

**Badania i Rozwój
Młodych Naukowców w Polsce**

**Nauki przyrodnicze
Tom I Część II**



www.MlodziNaukowcy.com

Redakcja naukowa

dr inż. Jędrzej Nyćkowiak
dr hab. Jacek Leśny

Korekta, skład i łamanie, projekt okładki

dr inż. Jędrzej Nyćkowiak
mgr Marta Nyćkowiak

Wydawca

Młodzi Naukowcy
dr Jędrzej Nyćkowiak
www.mlodzinaukowcy.com
wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com

ISBN (całość) 978-83-942083-1-8

ISBN 978-83-65362-03-2

Ilość znaków w książce:

364tys. (bez ilustracji)

Ilość znaków w książce:

504tys. (bez ilustracji)

Nakład całości 380 egz.

Prace zostały wydrukowane zgodnie z przesłanym tekstem,
na odpowiedzialność ich autorów.

1.	F
2.	V
3.	I
4.	
5.	
6.	
7.	
8.	
9.	
10.	
11.	
12.	
13.	
14.	
15.	
16.	

17. Charakterystyka profilu metabolicznego grzybów termoopornych z rodzaju *Byssochlamys* wyizolowanych z gleby i truskawek

Metabolic profile characterization of heat-resistant fungi of the genus *Byssochlamys* isolated from soil and strawberries

Oszust Karolina⁽¹⁾, Frąc Magdalena⁽¹⁾, Gryta Agata⁽¹⁾, Bilińska-Wielgus Nina⁽¹⁾, Piotrowska Małgorzata⁽²⁾

⁽¹⁾Institut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

⁽²⁾Institut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź

Opiekun naukowy: dr hab. Magdalena Frąc, prof. IA PAN: m.frac@ipan.lublin.pl

Oszust Karolina: koszust@ipan.lublin.pl

Słowa kluczowe: uzdolnienia kataboliczne mikrogrzybów, Biolog® FF Plates

Badania finansowane przez Narodowe Centrum Nauki (Polska), projekt SONATA4: DEC-2012/07/D/NZ9/03357

Streszczenie

Grzyby termooporne, m.in. z rodzaju *Byssochlamys* są czynnikami powodującymi psucie przetworzonych termicznie produktów, zwłaszcza owocowych. Skażenie surowców rolniczych, np. truskawek następuje często w wyniku ich kontaktu z glebą, a zanieczyszczone zarodnikami surowce stanowią potencjalne zagrożenie dla zdrowia konsumentów, ze względu na zdolność wytwarzania toksycznych metabolitów wtórnych.

Celem pracy było porównanie uzdolnień katabolicznych szczepów grzybów z rodzaju *Byssochlamys*, wyizolowanych z gleby i truskawek. Badania obejmowały ocenę zdolności grzybów do wykorzystania 95 różnych substratów węglowych, umieszczonych na mikroplacie Biolog® FF.

„Metabolicznego fingerprintingu” szczepów dokonano na podstawie zmian reakcji kolorymetrycznej związanej z redukcją związków tetrazoliowych w odpowiedzi na proces metabolizowania (utleniania) substratów (absorbancja mierzona przy długości fali 490 nm, w odstępach 24 h, przez 9 dni hodowli). Różnice w profilach metabolicznych poszczególnych szczepów przedstawiono na podstawie wskaźników bioróżnorodności, obejmujących ogólną aktywność metaboliczną szczepów – Average Well Colour Development (AWCD) oraz liczbę zużytych substratów – Richness (R), w poszczególnych godzinach inkubacji. Analiza uzyskanych wyników obejmowała również określenie procentowego wykorzystania poszczególnych grup substratów węglowych oraz pojedynczych źródeł węgla w 168 h inkubacji płytek FF. Podobieństwa i różnice w profilach metabolicznych poszczególnych szczepów zwizualizowano za pomocą analizy skupień (mapa grupowania obiektów i cech) i drzewa podobieństwa (metoda Warda), a określono na podstawie kryteriów Sneatha.

Przeprowadzone analizy wykazały, że badane szczepy z rodzaju *Byssochlamys* charakteryzowały się odmienną aktywnością metaboliczną. Najwyższą aktywnością wykazał się szczep G12/14, a najniższą G13/15 (obydwa izolaty pochodziły z gleby). Największe różnice między szczepami zanotowano w stosunku do wykorzystania amin i amidów. Szczepy G9/14 i G13/14 niemalże nie wykorzystywały tej grupy substratów (<0,3%), a G11/14 wykorzystywał je w bardzo niewielkim stopniu (2,6%) na rzecz aminokwasów (29,58%). Związki z grupy amin i amidów mogą być zatem czynnikami hamującymi wzrost grzybów termoopornych.

