia radu *Mucorales*. Vo veľmi vlhkej pôde alebo vodnom prostredí sú to niektoré druhy z radu *Chytridiales*, *Saprolegniaceae* a *Leptolegniaceae* (Marchisio, 2000).

Mnoho rozdielných mikroorganizmov sa môže účastniť degradácie biomateriálov obsahujúcich keratín, pričom môžu využívať rozdielne mechanizmy rozkladu. Existujú dva termíny používané pri opise mikroorganizmov schopných degradovať keratín: keratinofilný a keratinolytický. Keratinofilné mikroorganizmy nie sú schopné využívať keratín, ale len produkty degradácie keratinolytickými hubami (Tibbett et Carter, 2008).

Skupina proteolytických enzýmov, ktoré sú schopné hydrolyzovať nerozpustný keratín účinnejšie než iné proteázy, sa nazývajú keratinázy. Väčšina keratináz má niektoré spoločné charakteristiky napriek ich rozdielnemu pôvodu. Patria hlavne medzi extracelulárne serínové proteázy, okrem keratinázy z kvasiniek, ktorá patrí medzi asparágové proteázy. Sú aktívne predovšetkým v alkalickom prostredí s optimálnou aktivitou pri teplote 50 °C (Gradišar et al, 2005).

Efekt proteolytických enzýmov - keratináz na prirodzený tvrdý keratín je silne limitovaný a preto nemôžeme keratinolýzu chápať len ako proteolytický útok. Pri niektorých keratinolytických organizmoch, ako napríklad niektoré larvy hmyzu alebo streptomycéty bolo zistené, že pred samotnou proteolýzou je substrát denaturovaný redukciou disulfidových mostíkov. Avšak u keratinolytických organizmov nebol rozklad keratínu extracelulárnymi enzýmami a/alebo exkréciou tiolov demonštrovaný (Kunert, 2000).

Keratinolytické huby majú schopnosť využívať cysteín nielen ako zdroj síry, ale aj uhlíka a dusíka. V priebehu adaptácie na degradáciu proteínov bohatých na cysteín získali keratinolytické mikroorganizmy schopnosť regulovať pomer oboch produktov oxidácie síry: síranov a siričitanov. Keratinolýza u húb nezahŕňa len proteolýzu, ale tiež denaturáciu substrátu cez štiepenie disulfidických mostíkov vylučovaním siričitanov, ktoré v neutrálnom alebo alkalickom prostredí reagujú s disulfidmi a štiepia ich na tioly a ďalšie sírne produkty (Tibbett et Carter, 2008).

Sulfitolýza je kľúčová reakcia keratinolýzy u húb. Po denaturácii keratínu sulfitolýzou môže byť tento substrát hydrolyzovaný extracelulárnymi proteázami. Bolo dokázané, že siričitan silne stimuluje proteázy *Microsporum gypseum* pri hydrolýze keratínu, ktorý bol kompletne rozložený. Výsledky experimentov teda túto hypotézu potvrdzujú pri hubách. Degradácia keratínu je pravdepodobne výsledkom účinku troch faktorov: deaminácie (vytvorenie alkalického prostredia potrebného na úpravu substrátu, sulfitolýzy a proteolýzy), sulfitolýzy (denaturácia substrátu štiepením disulfidových mostíkov) a proteolýzy (štiepenie denaturovaného substrátu na rozpustné produkty). Tieto faktory sú čiastočne prítomné aj pri nekeratinolytických hubách, ale len u keratinolytických druhov sú spoločne aktívne a vyvinuté do takej miery, že dokážu úspešne utilizovať keratínové štruktúry (Kunert, 2000).

U dermatofytov sú keratinolytické schopnosti rozdielne v závislosti od stupňa adaptácie na parazitizmus. Mnohé obligátne parazity degradujú tvrdý keratín pomalšie, čo je pravdepodobne spôsobené ich celkovo pomalším rastom a nižšou metabolickou činnosťou *in vitro*. Je všeobecne akceptované, že schopnosť rozkladať keratín pokožky a jej derivátov a jeho utilizácia ako hlavného zdroja živín, je predpokladom parazitizmu v keratinizovaných vláknach hostiteľa. Avšak existuje niekoľko silne keratinolytických húb (niektoré druhy *Microsporum* a *Trichophyton*), u ktorých ešte nebol dokázaný parazitizmus (Kunert, 2000; De Vries, 1962).

1.2 Keratinolytické huby

Keratinolytické huby sú jediné huby, ktoré dokážu rozkladať α -keratín, čím zabezpečujú recykláciu uhlíka, dusíka a síry obsiahnutej v tejto zlúčenine. Prítomnosť týchto húb v substráte je závislá na množstve prítomného keratínu. Ten môže mať pôvod z domácich zvierat, zvierat žijúcich v blízkosti človeka alebo divých zvierat, pretože je stavebnou látkou nachádzajúcou sa v koži, srsti, perí, rohoch, šupinách, vlasoch a nechtoch. Tým sa obsah keratínu stáva najdôležitejším faktorom ovplyvňujúcim prítomnosť keratinolytických húb, kým ďalšie ekologické faktory ako pH, teplota alebo nadmorská výška sú menej dôležité, pretože tieto huby na ne vykazujú širokú toleranciu (Marchisio, 2000).

Keratinolytické huby sa vyskytujú v mnohých prírodných aj umelých prostrediach. Tieto mikroorganizmy môžeme nájsť spolu v spoločenstvách keratínofilných húb, ktoré majú menšiu afinitu ku keratínu a využívajú hlavne produkty jeho rozkladu (Ulfig, 2000). Len keratinolytické huby sú schopné kolonizovať a priamo rozkladať keratín, zatiaľ čo huby považované za keratínofilné ich len sprevádzajú a využívajú nekeratinózne zložky takýchto substrátov resp. produkty rozkladu samotného keratínu (Ulfig, 2003). Keratinolytické huby sú i zároveň keratínofilnými hubami, čo neplatí opačne (Marchisio, 2000; Kunert, 2000; Hubálek, 2000).

Biologická funkcia keratinolytických húb v pôde je v degradácii keratinózných materiálov. V pôde existujú tieto huby v teleomorfnom (sexuálnom) štádiu vo forme kleistothécií, zatiaľ čo v keratinóznom materiáli žijú v anamorfnom (asexuálnom) štádiu, počas ktorého získavajú len veľmi jednoduchú morfológiu (Rajak et Sharma, 2003).

Ak je v pôde dostatok keratínového substrátu, rozmnožujú sa tieto huby asexuálne produkciou veľkého množstva konídií (arthrokonídie, aleurokonídie). Keď je keratínový substrát vyčerpaný, reprodukovujú sa sexuálne a formujú charakteristické plodnice - askomaty. Tieto askomaty majú ochranné peridiálne privesky, ktoré chránia pred útokom roztočov. Každý askomat obsahuje množstvo ásk (vreciek), ktoré sú u radu *Onygenales* nahé a obsahujú 8 askospór. Tieto askospóry zostávajú v dormantnom štádiu, kým nebude dostupný keratín alebo alternatívny zdroj nutrientov. Askospóry u radu *Onygenales* sú veľmi malé, sférické a rôzne ornamentované, a vďaka ich hrubým stenám sú schopné prežiť v pôde aj za suchých podmienok. Keratinolytické huby sú často izolované z pôd nôr, čo indikuje, že nory sú výborné lokality pre tieto huby, pretože zvieratá ukrývajúce sa v nich sú pravidelným zdrojom keratínu a vlhka (Rajak et Sharma, 2003).

Dermatofyty, kam patria rody *Microsporum*, *Trichophyton* a *Epidermophyton*, sú najaktívnejšie keratinolytické huby. Keratinolytickú aktivitu vykazujú aj ďalšie rody v rámci radu *Onygenales* (oddelenie *Ascomycota*) ako sú *Aphanoascus*, *Chrysosporium*, *Geomyces*, *Gymnoascus*, *Malbranchea* a *Myceliophthora* (Currah, 1985; Marchisio, 2000; Summerbell., 2000; de Hoog et al., 2000) a určitá schopnosť keratinolýzy bola preukázaná aj u rodov *Alternaria*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium* a *Scopulariopsis* (Marchisio, 2000).

1.2.1 Výskyt keratinolytických húb

Keratinolytické huby sa často vyskytujú vo vrchnej vrstve pôdy, na skládkach odpadu, v riečnych sedimentoch, odpadových kaloch a ďalších miestach. Zloženie spoločenstva keratinolytických húb v pôde je rôzne a do istej miery závisí od hustoty populácie (Ulfig, 2000).

Keratinolytické huby existujú v prírode v antropogénnych a zoogénnych spoločenstvách “oddelené” od iných mikrobiálnych populácií. Kvalitatívne a kvantitatívne zloženie týchto populácií odráža komplexný vplyv mnohých prírodných, environmentálnych faktorov. Podľa Ulfig (2000) medzi najdôležitejšie faktory výskytu patria:

- prísun, nahromadenie keratínových zvyškov a húb spolu s rozkladaním zvyškov, ktoré vchádzajú do prostredia
- hladina znečistenia prostredia človekom a živočíchov
- fyzikálno – chemické faktory, vrátane klimatických podmienok
- prítomnosť toxických zložiek, elementov z priemyslu a prirodzene vyskytujúcich sa látok v prostredí .

Keratinolytické huby sú asociované s aktivitami ľudí a živočíchov. Jednotlivé druhy týchto mikroorganizmov sú bežné v oblastiach s vysokou populáciou, kde môžu byť keratínové zvyšky ľahko prístupné a obmieňané. V neobývaných oblastiach je množstvo keratinolytických húb obmedzené na polia, kde sa hnojí s organickými hnojivami a na miesta, kde sa nachádzajú zvieratá nepretržite, alebo len dočasne, hlavne v ležoviskách a pri krmidlách (Marchisio, 2000; Ulfig, 2000).

Zloženie spoločností keratinolytických húb v pôde je odlišné od zloženia v areáloch s vysokou populáciou a vykazuje veľké sezónne rozdiely. Kvantitatívne a kvalitatívne ukazovatele prítomnosti húb sa zvyšujú s väčšou kontamináciou pôd fekálnymi baktériami. Diverzita spoločností sa zvyšuje spolu s fekálnou kontamináciou, ale znižuje sa vo veľmi znečistených pôdach. Ukazovatele dobre korelujú s fyzikálno-chemickými faktormi ako sú pH, vlhkosť, organický uhlík, dusík, kyslosť, zásaditosť, vodivosť, fosforečnany, sírany a ďalšie. Je však dokázané, že najväčšiu dôležitosť z fyzikálno-chemických faktorov má pH (Ulfig, 2000).

V povrchových vodách sa keratinolytické huby vyskytujú menej frekventovane alebo len zriedkavo, čo naznačuje, že vzťah medzi prítomnosťou týchto mikroorganizmov a stupňom kontaminácie vody odpadom nie je príliš dôležitý. Naopak, keratinolytické huby sa vyskytujú často vo vodných sedimentoch. Niektoré skoršie štúdie taktiež dokázali dôležitosť kontaminácie vodných sedimentov pri kvantitatívnom a kvalitatívnom zložení týchto húb vo vodných sedimentoch (Ulfig, 1997). Dôležitými faktormi ovplyvňujúcimi výskyt keratinolytických húb v sedimentoch sú teplota, slnečná radiácia a salinita. Toxické látky ako sú kyanidy, detergenty a fenoly spojené s ropnou kontamináciou výrazne znižujú množstvo týchto mikroorganizmov vo vode a jej sedimentoch (Ulfig, 2000).

Kým v odpadových vodách sa keratinolytické huby vyskytujú menej frekventovane, v kaloch týchto vôd je ich výskyt extrémne vysoký. Kvantitatívne a kvalitatívne zoskupenie týchto húb v kaloch a usadeninách závisí od zaobchádzania, fyzikálno-chemických a mikrobiologických faktorov. Medzi najdôležitejšie faktory patrí štruktúra usadeniny, vlhkosť, aerácia, pH, prchavé látky a pomer uhlíka dusíka (Ulfig, 2000).

Univerzálny výskyt týchto húb v prostredí človeka je však považovaný aj za epidemiologicky významný, pretože každý keratinolytický alebo keratofilný druh je považovaný za potenciálneho patogéna (Rippon, 1988). To znamená, že môže spôsobovať rôzne dermatomykózy u ľudí či zvierat. Z tohto hľadiska je preto veľmi dôležité tieto huby trvale monitorovať, prípadne v niektorých prípadoch zaviesť účinné epidemiologické opatrenia, ktoré by viedli k zníženiu rizika možného ochorenia.

1.3 Čeľaď *Arthrodermataceae*

Taxonomické zaradenie: **Ríša:** *Fungi*

Oddelenie: *Ascomycota*

Trieda: *Euascomycetes*

Rad: *Onygenales*

Do čeľade *Arthrodermataceae* zaraďujeme dermatofyty (a ich potenciálne patogénne príbuzné druhy dermatofytoidy), ktorých anamorfy sú v súčasnosti označované ako *Trichophyton*, *Microsporum* a *Epidermophyton*, korešpondujúcich

v mnohých prípadoch s teleomorfou *Arthroderma*. Táto teleomorfa je známa aj u niektorých ďalších rodov z čeľade *Arthrodermataceae*, a to sú rody *Chrysosporium* a *Myceliophthora*. Tieto anamorfy majú komplexné fenotypické vlastnosti, od druhov s dimorfickými konídiami až po druhy, ktoré sú úplne nesporulujúce. Na druhej strane je morfológia ich teleomorf taká uniformná, že väčšina druhov sa nedá morfológicky rozlíšiť, kým nie je preštudovaná ich anamorfa (Summerbell, 2000; Graser et al., 2000).

Rody *Trichophyton*, *Microsorium* a *Epidermophyton* boli rozdelené na základe ekologických vlastností do troch skupín: pôdu obývajúce geofilné druhy, na zvieratá asociované zoofilné druhy a na ľudí viazané antropofilné druhy. Geofilné druhy zahŕňajú dermatofyty, druhy, ktoré spôsobujú kožné ochorenia, a dermatofytoidy, ktoré obyčajne nespôsobujú kožné ochorenia. Tieto druhy môžu byť označované aj ako pôdne huby (Weitzman et Summerbell, 1995).

1.3.1 Rozdelenie dermatofytov:

Antropofilné dermatofyty – parazitujú na človeku a iba výnimočne infikujú zvieratá. Koža reaguje na ich prítomnosť chronickým zápalom miernejšieho stupňa. Patrí sem – *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum audouinii*, atď. Epidémie vyvolané touto skupinou nie sú o nič menej závažnejšie ako epidémie spôsobené zoofilnými druhmi, aj keď často bývajú menej nápadné pre menej výrazné alebo chronickejšie chorobné prejavy (Frágner, 1984).

Zoofilné dermatofyty – parazitujú na zvieratách. Príležitostne vyvolávajú infekciu u ľudí. Vyskytujú sa prevažne u divoko žijúcich, domácich a hospodárskych, ale aj u laboratórnych zvierat, z ktorých sa prenášajú na človeka. Veľmi často vyvolávajú choroby z povolania u poľnohospodárskych pracovníkov, ktorí prichádzajú do priameho styku s chorým dobytkom napr. pri kŕmení, dojení a ošetrovaní zvierat, pri vážení a nakladaní do vozov alebo pri práci s mŕtvymi zvieratami na bitúnkoch a v kafilériách. Okrem priameho styku býva prenos ochorenia zo zvierat na ľudí sprostredkovaný napr. v stajniach infikovaným prádлом, šatstvom a ďalšími predmetmi (Chimelli, 2003).

Geofilné dermatofyty – saprofyty, ktoré žijú v zemi na keratínových štruktúrach živočíšneho pôvodu. Stykom s infikovanou pôdou dochádza zrejme k prenosu na človeka alebo na zvieratá. U svojich druhotných hostiteľov spôsobujú akútne zápaly, podobné infekcii zoofilnými dermatofytmi (Frágner, 1984).

Tab. č. 1: Ekologická, fenotypová a druhová klasifikácia dermatofytov na základe prítomnosti alebo absencie výskytu s pôdou asociovaných sexuálnych štádií (Summerbell, 2000).

S pôdou asociované perfektné dermatofyty	S pôdou neasociované inperfektné dermatofyty	Pozícia neistá
Geofilné druhy	Zoofilné druhy	
<i>Microsporum boullardii</i>	<i>Microsporum equinum</i>	<i>Microsporum gallinae</i>
<i>M. fulvum</i>	<i>T. equinum</i>	<i>M. praecox</i>
<i>M. gypseum</i>	<i>T. sarkisovii</i>	<i>T. longifusum</i>
<i>M. racemosum</i>	<i>T. verrucosum</i>	
<i>M. vanbreuseghemii</i>		
<i>Trichophyton vanbreuseghemii</i>		
Zoofilné druhy	Antropofilné druhy	
<i>Microsporum canis</i>	<i>Epidermophyton floccosum</i>	
<i>M. persicolor</i>	<i>Microsporum audouinii</i>	
<i>M. nanum</i>	<i>M. ferrugineum</i>	
<i>T. mentagrophytes (pro parte)</i>	<i>T. concentricum</i>	
<i>T. simii</i>	<i>T. gourvilii</i>	
	<i>T. kanei</i>	
	<i>T. kraidenii</i>	
	<i>T. megninii</i>	
	<i>T. mentagrophytes (pro parte)</i>	
	<i>T. raubitschekii</i>	
	<i>T. rubrum</i>	
	<i>T. schoenleinii</i>	
	<i>T. soudanense</i>	
	<i>T. tonsurans</i>	
	<i>T. violaceum</i>	
	<i>T. yaoundei</i>	

Poznámka: Tabuľka neobsahuje geofilné dermatofyty, ako sú *Trichophyton terrestre*, *Microsporum cookei* a *Trichophyton ajelloi*, ktoré obyčajne nepatria medzi druhy s patogénnym potenciálom, t.j. sú to dermatofyty.

1.3.1.1 Rod *Epidermophyton* Sabour 1907

Rod je charakteristický veľkými makrokonídiami, ktoré sú tenkostenné, viacbunkové, kyjakovitého tvaru a zhlukujú sa do zväzkov. Mikrokonídie sa nevytvárajú. Typovým druhom je *E. floccosum* (Simpanya, 2000).

1.3.1.2 Rod *Trichophyton* Malmsten 1848

Tento rod tvorí hladkostenné makrokonídie a mikrokonídie. Makrokonídie sú tenkostenné, cigarového tvaru. Mikrokonídie sú zvyčajne pyriformného t.j. hruškovitého niekedy nepravidelného tvaru, 2 - 3 µm veľké. Typickým druhom je *T. tonsurans* Malmsten, 1845 (Simpanya, 2000).

1.3.1.3 Rod *Microsporum* Gruby 1843

Aj tento rod tvorí mikro- a makrokonídie. Makrokonídie sú multiseptované, s tenkou alebo hrubou stenou, majú vretenovitý tvar a môžu byť početné alebo vzácne až úplne chýbať. Najdôležitejším identifikačným znakom v tomto rode je prítomnosť makrokonídií s charakteristickými drsnými až echinulárnymi stenami. Hrúbka bunkovej steny a celkový tvar makrokonídií závisí od daného druhu. Mikrokonídie sú pyriformného tvaru, cca. 2 - 3µm veľké. Typovým druhom je *Microsporum audouinii* Gruby, 1843 (Simpanya, 2000).

1.3.2 Geofilné druhy

1.3.2.1 *Microsporum fulvum*

Synonymum:

- *Sabouraudites fulvus*
- *Closterosporia fulva*
- *Nannizzia gypsea* var. *fulva*
- *Epidermophyton radiosulcutanum* var. *flavum*
- *Keratinomyces longifusus*

-
- *Trichophyton longifusum*
 - *M. boullardii*

Kolónie rastúce na Sabouradovom agar (SGA) sú ploché, zrnité až chumáčovité, žltohnedé až ružové; spodná strana je červená. Makrokonídie: tenkostenné, vretenovité 5 - 7 priehradok, veľkosť 25 - 60 x 7,5 - 12 µm. Mikrokonídie: klavátneho tvaru, prisadnuté na fertilnej hýfe alebo s krátkymi stopkami. Špirálovité hýfy sú prítomné (de Hoog et al., 2000; Tan et al., 1994).

Teleomorfa. *Arthroderma fulvum*

Gymnotécia: žlté až hnedožlté, 350 - 1250 µm v priemere. Askospóry: 1,5 - 2 x 2.8 - 3.5 µm. Aský: 5 - 7 µm. Prívesky: vystupujúce laterálne a terminálne z buniek peridiálnej hyfy, rovné, štíhle, hladko stenné, septované hýfy, viac ako 250 µm dlhé, 3-4.5 µm, prítomne aj špirálovité hýfy, rozvetvené aj tesne stočené. Tento druh je rozšírený celosvetovo a je zriedkavo patogénny (Currah, 1985; Kawasaki, 1992).

1.3.2.2 *Microsporum gypseum*

Synonymum:

- *Trichophyton gypsem*
- *Achorion gypseum*
- *Sabouraudites gypseum*
- *Closteroporia gypsea*
- *Trichophyton mentagrophytes* var. *gypseum*
- *M. flavescens*
- *Sabouraudites flavescens*
- *M. scorteum*
- *Sabouraudites scorteus*
- *Ecotrichophyton scorteum*
- *M. xanthodes*
- *Sabouraudites xanthodes*
- *Gymnoascus gypseum*
- *Nannizzia gypsea*
- *Nannizzia gypsea* var. *incurvata*
- *Arthroderma incurvatum*
- *Favomicrosporum pinettii*
- *M. gypseum* var. *vinosum*

Rýchlo rastúce na SGA, prachovité, škoricové - žltohnedé; spodná strana žltkastá až žltohnedá, niekedy s ružovým nádychom. Makrokonídie: vo veľkých strapcoch, zväčša tenkostenné, pravidelne bradavičnaté, 3 – 6 (-8) priehradok, vretenovité, 25 - 60 x 8.5 - 15 µm. Mikrokonídie: podlhovasté alebo stĺpkovité, hladko a tenkostenné, klavátneho tvaru, 3.5 - 8 x 2 - 3 µm (de Hoog et al., 2000; Stockdale, 1961).

Teleomorfa. *Arthroderma gypseum*; *A. incurvatum*

Gymnotécia: biela až hnedožltá farba, 350 - 500 µm v priemere. Askospóry: 1,5 - 2 x 2.5 - 3.5 µm. Asky: 5 - 7 µm. Tento druh bol zaznamenaný v Nemecku, Českej republike, Holandsku a v Iráne. Na Slovensku bol tento druh objavený na intenzívne obrábaných pôdach v okolí Trnavy (Volleková 1992; Kawasaki, 1992).

1.3.2.3 *Microsporum racemosum*

Kolónie rýchlo rastúce, ploché, stred prachovitý, krémovej farby, neskôr nadobúdajú červenkastý odtieň; spodná strana hroznovo červená až hnedá. Makrokonídie: kužeľovité, cigarového tvaru, tenko a hrubostenné, 5 - 10 priehradiek, 55 - 65 x 12 - 15 µm. Mikrokonídie kužeľovité, v strapcoch, klavátne (de Hoog et al., 2000).

Teleomorfa. *Arthroderma racemosum*

Gymnotécia: hnedožlté, lesklé, v priemere 300 - 700 µm. Askospóry 1,2 - 1,5 x 2,5 - 3 µm. Asky: 4,4 - 5,5 µm. Prívesky: rovné štíhle, hladko stenné, 3 - 4 µm široké pri báze, zužujúce sa na 1,7 až 2 µm k vrcholu, do 380 µm dlhé, bičíkovité. Hlavný výskyt tohto druhu je v pôdach Južnej Ameriky a Rumunska (Howard, 2003; Kawasaki, 1992).

1.3.2.4 *Microsporum vanbreuseghemii*

Kolónie rýchlo rastúce, granulovité, ružové až tmavoružové; spodná strana žltá. Makrokonídie valcovitého až cigarového tvaru, väčšinou 8 - 12 priehradok, 58 - 61 x 4 - 10 µm, tenko alebo hrubostenne. Mikrokonídie: početné, hruškovitého tvaru (de Hoog et al., 2000).

Teleomorfa: *Arthroderma grubyi*

Gymnotécia: spočiatku biele, v zrelosti hnedožlté, 150 - 600 µm v priemere. Askospóry: 2,4 - 3 µm. Asky: 4,8 - 6 µm. Prívesky: krátke, hladkostenné, voľné špirály s 2 - 3 prstencami a pretiahnuté, hladkostenné, septované hýfy (1,5 - 3 µm) s viac ako 50 prstencami. Tento druh je kozmopolitný. Bol zistený ako príčina ochorení u kačíc, veveríc a psův. Podľa autorov Domsch et al. (1980) je patogénom pre morské prasiatka.

1.3.2.5 *Microsporum cookei*

Kolónie stredne rýchlo rastúce, vatovité, belavé neskôr žltkasté, až tmavohnedé. Pigment sýty hroznovo-červený, vteká do média. Makrokonídie plné a hrubostenné, 6 - 7 komôrok, zoširoka vretenovité s zaobleným vrcholom, 30 - 50 x 10 - 15 µm. Mikrokonídie elipsovité až hruškovité (de Hoog et al., 2000).

Teleomorfa: *Arthroderma cajetani*

Gymnotécia: bledo žltej farby, 390-690 µm v priemere. Askospóry: 1,5-1,8 x 3-3,6 µm. Asky: 6-9 µm v priemere (Currah, 1985). Je to kozmopolitný druh s celosvetovým výskytom (de Hoog et al., 2000).

1.3.2.6 *Trichophyton ajelloi*

Synonymum:

- *Keratinomyces ajelloi*
- *Epidermophyton terrigenum*
- *Microsporum ajelloi*

-
- *Epidermophyton ajelloi*
 - *Epidermophyton stockdaleae*
 - *Keratinomyces ajelloi* var. *nanum*
 - *Trichophyton ajelloi* var. *nanum*

Kolónie na SGA ploché práškové až zamatové, krémové až hnedožlté; spodná strana je žltkastá, tmavo purpurové pigmenty nachádzajúce sa v agare. Makrokónídie sklovité, hladko a hrubo stenné, cigárovité, 8 – 12 bunkové, 40 – 70 x 9 – 12 μm, mikrokónídie zriedkavé alebo neprítomné, elipsovité až hruškovité 3 – 9 x 2 – 5 μm (Dawson et Gentles, 1961).

Teleomorfa: *Arthroderma uncinatum*

Gymnotécia: bledo hnehožlté, priemer 300 – 900 μm; Askospóry: 1 – 1,8 x 2,5 – 3,2 μm; Asky: polguľovité, tenkostenné, sploštené 5 – 6,5 x 5,4 – 7,2 μm, žlté vo veľkom počte. Peridiálna hýfa: sklovitá, bledo žltá, oblúkovito rozvetvená do vonka od hlavnej hýfy, bunky 4 – 7 x 7 – 11 μm, výrazne ježkovité. Prívesky: septované, hladko stenné, na konci špirálovité, premenlivé, príležitostne hladkostenné, viacbunkové, vretenovité makrokónídie sú produkované peridiálnou hýfou (de Hoog et al., 2000). Rozšírený pôdny inhabitant, tento druh je izolovaný z pôdy, chlpcov (srsti) divých potkanov, zo zranení koňa, vtáčích hniezd, vlasov kože, odpadového materiálu dobytká, psov, veveričiek, je to zriedkavý patogén u ľudí (Currah, 1985). *A. uncinatum* je najrozšírenejšia keratínofilná pôdna huba a vyskytuje sa hlavne v oblastiach mierneho pásma.

1.3.2.7 *Trichophyton terrestre*

Kolónie na SGA: rozširujúce sa, podobné plsti, vatové až práškové, biele až bledo krémové, alebo nahnedlé, spodná strana našedlá až žltkastá alebo okrová. Makrokónídie sú 6 – 8 bunkové, 50 μm dlhé, hladko a tenko stenné, valcovité alebo nepatrne kyjačikovité. Mikrokónídie sú krátke valcovité alebo krátke kyjačikovité a sú 3 – 7 μm dlhé a 1 – 4 μm široké (Summerbell et Kane, 1997; Dawson et Gentles, 1961).

Teleomorfa: *Arthroderma insingulare*, *A. quadridum*, *A. lenticulare*.

Arthroderma insingulare

Gymnotécia : biele až bledožlté, 250 - 500 μm ; Askospóry: 1,8 – 2,2 x 2,5 - 3 μm ; Vrecká: 3,5 – 5 x 4 - 6 μm ; Peridiálna hýfa: priehľadná až bledo žltá, bunky asymetricky zúžené 5 - 6 x 8 - 12 μm , ježkovité. Prívesky: hladkostenné, septované špirály, premenlivé v dĺžke a počte závitov. *A. insingulare* je známa v Maďarsku, v Česku, na Slovensku a v USA z pôdy, srsti potkanov a z peria kurat'a (Domsch et al., 1980).

Arthroderma lenticularum

Gymnotécia: bledo-hnedožlté, 300 - 600 μm ; Askospóry: sklovité, hladkostenné, sploštené, žlté, vo veľkom množstve, v priemere 1,5 – 2,5 x 2,2 - 3 μm ; vrecká: polgul'ovité, tenkostenné, rozplývajúce sa 4 – 4,8 x 5 – 5,6 μm , 8-spórové; Peridiálna hýfa: bledožltá, sklovitá, septovaná, od kraja hlavnej hýfy háčikovito vetvená; Bunky: hrubostenné, ježkovité, činkovitého tvaru, symetricky zúžené, 5,5 – 8,5 x 7 - 10 μm . Prívesky: koncové, septované špirály, špirálovité hýfy nesené na konci. Druh je zaznamenaný iba v Californii z pôdy, keratínových substrátov a zvieracích nôh (Domsch et al., 1980).

A. quadrifidum

Gymnotécia: bledo hnedožlté, v priemere 400 - 700 μm ; Askospóry: priehľadné, hladké, sploštené, žlté 0,9 – 2,2 x 1,8 - 3 μm ; Asky: polgul'ovité, tenkostenné, 3,5 – 5 x 4 - 6 μm , 8 – spórové; Peridiálna hýfa: priehľadná, septovaná, bledožltá, od kraja hlavnej hýfy háčikovito vetvená; Bunky: tučnosťenné, 5 – 9 x 8 - 13 μm , silno ježkovité, na prvý pohľad v dospelosti kĺbové, keď sú mladé činkovitého tvaru, maturované(zrelé) sú podobné krátkej ramennej kosti s kĺbami výraznejšie tvorenými na jednej strane. Prívesky: koncové alebo postranné, septované špirály varíujú v dĺžke a v počte otáčok.

Tento druh je pravdepodobne kozmopolitne rozšírený aj keď Domsch, Gams a Andersen (1980) poznamenali, že môže mať prednosti pre subtropické a mierne pásma.

1.3.2.8 *Trichophyton vanbreuseghemii*

Synonymum: T. vanbreuseghemii, Arthroderma gertleri

Kolónie na SGA: ryhované hnedožlté, spodná strana krémovej farby. Makrokonídie cylindrické, 4 – 7 bunkové, 30 – 55 x 6 - 8 µm, mikrokonídie hruškovité, 2 – 7 x 1,5 – 2,5 µm.

Teleomorfa: *Arthroderma gertleri*

Gymnotécia: bledožlté, priemer 200 - 600 µm; Askospóry: 1,5 – 2 x 2 – 2,8 µm; Vrecká: 4 x 5 µm; Peridiálna hýfa: sklovitá, oblúkovito vetvená; Bunky: asymetrické (niekedy symetrické), ježkovité; Prívesky: koncové, septované špirály, rozdielne v dĺžke a počte závitov. Tento druh môže byť kozmopolitný, len zriedka spôsobuje dermatofytózy (Summerbell et Kane, 1997).

1.4 Ochorenia spôsobené dermatofytmi

Infekcie spôsobené dermatofytmi sú pravdepodobne najbežnejšie hubové ochorenia postihujúce ľudí. Tri keratofilné rody (*Trichophyton*, *Microsporum* a *Epidermophyton*) spôsobujú tieto ochorenia, ale miesta ich pôsobenia sa líšia. Infekcie nechtov (onychomykózy) najčastejšie spôsobuje *Trichophyton rubrum*, nasleduje *T. mentagrophytes*, zatiaľ čo kožné a vlasové infekcie môžu byť spôsobené inými dermatofytmi, predovšetkým rodom *Microsporum* (Brillowska-Dabrowska et al., 2007)

Mykotická infekcia vyvolaná keratofilnou vlákňitou hubou patriacej do ktorejkoľvek z uvedených skupín môže u človeka postihnúť ktorúkoľvek oblasť kože, vlasy alebo nechty, niekedy sa môže kombinovať postihnutie viacerých oblastí resp. keratínových štruktúr. Aj keď je najsprávnejšie označovať infekciu u konkrétneho pacienta podľa identifikovaného vyvolávateľa (napr. ako mikrospória, trichofýcia a pod.), často sa používa všeobecne latinské označenie „tinea“ doplnené o určenie lokalizácie postihnutia (napr. tinea pedis, tinea cruris, tinea unguium, atď.). Ako tinea capitis sa označuje dermatofytická infekcia ovlásenej časti hlavy, obočia a prípadne aj rias, zvyčajne však ide o postihnutie kože kapilícia a vlasov (Buchvald, 2008).

Význam mykotických infekcií kože, vonkajších slizníc, vlasov a nechtov, ako i vnútorných orgánov v ostatných rokoch výrazne narastá, a to nielen pre ich hromadné šírenie, ale často i pre závažnosť klinického obrazu systémových mykóz, nezriedka končiacich letálne. Niektoré mykotické infekcie môžu postihnúť ktorýkoľvek ľudský orgán a sú preto zaujímavé z hľadiska všetkých medicínskych odborov. Najčastejšou lokalitou nákazy je koža, vlasy a nechty, ktoré podľa svetových štatistík postihujú až 1/5 populácie. Ich hlavnými vyvolávateľmi sú keratofilné vlákňité huby – *dermatofyty*, ktoré sa v hojnom počte vyskytujú aj na uzemí Slovenska (Buchvald, 2006).

Dermatofytózy vlasatej časti hlavy (*Tinea capitis*):

Etiologickým agens mykotickej infekcie kapilícia môže byť antropofilný, zoofilný alebo geofilný dermatofyt, niektoré druhy však majú len veľmi obmedzenú schopnosť parazitovať na vlasoch (*Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*). Najčastejší pôvodcovia tinea capitis su uvedení v tabuľke. Spóry dermatofyta po prenesení na kožu hostiteľa adherujú na povrch keratinocytov stratum corneum a začínajú pučať a tvoriť reťazce buniek (hýfy), ktoré sa rozrastajú rôznymi smermi a po dosiahnutí ústia vlasového folikulu vrastajú aj do neho. Niektoré druhy dermatofytov majú schopnosť prenikať (pravdepodobne za pomoci produkovaných keratináz) do vnútra vlasu a vlákna huby potom rastú a produkujú nové spóry vo vnútri vlasového stvola. Takýto typ parazitizmu sa označuje ako **endotrix**, je typický pre antropofilné dermatofyty a ak sa infikovaný vlas odlomí, zvyčajne sa tak stane na úrovni vyústenia vlasového folikulu. Ak vlákna dermatofyta tvoria spóry len na povrchu vlasu, parazitizmus sa označuje ako **ektotrix**, je typický pre zoofilne dermatofyty (ale napr. aj pre antropofilný *Microsporum audouinii*) a vlasy sa zvyčajne lámu niekoľko milimetrov nad úrovňou kože. U postihnutého jedinca sa infekcia môže ďalej rozširovať zväčšovaním pôvodných ložísk do periférie alebo preniesť na iné miesta kože autoinokuláciou, napr. pri škrabaní. Neliečená infekcia zvyčajne ustúpi spontánne, môže však pretrvávať mesiace až roky a zanechať v kapilíciiu trvalé následky v podobe jazviacej alopecie (Buchvald, 2008).

Tab. č. 2: Najčastejší pôvodcovia tinea capitis

Keratinofilné huby spôsobujúce tinea capitis		
Antropofilné dermatofyty	Zoofilné dermatofyty	Geofilné dermatofyty
Trichophyton tonsurans	Microsporum canis	Microsporum gypseum
Microsporum audouinii	Trichophyton mentagrophytes	
Trichophyton violaceum	Trichophyton verrucosum	

Dermatofytózy fúzov (*Tinea barbae*):

Povrchová forma ochorenia kože s fúzami je charakterizovaná kruhovými ložiskami so zápalovým okrajom, so šupinami a pľuzgiermi. Hlboká forma (tzv. *sycosis parasitaria barbae*) je vlastne hubovou folikulitídou. Vytvárajú sa hrbolovité útvary, z ktorých pri stlačení vyteká hnis. Fúzy sa skoro uvoľňujú a ich koreňová časť máva belavý alebo našedlý povlak, tvorený mikroskopickou sieťou huby (Tanaka, 1992). U nás bývajú najčastejšími pôvodcami *T. verrucosum* a *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* (Frágner, 1984).

Dermatofytózy trupu a končatín (*Tinea corporis*):

Bežným a typickým prejavom povrchových foriem (nazývali sa tiež *herpes tonsurans*) sú kruhové alebo oválne, ostro ohraničené ložiská, často sa hoja v strede a šíria sa periférne. Okraj býva vyvýšený, živší zápalovej farby a na ňom (niekedy aj v ložisku) šupinky a podľa aktivity procesu rôzne silná reakcia. Splývaním ložísk sa vytvárajú polycyklické útvary. Hrubšie formy obvykle vznikajú z povrchových. Deje sa tak „cestou“ vlasu, po ktorom ako po koľajnici postupuje infekcia do hĺbky. Tieto typy sú formou folikulitíd (*folliculitis agminata*), alebo sú to hrbolovité útvary. Silne zápalové prejavy máva najčastejšie *T. verrucosum* a *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, menej zápalové príznaky máva *T. rubrum* (Frágner, 1984).

Dermatofytózy intertriginózných plôch (*Tinea cruris*)

Vyvíjajú sa hlavne v trieslovej oblasti a na vnútornej strane stehien (*tinea cruris*), ale nájdeme ich tiež perigenitálne a perianálne a menej často v podpaží. U nás najčastejším pôvodcom je *T. rubrum* (Frágner, 1984).

Dermatofytózy rúk a nôh (*Tinea pedis et manus*)

Typické prejavy na nohách sú najčastejšie v III. a IV. medziprstovom priestore. Začínajú svrbením a sčervenaním kože. Zápalové zmeny niekedy prestupujú na chrbát, nohy a chodidlá, kde vídať akútnejšie prejavy s pľuzgiermi, alebo chronickejšie s hyperkeratotickou formou s prasklinami. Na rukách sú známe formy s pľuzgiermi a na dlaniach s jemnými šupinkami. Obvykle to spôsobuje *T. rubrum*, menej často *T. mentagrophytas var. interdigitale* (Tanaka, 1992).

Dermatofytózy nechtov (dermatofytoonychózy, onychomykózy, *Tinea unguium*):

Onychomykóza nôh je najčastejšou formou mykotického postihnutia nechtov. Vo väčšine prípadov dochádza k rozšíreniu infekcie na nechty z dermatomykózy okolitej kože medziprstia alebo stupají. Invázia parazitickej huby do nechta začína na voľnom distálnom okraji nechtovej platničky, zriedkavejšie na jej bočných častiach. Prvými nápadnými prejavmi sú obvykle zmeny sfarbenia platničky, najčastejšie do žltá až do hnedasta. Pod nechtovou platničkou vznikajú hrubšie vrstvy hyperkeratotických, drobných štruktúr bielej a nažltlej farby. Nechtová platnička hrubne, stráca svoj lesk a transparentiu, na jej povrchu sú pozdĺžne vyvýšeniny a ryhy. Dochádza k oddeleniu platničky od nechtového lôžka, necht mäkne a postupne sa rozpadáva, čím sa obnaží celé nechtové lôžko (Buchvald, 2006).

Onychomykóza nôh postihuje predovšetkým dospelých, najmä staršie osoby, deti bývajú infikované podstatne zriedkavejšie. Hoci onychomykóza nôh vzniká najčastejšie sekundárnym šírením nákazy z postihnutej kože toho istého jedinca, možno pozorovať aj primárne infekcie bez badateľného chorobného procesu na koži. Vyvolávateľmi mykotickej infekcie nechtov nôh spomedzi dermatofytov sú u nás predovšetkým druhy *Trichophyton rubrum*, zriedkavejšie *Trichophyton interdigitale*, vzácne *Epidermophyton floccosum*, prípadne iné dermatofyty (Buchvald, 2006).

2 Cieľ práce

Cieľom predkladanej diplomovej práce bude:

1. teoretické osvojenie problematiky geofilných druhov húb z čeľade *Arthrodermataceae*, klasifikácia tejto čeľade, biológia (morfológia, fyziológia a taxonómia) jednotlivých druhov, ekologický a hygienicko - epidemiologický význam keratinolytických húb
2. aplikácia poznatkov o výskyte a spôsobe izolácii vo vzorkách vybraných lokalít Slovenska – analyzovať vzorky na prítomnosť geofilných dermatofytov a dermatofytoidov z čeľade *Arthrodermataceae*
3. izolácia a identifikácia zachytených kmeňov na druhovú úroveň podľa prístupnej a v súčasnosti platnej identifikačnej schémy na základe morfologických a fyziologických znakov
4. zhotovenie makro – a mikrofotografických snímok zachytávajúcich morfológiu pozorovaných kmeňov a ich porovnanie s výsledkami iných autorov
5. komplexné zhodnotenie prítomnosti diagnostikovaných druhov v pozitívnych lokalitách z ekologického a hygienicko - epidemiologického významu

3 Materiál a metodika

3.1 Vzorky a lokality štúdia

Výber pôdných vzoriek sme uskutočnili z viacerých lokalít Slovenska v období od marca 2007 do apríla 2009. Ide o týchto 12 lokalít: L1 – Smolenice – výbeh oviec, L2 – Smolenice – výbeh sliepok, L3 – Nitra areál SPU lamy, L4 – kompost Hlohovec (4 odbery), L5 – Veľká Fatra, L6 – Ďubákovo, L7 – Donovaly, L8 – Malá Fatra, L9 – Smolenice A, L10 – Smolenice B, L11 – Smolenice C, L12 – Smolenice D. Z každého stanovišťa /z každej vzorky/ sme urobili 10 subvzoriek /10 Petriho misiek/. Ako vnaďidlo sme použili konský vlas.

L1 - Smolenice – výbeh oviec

Silne exponovaný pozemok výkalmi a srst'ou oviec. Chov oviec prebieha v tomto areály už 27 rokov.

ODBER: Odobraté 1.11.2007. Založené 4.11.2007.

L2 – Smolenice – výbeh sliepok

Silne exponovaný pozemok výkalmi a perím sliepok. Chov sliepok sa v tomto areály uskutočňuje od roku 1973.

ODBER: Odobraté 1.11.2007. Založené 4.11.2007.

L3 – Nitra areál SPU lamy

Silne exponovaný pozemok výkalmi a srst'ou zvierat.

ODBER: Odobraté 6.11.207. Založené 7.11.2007.

L4- kompost Hlohovec

Vzorky boli odobrané z vyzrievajúceho kompostu, ktorý je vytvorený zo živočíšneho odpadu z blízkeho zajačieho bitúnka. Kompost obsahuje zvyšky srsti, uší a predných labiek. Materiál sa drví v špeciálnej drvičke a zároveň sa mieša so slamou. Kompost vznikol v roku 2004 a je voľne uložený. Odber sa uskutočnil z štyroch sublokalít (4.

sond). V sublokalite č.1 bol kompost založený v marci 2004, v sublokalite č.2 v októbri 2004, v sublokalite č.3 v júni roku 2005 a v sublokalite č.4 v októbri 2006.

ODBER: Odobraté 2. 3. 2007. Založené 5. 3. 2007.

L5 – Veľká Fatra

Lúka v nadmorskej výške 1200 m nad morom. Prístup len náhodných zvierat, málo exponovaná plocha. V minulosti bola lúka pasienkom. Pôda vykazuje veľmi nízku kvalitu.

Odber: Založené 25. 9. 2007

L6 – Ďubákovo

Vzorka bola odobraná v lokalite Ďubákovo v nadmorskej výške 920 m.

ODBER: Založené 17. 9. 2007

L7 – Donovaly

Vzorka bola odobratá na lúke, málo exponovaná plocha, pôda nízkej kvality.

ODBER: Založené 17. 9. 2007

L8 – Malá Fatra

Vzorka bola odobraná v lokalite Príslop, 1100 m. nad morom, málo exponovaná lokalita s nízkou kvalitou pôdy. V minulosti bola lúka pasienkom

ODBER: Založené 25. 9. 2007

L9 – Smolenice A

Odobratá lesná pôda v blízkosti krmidla zveri. Oblasť silne exponovaná výkalmi a srst'ou zveri.

ODBER: Odobraté 27. 3. 2009. Založené 6. 4. 2009

L10 – Smolenice B

Odobratá poľná pôda v oblasti krmidla. Oblasť silne exponovaná srst'ou zveri a vtáčím perím.

ODBER: Odobraté 27. 3. 2009. Založené 6. 4. 2009

L11 – Smolenice C

Odobratá poľná pôda v oblasti krmidla. Oblasť silne exponovaná výkalmi a srst'ou zveri.

ODBER: Odobraté 27. 3. 2009. Založené 6. 4. 2009

L12 – Smolenice D

Odobratá poľná pôda z ústia nory, bez viditeľnej prítomnosti keratinózneho materiálu.

ODBER: Odobraté 27. 3. 2009. Založené 6. 4. 2009

3.2 Odber a izolácia vzoriek

Odber vzoriek: Na analýzu boli použité len najvrchnejšie vrstvy (1 - 3 cm) pôdneho profilu resp. 1 - 5 cm. Vzorky boli po dobu analýzy skladované pri teplote 4 – 5 °C.

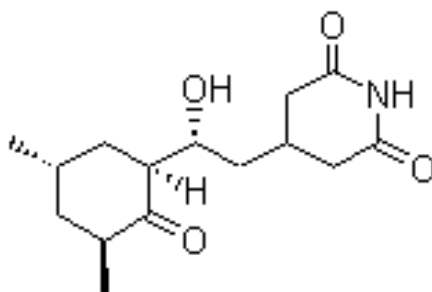
Izolácia: vychádza z postupu podľa Vanbreuseghema (1952)

Každá vzorka bola rozdelená na 10 subvzoriek (= 10 Petriho misiek). Subvzorka o hmotnosti cca. 20 g bola nasypaná do vrstvy približne jednej polovice Petriho misky a ovlhčená 10 - 20 ml (v závislosti od pôvodnej vlhkosti vzorky) antibiotického roztoku cykloheximidu = aktidiónu (500 mg/l, CALBIOCHEM, La Joila, USA) a chloramfenikolu (50 mg/l, PENTA, Praha, Česká republika). Na samotnú izoláciu keratinolytických húb boli ako návnada použité sterilizované konské vlasy. Pred ich použitím boli tieto odmastené saponátom a opláchnuté vodovodnou vodou (pranie). Po nastrihaní na 1-3 cm kúsky boli vlasy vysterilizované pri teplote 120 °C, tlaku 120 kPa v autokláve. Na povrch pôdy v subvzorke boli vlasy ukladané sterilnou pinzetou v počte cca. 10 - 20 kusov na jednu Petriho misku. Kultivácia prebiehala pri

laboratórnej teplote (22 - 25 °C) pri difúznom dennom svetle, počas 2 - 3 mesiacov. Petriho misky boli kontrolované na prítomnosť keratinolytických húb v priemere každý týždeň. V prípade potreby boli pôdy a/alebo piesok ovlhčené sterilnou destilovanou vodou.

3.2.1 Cykloheximid (= aktidión)

Chemický vzorec: $C_{15}H_{23}NO_4$; (3-[2-(3,5-Dimetyl-2-oxocyklohexyl)-2-hydroxyetyl]glutarimid; [1S-[1alfa(S*),3alfa,5beta]]-4-[2-(3,5-Dimetyl-2-oxocyklohexyl)-2-hydroxyetyl]-2,6-piperididion)

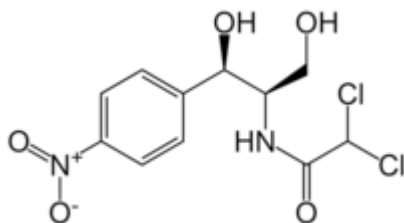


Obrázok 1: Štruktúrny vzorec

Cykloheximid je selektívne antibiotikum, používa sa ako inhibítor proteosyntézy eukaryontných organizmov (viaže 80S podjednotku eukaryotného ribozómu). Používa sa predovšetkým v mikrobiológii ako prísada do pôd pre kultiváciu baktérií a niektorých patogénnych húb v prítomnosti kvasiniek a mikroskopických húb. Vo výskume je dôležitým pomocníkom pri štúdiách proteosyntézy v dôležitých procesoch ako je apoptóza, regulácia bunkového cyklu či meiózy. Cykloheximid je vysoko toxický a nepoužíva sa ako terapeutické antibiotikum pre ľudí. Preto aj v laboratórnych podmienkach je nutné striktne dodržiavať bezpečnosť pri práci (<http://www.chemicaland21.com/lifescience/phar/CYCLOHEXIMIDE.htm>).

3.2.2 Chloramfenikol

Chemický vzorec: $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$; (2,2-dichlór-N-[(aR,bR)-b-hydroxy-a-hydroxymetyl-4-nitrofenetyl]acetamid)



Obrázok 2: Štruktúrny vzorec

Chloramfenikol je bakteriostatické antibiotikum (zastavuje rast baktérii) inhibujúce účinok enzýmu peptidyl transferázy, ktorý potláča ribozomálnu aktivitu a syntézu proteínov chránením väzby amino acyl - tRNA na A – stranu 50S podjednotky. Toto antibiotikum bolo prvý krát izolované z baktérie *Streptomyces venezuelae*, v súčasnosti je vyrábané synteticky. Účinkuje bakteriostaticky v štádiu množenia mikroorganizmov, zasahuje do syntézy bielkovín. Chloramfenikol je účinný proti širokému spektru mikroorganizmov, no pre jeho vážne nežiaduce účinky (napr. poškodenie kostnej drene, vyvoláva nechutenstvo, vracanie, alergie, u detí tzv. sivý syndróm - neschopnosť detoxikácie chloramfenikolu až s možným rizikom vzniku aplastickej anémie) je obvyčajne rezervované na liečbu vážnych a život ohrozujúcich infekcií (napr. brušný týfus, bakteriálna meningitída, čierny kašeľ) (<http://en.wikipedia.org/wiki/Chloramphenicol>).

3.3 Identifikácia

Identifikácia izolovaných húb bola primárne vykonaná na základe makromorfologických a mikromorfologických znakov na Sabouradovom agare (SGA; BOKAR DIAGNOSTICS, Allonne, France) podľa kľúčov a identifikačných postupov (Domsch et al., 1980; de Hoog et al., 2000). Viditeľné, narastené kolónie húb na kúskoch vlasov boli zo sterilných podmienok prenesené pomocou sterilnej očkovacej ihly na SGA. Kultivácia prebehla pri teplote 25 °C a 37 °C, počas 7 až 14 dní, v tme.

Mikroskopické pozorovanie bolo vykonané pomocou svetelného mikroskopu (typ Olympus Provis CX 21, Tokyo, Japan).

3.3.1 *Mikrosnímky a merania*

Pre zhotovovanie mikrosnímkov bol použitý svetelný mikroskop (Olympus Provis AX) s digitálnym fotoaparátom Olympus 5050 a pre meranie veľkosti konídií software Micro Image ver. 4.0 a Camedia, Tokyo, Japan.

3.3.2 *Stanovenie indikátorov výskytu geofilných druhov z čeľade Arthrodermataceae*

Vybrané indikátory (podľa Ulfig et al., 1997)

1. Frekvencia izolácie rodov *Microsporum* a *Trichophyton* vyjadrená ako počet Petriho misiek pozitívnych na *Microsporum* a *Trichophyton* /celkový počet Petriho misiek použitých pre vzorku
2. Množstvo izolovaných druhov
3. Množstvo izolovaných kmeňov
4. L – index: počet kmeňov *Microsporum* a *Trichophyton* a ich teleomorfných štádií / počet Petriho misiek

4 Výsledky

Z celkového počtu 12 sledovaných lokalít (15 vzoriek a 150 subvzoriek), ktoré boli predmetom nášho skúmania boli z rodu *Trichophyton* zachytené a diagnostikované druhy *Trichophyton ajelloi* a *Trichophyton terrestre* a z rodu *Microsporum* druh *Microsporum gypseum*. *T. ajelloi* sa vyskytoval v deviatich lokalitách a *T. terrestre* len vo vzorkách odobratých v obci Smolenice (Smolenice – ovce, Smolenice – sliepky a Smolenice B). *Microsporum gypseum* sa nachádzalo v lokalite Nitra areál SPU lamy a v dvoch vzorkách v lokalite kompost Hlohovec. V lokalitách SPU lamy, Malá Fatra a Smolenice B bolo zistené teleomorfné štádium *Arthroderma uncinatum*. *Arthroderma quadrifidum* sa nachádzala len v jednej lokalite, a to vo Veľkej Fatre.

4. 1 Izolácia a identifikácia zachytených geofilných húb z čeľade *Arthrodermataceae*

4.1.1 I z o l á c i a

Izoláty predstavujúce *T. ajelloi*, *T. terrestre* a *Microsporum gypseum* boli pozorované na vlasovej návnade vo väčšine prípadov už v prvom týždni inkubácie. Rod *Trichophyton* vytváral na fragmentoch vlasu pieskovo žlté obrasty, ktoré vytvárali kolónie, rod *Microsporum* vytváral na fragmentoch vlasu snehovo biele obrasty, ktoré vytvárali kolónie.

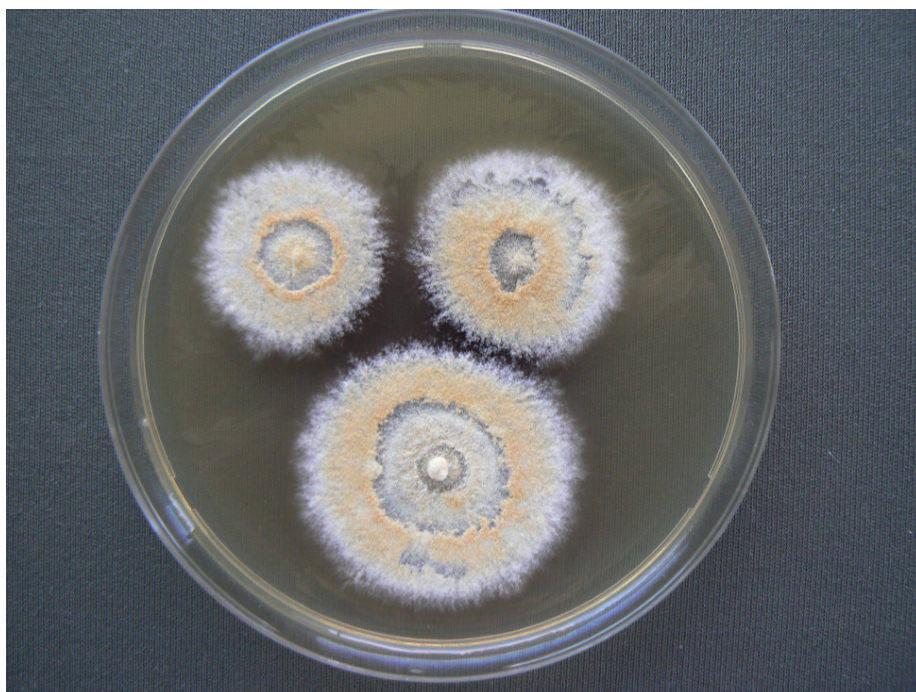
Fragment vlasu bol pomocou nožníc odstrihnutý a prenesený na podložné sklíčko s kvapkou laktofenolu. V preparátoch bolo pozorované veľké množstvo cylindrických (*T. ajelloi*) aj morfológicky heterogénnych (*T. terrestre*) konídií, ktoré zodpovedali charakteristike rodu *Trichophyton* a vretenovitých konídií (*M. gypseum*), ktoré štruktúrou bunkovej steny zodpovedali charakteristike rodu *Microsporum*.

4.1.2 Identifikácia

Trichophyton ajelloi:

Makroskopický vzhľad:

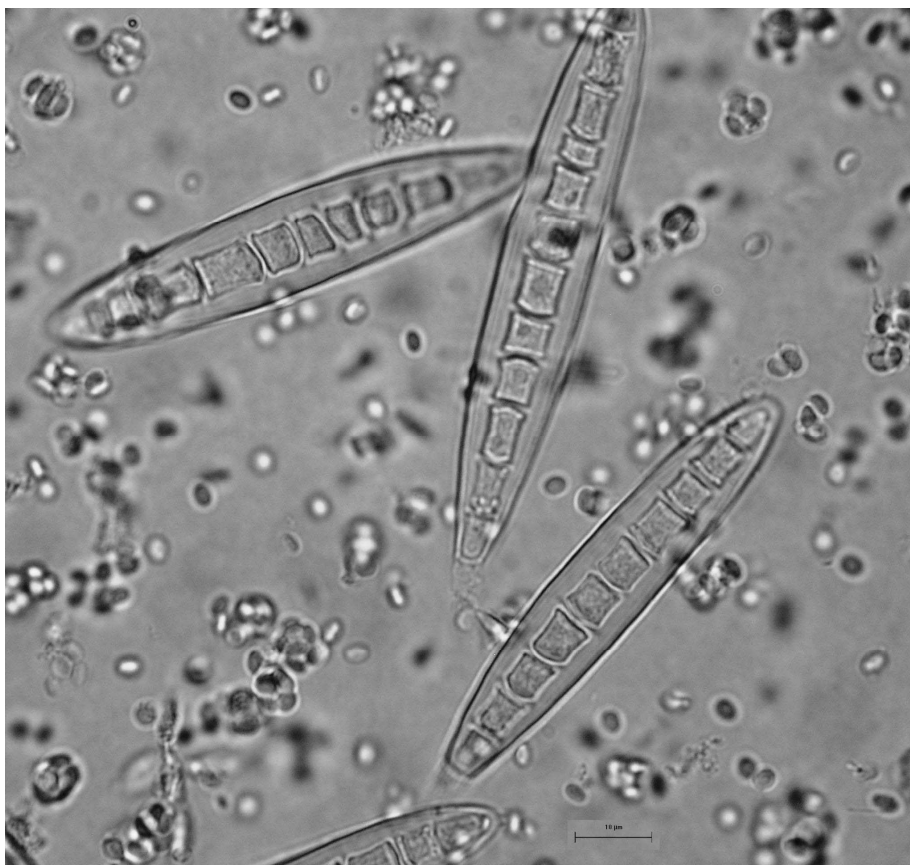
Izolované kolónie (obrázok 3) boli charakteristické pieskovou bledo žltou až oranžovou farbou, miestami boli zamatovo zelené, štruktúra bola viacmenej granulovitá až prášková, so svetlým resp. belavým okrajom. Spodná strana kolónie (reverz) bola zväčša krémová až žltkastá s tmavo purpurovými až čiernymi pigmentami.



Obrázok 3: kolónie *T. ajelloi* na SGA

Mikroskopický vzhľad:

V kultúrach boli prítomné makrokonídie (obrázok 4) typického cigarového tvaru, hladkostenné, priehľadné, rozdelené 9 - 11 (najčastejšie 9) priečnymi priehradkami.



Obrázok 4: *T. ajelloi*; makrokonídie. Mierka 10 μm.

Schopnosť perforovať vlas *in vitro*

Vo všetkých testovaných izolátoch *T. ajelloi* bola pozorovaná intenzívna tvorba perforácií v koniských vlasoch priamo na návnade.

Trichophyton terrestre

Makroskopický vzhľad:

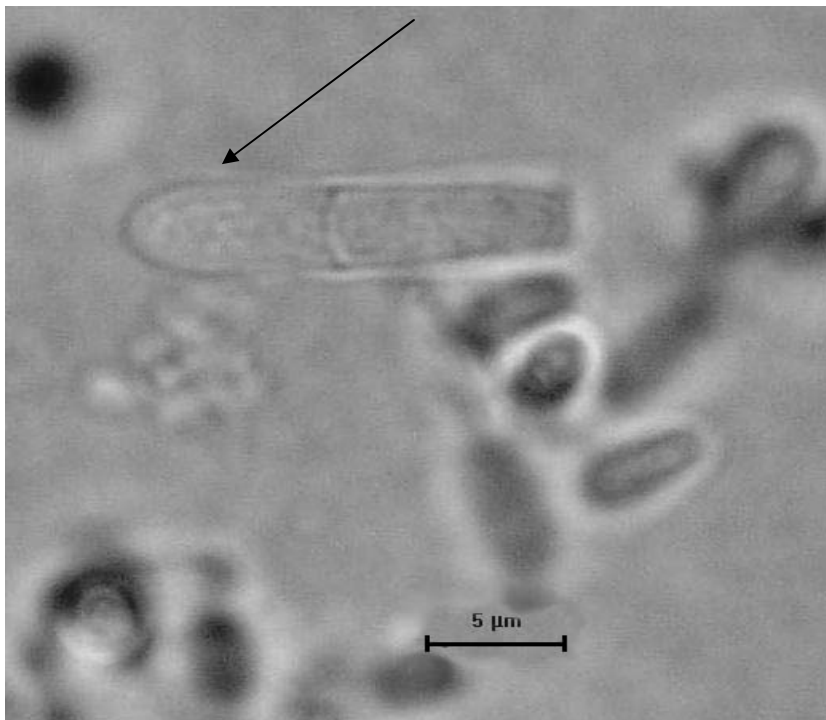
Izolované kolónie dosiahli na SGA po 10 dňoch pri 25 °C veľkosť 1,5 – 4,0 mm (priemerne 2,78 mm). Kolónie mali vatovú štruktúru charakteristickú bielou farbou, neskôr bola štruktúra granulovitá krémovej farby, so svetlým resp. belavým okrajom (obrázok 5). Spodná strana kolónie (reverz) bola zväčša pieskovo žltá až oranžová.



Obrázok 5: kolónie *T. terrestre* na SGA

Mikroskopický vzhľad:

V kultúrach boli prítomné dvojbunkové až štvorbunkové makrokonídie (obrázok 6) typického valcovitého tvaru, hladko a tenkostenné. Prítomné mikrokonídie boli valcovitého až kyjačikovitého tvaru s uťatou bázou.



Obrázok 6: *T. terrestre*; makrokonídie dvojbunkové (šípka), mikrokonídie.

Schopnosť perforovať vlas *in vitro*

Vo všetkých testovaných izolátoch *T. terrestre* bola pozorovaná intenzívna tvorba perforácií v konských vlasoch priamo na návnade.

Microsporum gypseum

Makroskopický vzhľad:

Izolované kolónie (obrázok 7) dosiahli na SGA po 10 dňoch pri 25 °C veľkosť 17 – 25 mm (priemerne 21,5 mm). Kolónie mali charakteristicky svetlý resp. belavý okraj, stred žltej farby s mierne oranžovým nádychom.

Tvar kolónii bol mierne vypuklý, s flokóznou (vatovitou) štruktúrou, v strede viac menej granulóznou (zrnitou). Spodná strana kolónie (reverz) bola zväčša špinavo žltá až oranžová niekedy žltohnedá.



Obrázok 7: kolónie *M. gypseum* na SGA

Mikroskopický vzhľad:

V kultúrach boli prítomné vetvené, septované vlákna, v priemere 3 – 4 µm, s početnými vetvami a raketovým typom hýf.

Prítomné makrokonídie (obrázok 8) boli typického vretenovitého tvaru (s koncami rovnomerne zúženými), výrazne drsnou bunkovou stenou, rozdelené 4 – 8 (najčastejšie 5) priečnymi priehradkami.



Obrázok 8: *M. gypseum*; makrokonídie

Schopnosť perforovať vlas *in vitro*

Vo všetkých testovaných izolátoch *M. gypseum* bola pozorovaná intenzívna tvorba perforácií v konských vlasoch priamo na návnade.

Arthroderma uncinatum

Izoláty predstavujúce teleomorfne štádium *T. ajelloi*, t.j. *Arthroderma uncinatum* boli určené na základe mikromorfologickej stavby hrubostenných ježkovitých buniek činkovitého (kostovitého) tvaru narastených priamo na izolovanej vlasovej návnade. Prítomné askospóry boli sploštené, elipsovitého tvaru. Asky (vrecká) boli polguľovité, tenkostenné, obsahovali po osem askospór. Prítomné boli aj špirálovité hladko stenné septované prívesky.

Arthroderma quadrifidum

Izoláty predstavujúce teleomorfne štádium *T. terrestre* boli určené na základe mikromorfologickej stavby tučnostenných ježkovitých buniek činkovitého tvaru s výraznejším kĺbom na jednej strane. Askospóry boli priehľadné, hladké, sploštené, vo

veľkom množstve žlté. Asky boli polguľovité, tenkostenné, 8 – spórové; Peridiálna hýfa bola priehľadná, septovaná, bledožltá, háčikovito vetvená od kraja hlavnej hýfy. Prívesky koncové alebo postranné. Septované špirály varírovali v dĺžke a v počte otáčok (prstencov).

4.2 Ekologická štúdia (miesto výskytu a celková početnosť druhov)

Z 12 analyzovaných vzoriek pôd najvyššiu frekvenciu výskytu (75 %) predstavoval druh *Trichophyton ajelloi*. Výskyt tohto druhu bol zaznamenaný v deviatich vzorkách pôd a celkový počet jeho izolátov bol 568. Frekvencia výskytu a vysoká početnosť dokazuje, že sa jedná o veľmi rozšírený kozmopolitný druh.

Druhy *Trichophyton terrestre*, *Microsporum gypseum* a teleomorfa *Arthroderma uncinatum* boli detekované v troch lokalitách s frekvenciou výskytu 25 %. *Arthroderma quadrifidum* sa nachádzala len v jednej lokalite (L5 – Veľká Fatra), čo predstavuje frekvenciu výskytu 8,3 %.

Anamorfné štádiá (*T. ajelloi*, *T. terrestre*, *M. gypseum*) boli zaznamenané už v počiatočnej fáze inkubácie, zatiaľ čo teleomorfné štádiá (*A. uncinatum*, *A. quadrifidum*) vykazovali rast až po niekoľkých týždňoch inkubácie. Táto skutočnosť bola pravdepodobne spôsobená znížením obsahu organických látok v substráte, čo malo za následok prechod nepohlavnej fázy do pohlavnej.

Jednotlivé počty zachytených izolátov (a druhov)

V tabuľkách č. 3 až 14 je uvedený počet izolátov geofilných druhov húb z čeľade *Arthrodermataceae* v jednotlivých lokalitách. Najviac vyizolovaných druhov pochádzalo z lokality Nitra areál SPU lamy, kde boli zachytené tri druhy, a to *Trichophyton ajelloi*, *Microsporum gypseum* a *Arthroderma uncinatum*.

Geofilné druhy dermatofytov neboli zaznamenané v lokalite Smoenice D (Tab. č. 14) a v lokalite Hlohovec (Tab. č. 6) v dvoch sublokalitách (Hlohovec C, Hlohovec

D). V týchto vzorkách bol keratín rozkladaný predovšetkým rodmi *Chrysosporium* a *Myceliophthora*. Rast týchto húb bol zaznamenaný aj v iných lokalitách.

Vysvetlivky: *T.* = *Trichophyton*, *M.* = *Microsporum*, *A.* = *Arthroderma*

Tab. č. 3: Počet izolátov geofilných druhov húb z čeľade *Arthrodermataceae* v lokalite L1 (dátum odberu 1.11.2007).

L1 - Smolenice - ovce (založené 6.11.2007)						
Druh	I. Kontrola	II. Kontrola	III. Kontrola	IV. Kontrola	V. Kontrola	Σ
<i>T. terrestre</i>	1	8	4	29	1	42

Tab. č. 4: Počet izolátov geofilných druhov húb z čeľade *Arthrodermataceae* v lokalite L2 (dátum odberu 1.11.2007).

L2 - Smolenice - sliepky (založené 6.11.2007)						
Druh	I. Kontrola	II. Kontrola	III. Kontrola	IV. Kontrola	V. Kontrola	Σ
<i>T. ajelloi</i>	1	4	3	0	0	8
<i>T. terrestre</i>	1	3	0	1	0	5

Tab. č. 5: Počet izolátov geofilných druhov húb z čeľade *Arthrodermataceae* v lokalite L3 (dátum odberu 6.11.2007).

L3 - Nitra areál SPU Iamy (založené 7.11.2007)						
Druh	I. Kontrola	II. Kontrola	III. Kontrola	IV. Kontrola	V. Kontrola	Σ
<i>T. ajelloi</i>	1	74	52	1	0	128
<i>M. gypseum</i>	1	9	0	2	19	31
<i>A. uncinatum</i>	0	0	0	0	3	3

Tab. č. 6: Počet izolátov geofilných druhov húb z čeľade *Arthrodermataceae* v lokalite L4 (dátum odberu 2.3.2007).

L4 - kompost Hlohovec (založené 5.3.2007)					
vzorka A					
druh	I. Kontrola	II. Kontrola	III. kontrola	IV. kontrola	Σ
<i>M. gypseum</i>	16	32	1	0	49
vzorka B					
druh	I. Kontrola	II. Kontrola	III. Kontrola	IV. Kontrola	Σ
<i>M. gypseum</i>	2	4	0	0	6
<i>T. ajelloi</i>	0	6	4	0	10
vzorka C					
druh	I. Kontrola	II. Kontrola	III. Kontrola	IV. Kontrola	Σ
žiadny nález					
vzorka D					
druh	I. Kontrola	II. Kontrola	III. Kontrola	IV. Kontrola	Σ
žiadny nález					

Tab. č. 7: Počet izolátov geofilných druhov húb z čeľade *Arthrodermataceae* v lokalite L5 – odobratá lúčna pôda.

L5 – Veľká Fatra (založené 25.9.2007)								
Druh	I. Kontrola	II. Kontrola	III. Kontrola	IV. Kontrola	V. Kontrola	VI. Kontrola	VII. Kontrola	Σ
<i>T. ajelloi</i>	0	5	7	12	19	16	1	60
<i>A. quadrifidum</i>	0	0	0	0	0	0	13	13

Tab. č. 8: Počet izolátov geofilných druhov húb z čeľade *Arthrodermataceae* v lokalite L6 - odobratá lesná pôda.

L6 – Ďubákovo (založené 17.9.2007)								
Druh	I. Kontrola	II. Kontrola	III. Kontrola	IV. Kontrola	V. Kontrola	VI. Kontrola	VII. Kontrola	Σ
<i>T. ajelloi</i>	3	10	6	13	11	3	34	80

Tab. č. 9: Počet izolátov geofilných druhov húb z čeľade *Arthrodermataceae* v lokalite L7 - odobratá lúčna pôda.

L7 – Donovaly (založené 17.9.2007)								
Druh	I. Kontrola	II. Kontrola	III. Kontrola	IV. Kontrola	V. Kontrola	VI. Kontrola	VII. Kontrola	Σ
<i>T. ajelloi</i>	8	10	25	13	16	15	0	87

Tab. č. 10: Počet izolátov geofilných druhov húb z čeľade *Arthrodermataceae* v lokalite L8 - odobratá lúčna pôda.

L8 – Malá Fatra (založené 25.9.2007)								
Druh	I. Kontrola	II. Kontrola	III. Kontrola	IV. Kontrola	V. Kontrola	VI. Kontrola	VII. Kontrola	Σ
<i>T. ajelloi</i>	16	26	45	17	7	3	0	114
<i>A. uncinatum</i>	0	0	0	2	1	1	0	4

Tab. č. 11: Počet izolátov geofilných druhov húb z čeľade *Arthrodermataceae* v lokalite L9 - odobratá lesná pôda pri kýmidle zveri (dátum odberu 27.3.2009).

L9 – Smolenice A (založené 6.4.2009)						
Druh	I. Kontrola	II. Kontrola	III. Kontrola	IV. Kontrola	V. Kontrola	Σ
<i>T. ajelloi</i>	0	2	16	12	7	37
<i>A. uncinatum</i>	0	0	0	3	1	3

Tab. č. 12: Počet izolátov geofilných druhov húb z čeľade *Arthrodermataceae* v lokalite L10 – odobratá poľná pôda pri kýmidle zveri (dátum odberu 27.3.2009).

L10 – Smolenice B (založené 6.4.2009)						
Druh	I. Kontrola	II. Kontrola	III. Kontrola	IV. Kontrola	V. Kontrola	Σ
<i>T. terrestre</i>	0	0	5	14	11	30

Tab. č. 13: Počet izolátov geofilných druhov húb z čeľade *Arthrodermataceae* v lokalite L11 – odobratá poľná pôda v ústí nory (dátum odberu 27.3.2009).

L11 – Smolenice C (založené 6.4.2009)						
Druh	I. Kontrola	II. Kontrola	III. Kontrola	IV. Kontrola	V. Kontrola	Σ
<i>T. ajelloi</i>	0	7	11	23	3	44

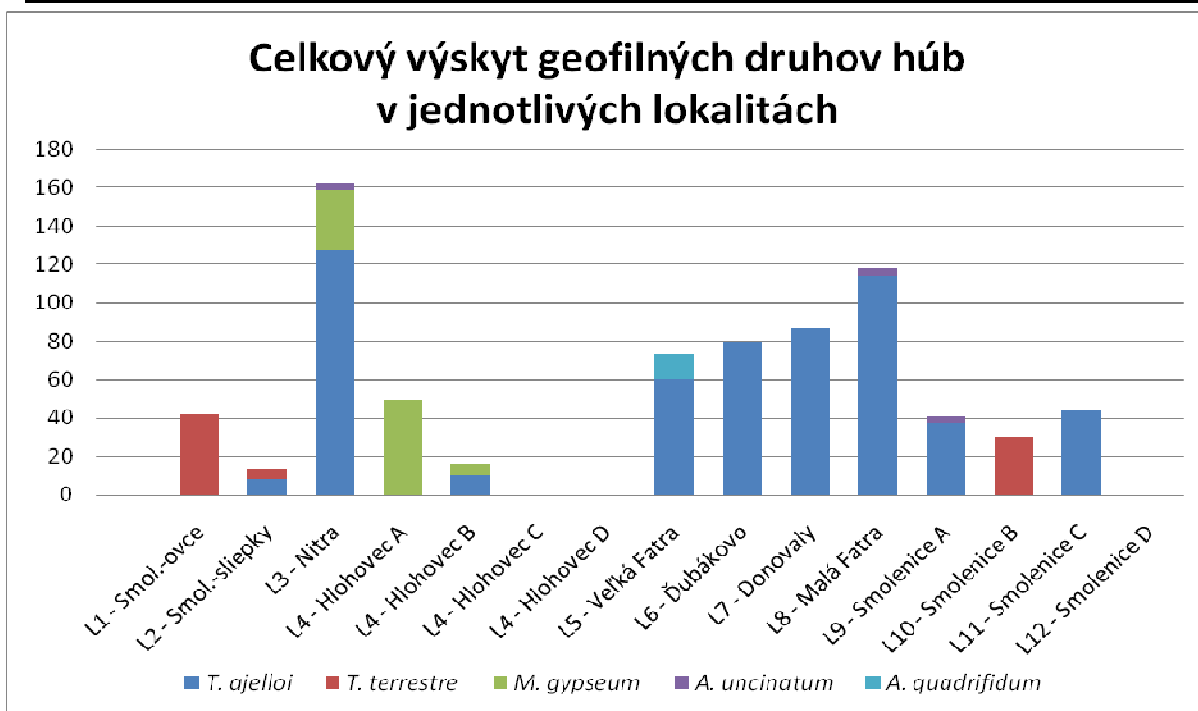
Tab. č. 14: Počet izolátov geofilných druhov húb z čeľade *Arthrodermataceae* v lokalite L12 - odobratá poľná pôda v ústí nory (dátum odberu 27.3.2009).

L12 – Smolenice D (založené 6.4.2009)						
Druh	I. Kontrola	II. Kontrola	III. Kontrola	IV. Kontrola	V. Kontrola	Σ
žiadny nález						

Druh *T. ajelloi* bol zachytený najčastejšie s celkovým počtom 568 izolátov. Nasledovali druhy *M. gypseum* s 86 izolátmi a *T. terrestre* so 77 izolátmi. Teleomorfné štádiá sa vyskytovali len ojedinele (*A. quadrifidum* – 13 izolátov, *A. uncinatum* – 11 izolátov).

Tab. č. 15: Celkový výskyt geofilných druhov húb v jednotlivých lokalitách.

Lokalita	Druh				
	<i>T. ajelloi</i>	<i>T. terrestre</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>A. uncinatum</i>	<i>A. quadrifidum</i>
L1 - Smol.-ovce	-	42	-	-	-
L2 - Smol.-sliepky	8	5	-	-	-
L3 - Nitra	128	-	31	3	-
L4 - Hlohovec A	-	-	49	-	-
L4 - Hlohovec B	10	-	6	-	-
L4 - Hlohovec C	-	-	-	-	-
L4 - Hlohovec D	-	-	-	-	-
L5 - Veľká Fatra	60	-	-	-	13
L6 - Ďubákovo	80	-	-	-	-
L7 - Donovaly	87	-	-	-	-
L8 - Malá Fatra	114	-	-	4	-
L9 - Smolenice A	37	-	-	4	-
L10 - Smolenice B	-	30	-	-	-
L11 - Smolenice C	44	-	-	-	-
L12 - Smolenice D	-	-	-	-	-
Spolu	568	77	86	11	13

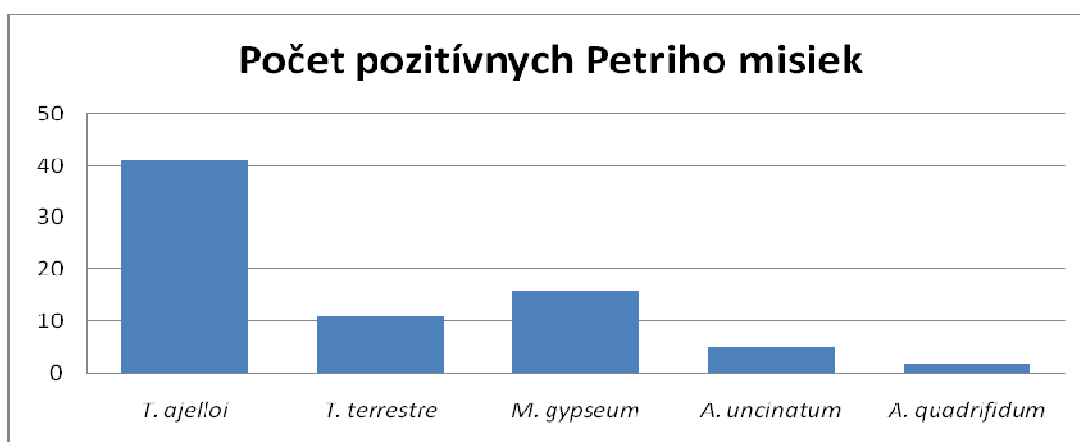


Obrázok 9: celkový výskyt geofilných druhov húb

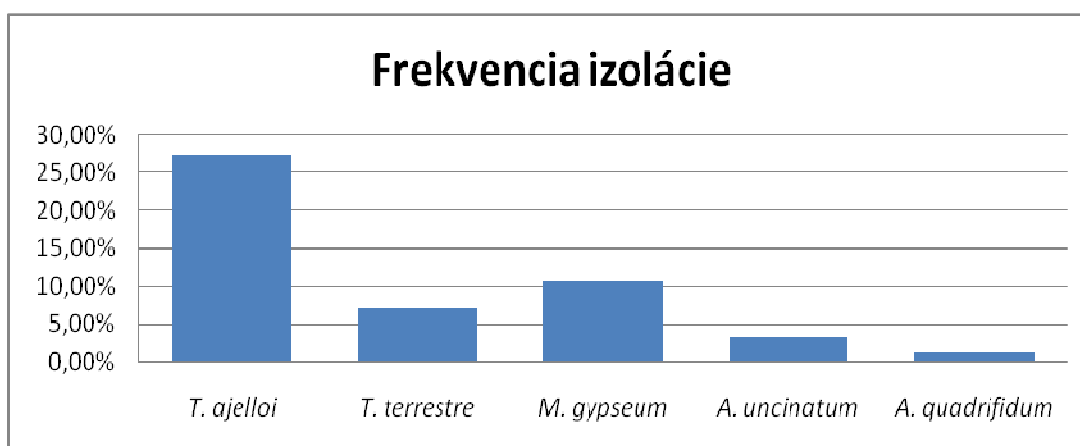
Na základe indikácie výskytu keratinolytických húb podľa Ulfiga et al. (1997) boli vypočítané nasledovné hodnoty uvádzané v tabuľke č. 16.

Tab.č. 16: Ekologické indikátory výskytu a abundancie zástupcov rodov *Trichophyton* a *Microsporum* z rôznych lokalít Slovenska vyšetrovaných v období marec 2007 – apríl 2009

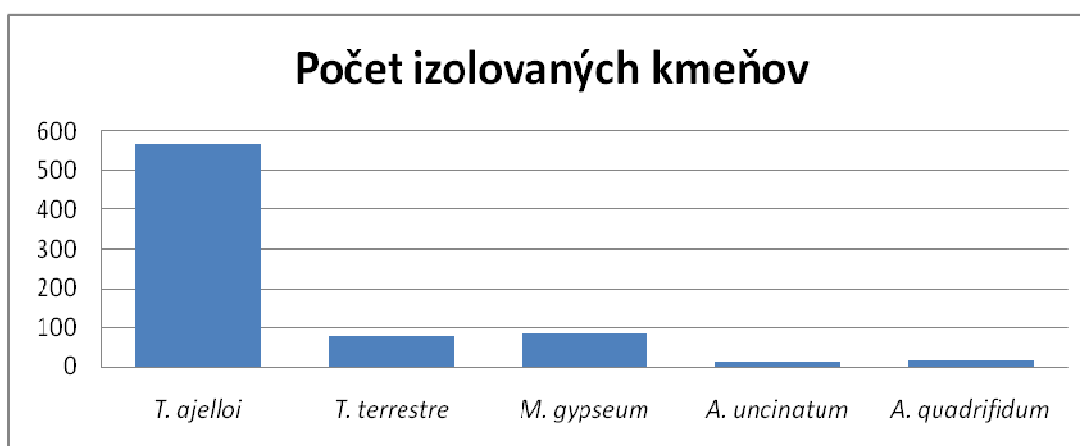
Počet Petriho misiek		150
Počet pozitívnych P. misiek na:	<i>T. ajelloi</i>	41
	<i>T. terrestre</i>	11
	<i>M. gypseum</i>	16
	<i>A. uncinatum</i>	5
	<i>A. quadrifidum</i>	2
Frekvencia izolácie pre:	<i>T. ajelloi</i>	27,3 %
	<i>T. terrestre</i>	7,3 %
	<i>M. gypseum</i>	10,7 %
	<i>A. uncinatum</i>	3,3 %
	<i>A. quadrifidum</i>	1,3 %
Počet izolovaných druhov		5
Počet izolovaných kmeňov	<i>T. ajelloi</i>	568
	<i>T. terrestre</i>	77
	<i>M. gypseum</i>	86
	<i>A. uncinatum</i>	11
	<i>A. quadrifidum</i>	13
L - index	<i>T. ajelloi</i>	3,79
	<i>T. terrestre</i>	0,51
	<i>M. gypseum</i>	0,57
	<i>A. uncinatum</i>	0,07
	<i>A. quadrifidum</i>	0,09



Obrázok 10: Ekologické indikátory výskytu a abundancie zástupcov rodov *Trichophyton* a *Microsporum* - počet pozitívnych P. misiek



Obrázok 11: Ekologické indikátory výskytu a abundancie zástupcov rodov *Trichophyton* a *Microsporum* - frekvencia izolácie



Obrázok 12: Ekologické indikátory výskytu a abundancie zástupcov rodov *Trichophyton* a *Microsporum* - počet izolovaných kmeňov

5 Diskusia

V predkladanej štúdii boli z geofilných druhov z čeľade *Arthrodermataceae* izolované tri anamorfné štádiá. *Microsporum gypseum* z rodu *Microsporum* Gruby, ktorý je charakteristický tvorbou makrokonídií s drsnou bunkovou stenou, a druhu *Trichophyton ajelloi* a *Trichophyton terrestre* z rodu *Trichophyton* Malmsten, ktorý je charakteristický produkciou makrokonídií s hladkou bunkovou stenou (Simpanya, 2000; Summerbell, 2000). Počas výskumu boli zachytené aj teleomorfné štádiá *Arthroderma uncinatum* Dawson & Gentles a *Arthroderma quadrifidum* Dawson & Gentles.

Izoláty zaradené do *M. gypseum* produkovali makrokonídie vretenovitého tvaru 3 – 8 bunkové, najčastejšie však 5 bunkové a dosahovali priemernú veľkosť 41,0 µm. Pri niektorých pozorovaných kmeňoch boli prítomne aj mikrokonídie klavátneho (kyjačikovitého) tvaru dosahujúce veľkosť 5,0 - 7,5 µm, s typicky hladkými a tenkými bunkovými stenami. Medzi ďalšie presvedčivé znaky, ktoré potvrdzujú správnosť druhového zaradenia, bola aj schopnosť perforovať vlasy *in vitro*. Pokiaľ ide o štruktúru a celkový makromorfológický vzhľad kolónii, izoláty tvorili viac menej práškovité kolónie, zo začiatku s prevahou bieleho, flokózneho mycélia, ktoré neskôr prešlo do takmer granulóznej štruktúry, pričom farba kolónie získala škoricovo-oranžový nádych. Spodná strana (reverz) bol v odtieňoch žltu oranžovej. Identifikácia druhu *M. gypseum* bola na základe typickej morfológickej stavby makrokonídií možná už z mikroskopického obrazu získaného v sklíčkovom preparáte kolonizovanej návnady (konského vlasu).

Druh *M. gypseum* patrí medzi typického predstaviteľa tzv. geofilných dermatofytov (Frágner, 1984; Simpanya, 2000) resp. s pôdou asociovaných dermatofytov (Summerbell, 2000).

Izoláty zaradené do druhu *T. ajelloi* produkovali makrokonídie cigarovitého (cylindrického) tvaru, 8 - 12 bunkové, najčastejšie však 9 bunkové a dosahovali priemernú veľkosť 72 µm. Prítomnosť mikrokonídií bola zaznamenaná pri priamom pozorovaní zachytených kmeňov na vlasovú návnadu a morfológicky zodpovedali popisu Domscha et al. (1980). Medzi ďalšie znaky, ktoré potvrdzujú správnosť druhového zaradenia, bola aj schopnosť perforovať vlasy *in vitro*. Izoláty tvorili práškovité kolónie so slabou produkciou vzdušného mycélia, pričom farba kolónie získala na 10 až 14 deň výrazné pieskovo oranžové zafarbenie. Spodná strana (reverz)

bola v odtieňoch tmavo fialovej až úplne čiernej. Typická morfológická stavba makrokonídií umožnila priamu druhovú identifikáciu na základe mikroskopického obrazu získaného v sklíčkovom preparáte kolonizovanej návnady (konského vlasu).

Druh *T. ajelloi* patrí medzi typického predstaviteľa tzv. geofilných dermatofytov (Frágner, 1984; Simpanya, 2000) resp. s pôdou asociovaných dermatofytov. Podľa Summerbella (2000) je druh *T. ajelloi* považovaný za tzv. dermatofytoid.

V 11 prípadoch boli priamo na návnade pozorované gymnoteciá (plodničky) zodpovedajúce druhu *Arthroderma uncinatum* Dawson et Gentles (Kirk et al., 2001). Sledované izoláty teleomorfného štádia boli identifikované do druhu *A. uncinatum* na základe produkcie typických gymnotecií tvorených peridiálnymi hýfami, ktorých bunky boli kosťovitého charakteru (osiformné) a bola zaznamenaná prítomnosť špirálovitých prívěskov. Ostatné znaky popisujúce morfológiu vreciek a askospór vrátane veľkosti plne zodpovedajú druhovému popisu *A. uncinatum* (Domsch et al., 1980; Currah, 1985).

Izoláty zaradené do druhu *Trichophyton terrestre* Durie et Frey boli identifikované na základe charakteristickej heterogenite makrokonídií, ktoré tvoria akýsi prechod od typických jednobunkových mikrokonídií ku mnohobunkovým klavátnym makrokonídiám (Summerbell et Kane, 1997; de Hoog et al., 2000). Izoláty vykazovali veľmi dobrý rast, boli spočiatku flokózne, neskôr prešli do práškovitej štruktúry, čo bolo spôsobené veľmi silnou sporuláciou. Pokiaľ ide o farebnosť kolónií tak študované izoláty produkovali mycélium v bledých odtieňoch a spodná strana bola zväčša uniformne žltá. Bola pozorovaná schopnosť perforovať vlasy *in vitro*.

V 13 prípadoch bola zaznamenaná teleomorfa *Arthroderma quadrifidum* Dawson et Gentles. Izoláty predstavujúce teleomorfné štádium anamorfy *T. terrestre* boli určené na základe mikromorfologickej stavby tučnostenných ježkovitých buniek činkovitého tvaru s výraznejším kĺbom na jednej strane. Askospóry boli priehľadné, hladké, sploštené, vo veľkom množstve žlté. Aský: polguľovité, tenkostenné, 8 – spórové; Peridiálna hýfa bola priehľadná, septovaná bleďožltá, háčikovito vetvená od kraja hlavnej hýfy. Na koncoch alebo po stranách sa nachádzali prívěsky, septované špirály varírovali v dĺžke a v počte otáčok (prstencov). *A. quadrifidum* je kozmopolitne rozšírený druh. V experimentálnych podmienkach môže byť spôsobená infekcia, inak to nie je zvyčajný patogén (Domsch et al., 1980).

Ekológia keratinolytických húb (vrátane dermatofytov) v pôde je relatívne dobre preštudovaná (Ulfig et al., 1997). Táto unikátna skupina húb môže existovať a za

priaznivých podmienok sa aj aktívne rozmnožovať v pôdach, v ktorých môže využívať rôzne formy keratínu. Frekvencia výskytu keratinofilných húb je podmienená množstvom biotických a abiotických faktorov (Chmel et al., 1972). Medzi abiotické faktory patria podľa týchto autorov najmä pH pôdy, pôdna vlhkosť, chemické zloženie a množstvo organickej hmoty v pôde. V štúdií podľa Chmela et al. (1972) sa zistilo, že výskyt keratinofilných húb bol priamoúmerný obsahu humusu v pôde.

Na základe zistení iných autorov, že keratinolytické huby sú asociované s aktivitou človeka a zvierat, často sa vyskytujú v husto obývaných oblastiach, kde zvyšky keratínu sú do pôdy kontinuálne dodávané, ale v neobývaných oblastiach je abundancia keratinolytických húb obmedzená zväčša len na polia hnojené maštalným hnojom a na miesta neustále alebo dočastne navštevované zvieratami (Ulfig, 2000), boli všetky vzorky odobraté len z lokalít, ktoré boli do značnej miery ovplyvnené výkalmi zvierat alebo hnojom (Smolenice-ovce, Smolenice-sliepky, SPU-lamy), alebo boli priamo tvorené organickými zvyškami živočíšneho pôvodu (kompost Hlohovec). Prítomnosť a distribúcia keratinolytických húb vo veľkej miere závisí od množstva prístupného keratinózneho materiálu pochádzajúceho z človeka, domestikovaných, synantropných alebo divých zvierat. Iné ekologické a environmentálne faktory ako sú napr. pH, teplota alebo nadmorská výška, sú menej dôležité, pretože tieto huby vykazujú voči nim širokú toleranciu (Marchisio, 2000).

V predkladanej štúdií sa zistilo, že z rodu *Trichophyton* bol hojne zastúpený hlavne druh *T. ajelloi* (prítomný v deviatich vzorkách) a v menšom množstve resp. menej frekventovane *T. terrestre* (prítomný v troch vzorkách). Druh *Microsporum gypseum* bol prítomný v troch vzorkách, ale s väčšou početnosťou kmeňov ako *T. terrestre*. Tieto druhy sú považované za celosvetovo rozšírené geofilné huby (Domsch et al., 1980; De Hoog et al., 2000). O skutočnosti, že *T. ajelloi*, *T. terrestre* a *M. gypseum* sú celosvetovo rozšírené, svedčia aj štúdie rôznych autorov, na Slovenku napr. práce Vollekovej (1985, 1992) a Chmela et al. (1972), a zo svetovej literatúry napr. Kurup et Schmitt (1970), Ulfig (1997), Papini (1998), Hubálek (2000), Deshmuk (2002), a i.

Volleková (1985) izolovala keratinofilné huby z pôdy a z výstielky nory hlodavcov. Dominantným druhom vo vzorkách z nôr aj poľa bol *T. ajelloi*, čo bolo zrejme podmienené slabo kyslou reakciou. Ďalším zastúpeným druhom bol *M. gypseum*, ktorý sa však vo väčšom množstve vyskytoval len v pôde poľa, v nore boli zachytené len dva izoláty. *T. terrestre* mal presne opačnú abundanciu ako *M. gypseum*,

počet izolátov v nore bol niekoľkonásobne vyšší ako na poli. Autorka vo svojej štúdií izolovala aj keratofilné huby z nadzemných častí rastlín, ktoré sa nachádzali v blízkosti nôr. Ich počet bol nižší než vo vzorkách pôdy a nôr.

Volleková (1992) ďalej študovala aj výskyt keratofilných húb v štyroch lesných pôdach s porovnaním poľnohospodárskej pôdy. Lesné pôdy sú zvyčajne chudobnejšie na keratofilné druhy ako pôdy záhradné a poľnohospodárske. Vo všetkých štyroch lesných pôdach dominoval *T. terrestre* nezávisle od pôdnej reakcie, množstva organických látok, druhu a typu pôdy či rastlinného porastu, ale v poľnohospodárskych pôdach chýbal alebo sa vyskytoval iba sporadicky. Druhy *T. ajelloi* a *M. gypseum* boli ojedinelé alebo chýbali v lesných pôdach, naproti tomu v poľnohospodárskej pôde boli zastúpené hojne (Volleková, 1992).

Chmel et. Vláčiliková (1977) izolovali na našom území *T. terrestre* v kyslých pôdach a *M. gypseum* v pôdach s vysokým obsahom humusu.

Podľa indických autorov (Deshmukh et Verekar, 2006), ktorí analyzovali pôdne vzorky pochádzajúce z rôznych miest horských oblastí indického štátu Himalach Pradesh, nadmorská výška nie je objektívnym ukazovateľom výskytu keratinolytických húb v prostredí. Autori zistili prítomnosť značného množstva dermatofytických druhov, medzi ktorými sa objavili *M. gypseum* a *T. terrestre* vo vzorkách odobratých z nadmorských výšok 800 až 3500.

Deshmuk (2002) skúmal v indickom štáte Kerala prítomnosť keratofilných húb vo viacerých lokalitách s rôznou pôdnou reakciou. *M. gypseum* sa nachádzal v každej z deviatich lokalít a bol druhým najčastejšie izolovaným druhom. *T. terrestre* sa nachádzal v štyroch lokalitách.

Ulfig et al. (1996) zisťovali výskyt keratinolytických húb v odpadových kaloch v Hornom Sliezsku. Zo 100 Petriho misiek bolo pozitívnych 89. Identifikoval 10 druhov, medzi nimi aj *T. ajelloi* s teleomorfou *A. uncinatum*, *T. terrestre* s teleomorfou *A. quadrifidum* a *M. gypseum*. Za kritické faktory výskytu označil množstvo organických látok a pH.

Papinny et al. (1998) izolovali geofilné dermatofyty v mestských parkoch, v ktorých bola vyššia frekvencia ľudí a domácich zvierat v oblasti Pisa v regióne Tuscany v Taliansku. *T. terrestre* prevažoval v povrchových vrstvách pôdy v neutrálnych až alkalických pôdach. *T. ajelloi* bol frekventovaný v pôdach bohatých na

humus, ktoré boli kyslé, neutrálne alebo alkalické. *M. gypseum* sa všeobecne nachádzal v pôdach bohatších na humus a preferoval slabo kyslú pôdnú reakciu.

Ulfig et al. (1997) popísali výskyt *T. ajelloi* a *T. terrestre* v sedimentoch rieky Tordera v Španielsku. *T. ajelloi* nebol izolovaný zo sedimentov v letných mesiacoch, kedy bolo značne zvýšené pH a teplota vody bola v rozsahu od 23,8 – 28,1 °C, pretože *T. ajelloi* je acidofilná huba a jej optimálna teplota pre rast je nižšia.

Kurup et Schmitt (1970) izolovali *T. ajelloi*, *T. terrestre* a *M. gypseum* v centrálnom Ohio v ZOO z rôznych pôdných stanovišť, ako sú brehy riek, park, otvorené pole, kultivovaná pôda, nory hlodavcov, zvieratá, vtáci, atď.

V Malaysii bol *T. terrestre* izolovaný z rôznych pôdných lokalít ako sú záhrada, pole a pôda brehov riek (Soon, 2006).

Simpanya et Baxter (1996) zisťovali na Novom Zélande úspešnosť využitia metódy izolácie keratinolytických a keratofilných húb na keratinovej návnade. Celkovo 236 vzoriek pôdy bolo odobratých z polí, lúk, brehov riek, parkov a okrajov ciest, teda miest s výraznou aktivitou ľudí a zvierat. Ako návnada bola použitá ovčia vlna a pôda bola zvlhčená destilovanou vodou s obsahom antibiotík. Vo vzorkách sa nachádzali okrem iných druhov aj *M. gypseum*, *T. terrestre* a *T. ajelloi*, pričom samotný rod *Trichophyton* zahŕňal 32,6 % z celkového počtu izolátov.

Ulfig et Karcz (1995) skúmali výskyt keratinolytických húb v uhoľnej bani v Poľsku. Zistili, že tieto mikroorganizmy sa v danej oblasti vyskytujú len zriedkavo. Z 300 vzoriek bolo pozitívnych len 48 (16 %). Jednalo sa predovšetkým o druh *T. ajelloi*. Všetky vzorky sa nachádzali na skalách obývaných sinicami alebo zbytkoch dreva. Z toho vyplýva, že výskyt keratinolytických húb je podmienený skôr priaznivými podmienkami (obsah organickej hmoty, mikroflóra, vlhkosť) ako výskytom keratinózneho materiálu.

Indický autori (Tambekar, Mendhe et Gulhane, 2007) zisťovali prítomnosť dermatofytov a iných keratinolytických húb v 150 pôdach indického štátu Amravati. Najviac zastúpené boli rody *Microsporum* a *Trichophyton*. *M. gypseum* tvoril až 34 % všetkých izolátov a zároveň vykazoval najvyššiu schopnosť využitia keratínu.

Moallanei et al. (2006) izolovali keratofilné huby vo vzorkách lesných a poľných pôd v provincii Golestan v severnej časti Iránu. V 50 vzorkách bolo identifikovaných 11 rodov a 13 druhov vrátane *M. gypseum*, ktoré bolo v minulosti izolované v takmer všetkých provinciách Iránu.

Ulfig (2000) skúmal vplyv keratinolytických húb v odpadoch a v odpadmi kontaminovaných prostrediach. Dokázal, že početnosť týchto húb sa zvyšuje s množstvom biologického odpadu v prostredí a teda keratinolytické huby možno využiť ako bioindikátory environmentálneho znečistenia. Z dermatofytov sa vo vzorkách nachádzali *T. ajelloi* (10,68 %) a *A. quadrifidum* (10,57 %).

Brigmon et al. (2003) skúmali využitie keratinolytických húb ako indikátorov uhl'ovodíkového znečistenia a bioremedačného progresu v petrolejovej rafinérii.

Poľský autori (Ulfig et al., 2007a) porovnávali výskyt keratinolytických húb vo vrchných vrstvách odpadového kalu. Zistili, že tieto huby rastú predovšetkým v horných vrstvách (s vyšším obsahom kyslíka). Vo vrchnej vrstve hrubej 1 cm sa vyskytoval dvojnásobný počet mikroorganizmov, vrátane *T. ajelloi* a *A. uncinatum*, ako pod ňou. Ďalšie faktory ovplyvňujúce abundanciu boli: obsah dusíka, pomer C:N a proteolytická aktivita.

Vplyv proteolytickej aktivity mikroorganizmov na rast keratinolytických húb skúmali Ulfig et al. (2007b) v ďalšej štúdii. Využili trojvrstvovú metódu na vlasovej návnade (vrstva kalu, vrstva agaru, vlas), pri ktorej zvyšoval množstvo peptónu v agare. Množstvo keratinolytických húb sa zvyšovalo do množstva peptónu 2g/l. Pri vyšších množstvách rast proteolytických baktérií a húb inhiboval rast keratinolytických húb. Pridaním chloramfenikolu a cykloheximidu sa ich rast opäť zvýšil.

V ďalšej práci zisťoval Ulfig (2007), ako vplýva na keratinolytické huby v odpadoch množstvo amoniaku, peptónu, amoniakovej vody a močoviny. Dokázal, že koncentrácia amoniaku je kritickým faktorom rastu týchto húb, nezávisle od jeho zdroja. Vyššie koncentrácie potláčali alebo úplne inhobovali rast *T. terrestre* vrátane jeho teleomorfy *A. quadrifidum* a ďalších keratinolytických húb.

Keratinolytické huby sú považované za potenciálne patogény a sú silne zastúpené v odpadových kaloch. Ulfig (2006) skúmal vplyv vápnenia odpadových kalov na rast keratinolytických a keratinofilných húb. Výskum ukázal, že vápnenie výrazne potláča alebo úplne eliminuje rast týchto mikroorganizmov a to aj u geofilných dermatofytov ako sú *M. gypseum*, *T. terrestre* a *A. quadrifidum*.

Al-Sane et al. (2002) izolovali keratín-rozkladajúce mikroorganizmi z pôd v Kuvajte, pričom študovali produkciu a charakter ich keratináz. Keratinolytické huby

boli izolované z fariem a oblastí, kde sa predávajú alebo skúmajú zvieratá, čo potvrdzuje fakt, že ich výskyt závisí od činnosti ľudí a zvierat.

Sanguinetti et al. (2007) aktivitu bergamotovej silice pri potláčaní rastu klinických izolátov dermatofytov. Z ich výsledkov vyplýva, že výrazne potláča rast týchto húb, a teda je možné využiť ju pri liečbe dermatomykóz.

Tibbett et Carter (2008) sa vo svojej práci zaoberali chemickými a biologickými procesmi prebiehajúcimi v pochovanom ľudskom tele. Dôležitou súčasťou týchto procesov je aj rozklad keratinózneho materiálu, ktorý závisí predovšetkým od pôdneho pH, teploty, vlhkosti a mikrobiologickej aktivity. Autori prisudzujú najväčšiu dôležitosť keratinolytickým hubám (*M. gypseum*), u ktorých bola zaznamenaná lepšia schopnosť využitia keratínu v porovnaní s aktinomycétami.

Pri izolácii keratinolytických húb v pôde sa využívajú predovšetkým kultivačné metódy (metóda vlasovej návnady). Pri identifikácii sa kladie dôraz na vyšetrenie kolónií (pigmentácia, topografia a rýchlosť rastu) a mikroskopická morfológia (veľkosť a tvar makrokonídií, nodulárne orgány). Ďalšie charakteristiky zahŕňajú nutričné požiadavky, teplotnú toleranciu, ureázovú aktivitu a *in vitro* perforáciu vlasov. Pre klinické účely je však táto metóda pomerne pomalá a často nepresná, pretože morfológické a fyziologické charakteristiky sú ovplyvňované vonkajším prostredím. Preto sa mnohí autori snažia vytvoriť nové postupy pre rýchlu a presnú identifikáciu týchto mikroorganizmov.

Faggi et al. (2001) zisťovali využitie PCR fingerprintingu na identifikáciu bežných druhov dermatofytov. Skúmané boli druhy: *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton ajelloi*, *T. mentagrophytes* var. *asteroides*, *T. mentagrophytes* var. *granulosum*, *T. mentagrophytes* var. *laticolor*, *T. mentagrophytes* var. *radians*, *T. interdigitale*, *T. rubrum*, a *Epidermophyton floccosum*. Výskum dokázal, že PCR fingerprinting sa dá využiť na identifikáciu dermatofytov aj v prípade, keď nemôžu byť použité bežné metódy.

Pujol et al. (2002) využili na identifikáciu dermatofytov citlivú kolorimetrickú mikrozriedovaciu platničku, pričom zisťovali citlivosť na antifungálne látky ako sú amfotericín, itrakonazol, flukonazol a ketokonazol. Táto metóda má veľké klinické využitie, pretože sa dá rýchlo a spoľahlivo začať terapia bez znalosti konkrétneho druhu.

Brillowska-Dabrowska et al. (2007) skúmali špecifickú detekciu dermatofytov pri nechťových infekciách. Využili rýchlu dvoj-krokovú DNA extrakciu s následnou mnohonásobnou PCR analýzou. V 118 vzorkách bolo celkovo identifikovaných 13 druhov dermatofytov. Analýza trvala len 5 hodín a mala vyššiu citlivosť ako bežná kultivačná metóda (počet vzoriek s identifikovanými dermatofytmi bol takmer dvojnásobný).

Z výskumov našich a zahraničných autorov vyplýva, že keratinolytické druhy húb, ako sú *T. ajelloi*, *T. terrestre* a *M. gypseum*, sú celosvetovo rozšírené a majú dôležitý ekologický význam pri rozklade keratínových zvyškov, sú zodpovedné za recykláciu uhlíka, dusíka a síry pôvodne viazaných v alfa-keratínoch (Marchisio, 2000). Keratinolytické huby však majú aj epidemiologický význam, pretože keratinolytická aktivita je považovaná za údajný faktor virulencie a všetky pôdne keratinolytické huby sú potenciálne patogény (Rippon, 1988; Marchisio, 2000). Podobne každý pôdny keratinolytický druh môže v priebehu svojho vývoja nadobudnúť či získať schopnosť napádať keratinizované ľudské alebo živočíšne tkanivá, t.j. vyvolávať rôzne druhy tíneí - dermatofytóz. Niektoré z novo-popísaných keratinofilných húb boli izolované z pôdy, a niektoré z nich sa neskôr ukázali ako obligátne alebo potenciálne patogény zvierat a ľudí (Kurup et Smith, 1970). Najagresívnejším patogénom z týchto húb je *M. gypseum*. *T. terrestre* a *T. ajelloi* majú nižšiu patogenitu a ochorenia nimi spôsobené sa vyskytujú len zriedkavo. Preto ich niektorí autori nepovažujú za dermatofyty, ale dermatofytoidy (Summerbell, 2000).

Organické látky živočíšneho pôvodu, t.j. bohaté na keratinózne substráty ako napr. maštal'ný hnoj môžu obsahovať veľké (epidemiologicky významné) množstvá infekčných zárodkov. Rovnako to platí aj pre substráty ako sú napr. vyzreté komposty. Ako je dobre známe, maštal'ný hnoj, komposty ako i splaškové kaly sú často aplikované v poľnohospodárstve (ako hnojivo) alebo pri rekultiváciách v lesníctve a devastovaných územiach. Je preto v ekologickom i v hygienickom záujme sledovať zmeny v spoločenstvách keratinolytických druhov v takto upravovaných oblastiach. Pôda sa tak stáva potenciálnym zdrojom patogénnych mikroorganizmov.

6 Záver

Z celkového počtu 12 sledovaných lokalít (15 vzoriek a 150 subvzoriek), ktoré boli predmetom nášho skúmania boli z rodu *Trichophyton* zachytené a diagnostikované druhy *Trichophyton ajelloi* a *Trichophyton terrestre* a z rodu *Microsporum* bol zachytený a diagnostikovaný druh *Microsporum gypseum*. *T. ajelloi* sa vyskytoval v deviatich lokalitách. *T. terrestre* sa vyskytoval len vo vzorkách odobratých v obci Smolenice (Smolenice – ovce, Smolenice – sliepky a Smolenice B). *Microsporum gypseum* sa nachádzalo v lokalite Nitra areál SPU lamy a v lokalite kompost Hlohovec v dvoch vzorkách. V lokalitách SPU lamy, Malá Fatra a Smolenice B bolo zistené teleomorfné štádium *Arthroderma uncinatum*. *Arthroderma quadrifidum* sa nachádzala len v jednej lokalite a to vo Veľkej Fatre.

Spolu bolo vyizolovaných 5 druhov húb, pričom druh *T. ajelloi* sa vyskytoval najčastejšie. Z celkového počtu 755 izolátov tento druh predstavoval 75,23 %. Druh *M. gypseum* tvoril 11,39 %, *T. terrestre* 10,20 % a *A. quadrifidum* predstavoval 1,72 %. Najmenší počet izolátov (11) sme zaznamenali u teleomorfného štádia *A. uncinatum*, čo predstavuje 1,46 % z celkového počtu izolátov.

Najvyššiu frekvenciu izolácie, a to 27,3 %, dosiahol druh *T. ajelloi* (41 pozitívnych Petriho misiek). Najnižšiu frekvenciu izolácie (1,3 %) sme zaznamenali pri druhu *A. quadrifidum*, ktorý sa nachádzal len na dvoch Petriho miskách.

Celková frekvencia výskytu druhu *Trichophyton ajelloi* na sledovaných lokalitách dosiahla 75 % (deväť pozitívnych lokalít z celkovo dvanástich sledovaných lokalít).

Celková frekvencia výskytu druhu *Trichophyton terrestre* na sledovaných lokalitách dosiahla 25 % (tri pozitívne lokality z celkovo dvanástich sledovaných lokalít).

Celková frekvencia výskytu druhu *Microsporum gypseum* na sledovaných lokalitách dosiahla 25 % (tri pozitívne lokality z celkovo dvanástich sledovaných lokalít).

Celková frekvencia výskytu teleomorfného štádia *Arthroderma uncinatum* na sledovaných lokalitách dosiahla 25 % (tri pozitívne lokality z celkovo dvanástich sledovaných lokalít).

Celková frekvencia výskytu teleomorfného štádia *Arthroderma quadrifidum* na sledovaných lokalitách dosiahla 8,3 % (jedna pozitívna lokalita z celkovo dvanástich sledovaných lokalít).

Schopnosť perforovať vlas *in vitro* sa potvrdila vo všetkých testovaných izolátoch.

Anamorfné štádiá (*T. ajelloi*, *T. terrestre*, *M. gypseum*) boli zaznamenané už v počiatočnej fáze inkubácie, zatiaľ čo teleomorfné štádiá (*A. uncinatum*, *A. quadrifidum*) vykazovali rast až po niekoľkých týždňoch inkubácie. Táto skutočnosť bola pravdepodobne spôsobená znížením obsahu organických látok v substráte, čo malo za následok prechod nepohlavnej fázy do pohlavnej.

Keratinolytické huby môžu mať v budúcnosti veľký význam ako dekompozičný činiteľ substrátov bohatých na organické zvyšky (odpadové vody, čističky odpadových vôd). Problém s rozkladom keratinových štruktúr by sa vyriešil inokuláciou týchto húb, vďaka ich silnej keratinolytickej aktivite s nízkym patogénnym potenciálom. Biotechnologické využitie by sa uplatnilo aj pri rozklade živočíšnych zvyškov v kompostoch.

Samozrejme takéto využitie by muselo prebiehať v kontrolovaných podmienkach, aby nedošlo k premnoženiu rizikových skupín, hlavne dermatofytov.

Keratinolytické huby môžu byť využívané aj ako indikátory kvality pôd s ohľadom na zastúpenie organických látok, pretože sa ukazuje, že majú silnú kompetitívnu aktivitu voči iným keratinolytickým druhom, čím môžu teoreticky z prostredia vytesniť z epidemiologického hľadiska rizikovejšie druhy dermatofytov.

Keďže všetky keratinolytické huby sú považované za potenciálne patogénne, môže táto skupina húb predstavovať určité zdravotné riziko pre ľudí, a tiež priamo alebo nepriamo prostredníctvom zvierat môžu mať tieto huby vplyv na výskyt dermatomykóz ľudí a zvierat.

7 Použitá literatura

AL-SANE, N. A. - MUSALLAM, A. A. - ONIFADE, A. A. 2002. The isolating of keratin degrading microorganisms from Kuwaiti soil: production and characterization of their keratinases. In *Kuwait journal of science*, roč. 29, 2002, č. 2, s. 125-138.

BALDO, A. - TABART, J. - VERMOUT, S. - MATHY, A. - COLLARD, A. - LOSSON, B. - MIGNON, B. 2008. Secreted subtilisins of *Microsporum canis* are involved in adherence of arthroconidia to feline corneocytes. In *Journal of Medical Microbiology*, roč. 57, 2008, s. 1152-1156.

BRIGMON, R. L. - MANKO, T. - PLAZA, G. - TIEN, A. J. - ULFIG, K. - WORSZTYNOWICZ, A. 2003. Keratinolytic Fungi as Indicators of Hydrocarbon Contamination and Bioremediation Progress in a Petroleum Refinery. In *Polish Journal of Environmental Studies*, roč. 12, 2003, č. 2, s. 245-251.

BRILLOWSKA-DABROWSKA, A. - SAUNTE, D. M. - ARENDRUP, M. C. 2007. Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. In *Journal of clinical microbiology*, roč. 45, 2007, č. 4, s. 1200-1204.

BUCHVALD, J. 2006. Onychomykóza-etiotogenéza, klinika a terapia. In *Via practica* roč. 12, 2006, s. 567-569.

BUCHVALD, J. 2008. Tinea capitis u dětí. In *Dermatológia pre prax* roč. 3, 2008, s. 107-110.

CARLILE, M.J. - WATKINSON, S.C. 1996. *The fungi*. London : Academic Press Limited, 1996. 482 s. ISBN 0-12-159960-4.

CHIMELLI, P.A.V. 2003. Dermatophyte agents in the city of Sao Paulo, from 1992 to 2002. In *Scielo Brazil*, roč. 45, 2003, č. 5, s. 88-99.

CHMEL, L. - HASILÍKOVÁ, A. - HRAŠKO, J. 1972. The influence of some Ecological factors on keratinophylic fungi in soil. In *Sabouradia*, roč. 10, 1972, s. 26-34.

CHMEL, L. - VLÁČILÍKOVÁ, A. 1977. Keratinofilné huby v niektorých pôdnych typoch a factory ovplyvňujúce ich zastúpenie. In *Biológia*, roč. 32, 1977, s. 53-59.

CURRAH, R. S. 1985. Taxonomy of the onygenales: Arthrodermataceae, Gymnoasceae, Myxotrichaceae and Onygenaceae. In *Mycotaxon*, roč. 24, 1985, s. 1-216.

DAWSON, C.O. - GENTLES, J.C. 1961. The perfect states of *Keratinomyces ajelloi* Vanbreuseghem, *Trichophyton terrestre* Durie and Frey and *Microsporum nanum* Fuentes. In *Sabouraudia*, roč. 1, 1961, s. 49-57.

DE HOOG, G.S. - GUARRO, J. - GENE, J. - FIGUREAS, M.J.: *Atlas of clinical fungi*. 2. vyd. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. 1126 s. ISBN 90-70351-43-9.

DE VRIES, G.A. 1962. Keratinophilic fungi and their action. In *Antonie van Leeuwenhoek*, roč. 28, 1962, s.121-133.

DESHMUKH, S.K. 2002. Incidence of keratinophilic fungi from selected soils of Kerala state (India). In *Mycopathologia*, roč. 156, 2002, s. 177 -181.

DESHMUKH, S.K. - VEREKAR, S.A. 2006. The occurrence of dermatophytes and other keratinophilic fungi from the soils of Himalach Pradesh (India). In *Czech mycology*, roč. 58, 2006, s. 117 – 124.

DOMSCH, K.H. - GAMS, W. - ANDERSEN, T.H. 1980. *Compendium of soil fungi*. Vol. 1. London : Academic Press, 1980. 859 s. ISBN 0-12-220401-8.

FAGGI, E. - PINI, G. - CAMPISI, E. - BERTELLINI, C. - DIFONZO, E. - MANCIATI, F. 2001. Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes. In *Journal of clinical microbiology*, roč. 39, 2001, č. 9, s. 3382-3385.

FRÁGNER, P. 1984. *Malá lékařská mykologie*. Praha : Avicenum, 1984. 231 s. ISBN 08-069-67.

GRADIŠAR, H. - FRIEDRICH, J. - KRIŽAJ, I. - JERALA, R. 2005. Similarities and Specificities of Fungal Keratinolytic Proteases: Comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. In *Applied and Environmental microbiology*, roč. 71, 2005, č. 7, s. 3420-3426.

GRASER, Y. - DE HOOG, G.S. - KUIJPERS, A. F. A. 2000. Recent advances in the molecular taxonomy of dermatophytes. In *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micologia, 2000, s. 17-21. ISBN 84-607-0711-3.

HOWARD, D.H., 2003. *Pathogenic fungi in humans and animals*. New York: Marcel Dekker, 2003. 790 s. ISBN 0-8247-0638-8

HUBÁLEK, Z., 2000. Keratinophilic fungi associated with free-living mammals and birds. In *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micologia, 2000, s. 93-103. ISBN 84-607-0711-3

KAWASAKI, M. 1992. Phylogenetic relationship of genera *Arthroderma* and *Nannizzia* inferred from mitochondrial DNA analysis. In *Mycopathologia*, roč. 118. 1992, s 95-102.

KIRK, P.M. - CANNON, P.C. - DAVID, J.C. - STALPERS, J.A.: *Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi*. 9. vyd. Kew : CAB International, 2001. ISBN 0-85199-377.

KUNERT, J. 2000. Physiology of keratinophilic fungi. In *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micologia, 2000, s. 77-85. ISBN 84-607-0711-3..

KURUP, P.V. - SCHITT, J.A. 1970. Human – pathogenic fungi in the soils of central Ohio. In *The Ohio Journal of Science*, roč. 70, 1970, č. 5, s. 291 – 295.

MARCHISIO, V. F. 2000. Keratinophilic fungi: Their role in nature and degradation of keratinic substrates. In *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micologia, 2000, s. 86-92. ISBN 84-607-0711-3.

MOOLLAEI, H. - ZAINI, F. - PIHET, M. - MAHMOUDI, M. - HASHEMI, J. 2006. Isolation of keratinophilic fungi from soil samples of forests and farm yards. In *Iranian journal of public health*, roč. 35, 2006, č. 4, s. 62-69.

PAPINI, R. - MANCIANTI, F. - GRASSOTTI, G. - CARDINI, G. 1998. Survey of keratinophilic fungi isolated from city park soil of Pisa, Italy. In *Mycopathologia*, roč. 143, 1998, s. 17- 23.

PUJOL, I. - CAPILLA, J. - FERNANDEZ-TORRES, B. - ORTONEDA, M. - GUARRO, J. 2002. Use of the sensitive colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. In *Journal of clinical microbiology*, roč. 40, 2002, č. 7, s. 2618-2621.

RAJAK, R. C. - SHARMA, R. 2003. Keratinophilic Fungi: Nature's Keratin Degrading Machines! In *Resonance* sept. 2003, s. 28-40.

RIPPON, J.W. 1988. *Medical mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. 3. vyd. Philadelphia : W.B. Saunders, 1988, 745 s.

SANGUINETTI, M. - POSTERARO, B. - ROMANO, L. - BATTAGLIA, F. - LOPIZZO, T. - DE CAROLIS, E. - FADDA E. *In vitro* activity of *Citrus bergamia* (bergamot) oil against clinical isolates of dermatophytes. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, roč. 59, February 2007, s. 305 - 308.

SIMPANYA, M. F. 2000. Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenicity. In *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micologia, 2000, s. 1-12. ISBN 84-607-0711-3.

SIMPANYA, M. F. - BAXTER, M. 1996. Isolation of fungi from soil using the keratin-baiting technique. In *Mycopathologia*, roč. 136, 1996, č. 2, s. 45-49.

STOCKDALE, P.M. 1961. *Nannizzia incurvata* gen nov sp nov a perfect state of *Microsporum gypseum* (Bodin) Guiart et Grigorakis. In *Sabouradia*, roč. 1, 1961, s. 41-48.

SUMMERBELL, R. C. - KANE, J., 1997. The genera *Trichophyton* and *Epidermophyton*. In *Laboratory Handbook of Dermatophytes*. Belmont: Star Publishing, 1997, s.131-190.

SUMMERBELL, R. C. 2000. Form and function in the evolution of dermatophytes. In *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micologia, 2000, s. 30-43. ISBN 84-607-0711-3.

TAMBEKAR, D. H. - MENDHE S. N. - GULHANE S. R. 2007. Incidence of dermatophytes and other keratinolytic fungi in the soil of Amravati (India). In *Trends in applied science research*, roč. 6, 2007, č. 2, s. 545-548.

TAN, C.S. - HOEKSTRA, E.S. - SAMSON, R. A. 1994. *Fungi that cause superficial mycoses*. Centraalbureau voor schimmelcultures Netherlands, Belgium, 1994. ISBN: 90-70351-23-4.

TANAKA, S. 1992. Advances in dermatophytes and dermatophytosis. In *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, roč. 30, 1992, s. 29-39.

TIBBETT, M. - CARTER, D. O. 2008. *Soil analysis in forensic taphonomy*. Boca Raton: CRC Press, 2008, s. 131-139. ISBN-13: 978-1-4200-6991-4

ULFIG, K. 1997. General assesment of the occurrence of keratinolytic fungi in river and marine beach sediments of catalonian waters (Spain). In *Water, air and soil polution*, roč. 94, 1997, s. 275-287.

ULFIG, K. 2000. The occurrence of keratinolytic fungi in waste and waste-contaminated habitats. In *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micologia, 2000, s. 44-50. ISBN 84-607-0711-3.

ULFIG, K. 2003 Studies of Keratinolytic and Keratinophilic Fungi in Sewage Sludge by Means of a Multi-Temperature Hair Baiting Method. In *Polish Journal of Environmental Studies*, roč. 12, 2003, č. 4, s. 461-466.

ULFIG, K. 2006. Sludge liming decreases the growth of keratinolytic and keratinophilic fungi. In *Polish journal of environmental studies*, roč. 15, 2006, č. 2, s. 341-346.

ULFIG, K. 2007. Influence of peptone, ammonia water and urea supplements on keratinolytic and associated non-keratinolytic fungi in sewage sludge. In *International biodeterioration & biodegradation*, roč. 59, 2007, č. 1, s. 62-68.

ULFIG, K. - KORCZ, M. 1995. Isolation of keratinolytic fungi from a coal mine dump. In *Mycopathologia*, roč. 129, 1995, č. 1, s. 83-86.

ULFIG, K. - TERAkowski, M. - PLAZA, G. - KOSAREWITZ, O. 1996. Influence of physico-chemical and biological factors on keratinolytic fungi in sewage sludge. In *Mycopathologia*, roč. 136, 1996, č. 1, s. 41-46.

ULFIG, K. - PLAZA, G. - TERAkowski, M. - MANKO T. 2007. Investigation of keratinolytic and non-keratinolytic fungi grown above or below a 1-cm sewage sludge blanket. In *International biodeterioration & biodegradation*, roč. 59, 2007, č. 2, s. 119-124.

ULFIG, K. - PLAZA, G. - JANDA-ULFIG, K. 2007. The growth of proteolytic microorganisms affects keratinolytic fungi in sewage sludge. In *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, roč. 58, 2007, č. 2, s. 471-479.

VOET, D. - VOET, J.G. 1990. *Biochemie*, Praha: Victoria publishing, 1990. 1325 s. ISBN 80-85605-44-9.

VOLLEKOVÁ, A. 1982. Prvá izolácia *Microsporum Racemosum* Borelli 1965 v Československu. In *Biológia*, roč. 37, 1982, s. 715-723.

VOLLEKOVÁ, A. 1985. Keratinofilné huby v norách hlodavcov a v ich okolí. In *Česká mykologie*, roč. 39, 1985, s. 97-105.

VOLLEKOVÁ, A. 1992. Keratinophilic fungi in four forest soils. In *Biológia*, roč. 47, 1992, s. 477-482

WEITZMAN, I. - SUMMERBELL, R.C. 1995. The Dermatophytes. In *Clinical microbiology reviews*, roč. 8, 1995, č. 2, s. 240-259.

<http://www.chemicaland21.com/lifescience/phar/CYCLOHEXIMIDE.htm>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Chloramphenicol>