1. Wstęp

Termooporne pleśnie, należące do rodzaju *Byssochlamys*, *Neosartorya*, *Talaromyces*, *Hamigera*, *Thermoascus* (Ferreira i in., 2009; Sant'Ana i in. 2009; Dijksterhuis, 2007) uważane

są za surowce przede (np. trawie) eventy grzyby środowie względy przeżywania miękkie termoc Dłatego w środowisku krytycznym ciepłocie

Eurotium szwedzkie mykotermoc Albrec odpow

się na *Paecilomyces* potrzebne sprawnie techniki zagadnień z rodzaju

2. Ma

seryjny z pięć wysiew zestawu

Tab. 1

diagnos

są za czynniki powodujące psucie się przetworów owocowych, mimo termicznej obróbki surowców. Zanieczyszczenie surowców rolnych zarodnikami tej grupy mikrogrzybów następuje przede wszystkim poprzez kontakt z glebą (Houbraken i in. 2008). Owoce zakażone zarodnikami (np. truskawki) mogą stanowić realne zagrożenie dla zdrowia konsumentów, ze względu na ewentualną obecność w tych surowcach toksycznych metabolitów grzybowych. Występowanie grzybów termoopornych w glebie i na owocach zależy jednocześnie od takich czynników środowiskowych jak: temperatura, aktywność wody, pH, potencjał redoks czy stężenie tlenu. Ze względu na odporność grzybów należących do tej grupy na wysoką temperaturę są one w stanie przeżyć proces pasteryzacji (70°C, 10 min), co ma znaczenie w branży przetwórstwa owoców miękkich (Frąc i in. 2015). Jest to o tyle znaczący problem, że kontrola obecności grzybów termoopornych po pasteryzacji jest trudna i nieuzasadniona z ekonomicznego punktu widzenia. Dlatego monitorowanie ich obecności w surowcach, glebie spod uprawy owoców oraz w środowisku produkcyjnym (Hosoya i in. 2012) może przyczynić się do identyfikacji krytycznych punktów kontroli oraz wyeliminowania zagrożenia skażenia przez pleśnie ciepłooporne produktów przetwarzanych termicznie.

Byssochlamys to rodzaj grzyba należący do workowców (klasa: *Eurotiomycetes*, rząd: *Eurotiales*, rodzina: *Trichocomaceae*). Po raz pierwszy rodzaj ten został opisany w 1909, przez szwedzkiego botanika Richarda Westlinga. Gatunki z rodzaju *Byssochlamys* mogą produkować mykotoksyny takie jak patulina oraz kwas byssochlamysowy i kwas mykofenolowy. Termooporność grzybów z rodzaju *Byssochlamys* wynika z ich zdolności do produkcji askospor. Albrecht i in. (2010) wskazują na fakt, że to mannitol występujący w askosporach jest czynnikiem odpowiedzialnym za ich ochronę w stresie temperaturowym.

Najczęściej stosowana dotychczas metoda identyfikacji grzybów termoopornych opiera się na badaniu budowy morfologicznej, ale wysoki stopień podobieństwa do rodzaju *Paecilomyces* jest bardzo problematyczny w szybkiej i prawidłowej identyfikacji. Istnieje więc potrzeba, aby opracować nowe metody identyfikacji grzybów termoopornych, umożliwiające ich sprawne wykrywanie w surowcach i produktach. Z jednej strony mogą to być metody oparte na technikach biologii molekularnej (Frąc i in. 2015), ale z drugiej strony interesującym zagadnieniem jest wykorzystanie technik bazujących na uzdolnieniach grzybów termoopornych z rodzaju *Byssochlamys* do wykorzystania różnych źródeł węgla.

2. Materiał i metody

Szczepy poddane analizie metabolicznej pozyskano z wykorzystaniem metody wysiewu seryjnych rozcieńczeń gleby i truskawek na podłoże selekcyjne. Materiał do izolacji pochodził z pięciu różnych miejscowości zlokalizowanych na Lubelszczyźnie. Dodatkowo przed wysiewem pobrany materiał został poddany szokowi cieplnemu (80°C, 5 min). Dokładne zestawienie miejsca pochodzenia szczepów *Byssochlamys* przedstawiono w Tabeli 1.

Tab. 1 Pochodzenie szczepów *Byssochlamys*.

		*Nr szczepu	Miejsce pochodzenia	Szok cieplny
<i>Byssochlamys</i> sp.	gleba	G9/14	Zezulin	-
		G13/14	Szpica	-
		G12/14	Sieciechów	+
	truskawki	G10/14	Karmanowice	-
		G11/14	Karmanowice	+

(*) wg. rejestru kolekcji LMMiŚ IA PAN.

(-) izolacja z materiału niepoddanemu szokowi cieplnemu

(+) izolacja z materiału poddanemu szokowi cieplnemu

Na podstawie cech makroskopowych i mikroskopowych korzystając z kluczy diagnostycznych (Domsch, 1993; Fassatiouva, 1983; Klich, 1996; Samson, 1996) przeprowadzono

wstępną identyfikację rodzajową izolatów. Prowadzono obserwacje makroskopowe kolonii, zwracając uwagę na zabarwienie i strukturę kolonii, obecność wydzielin, pigmentów oraz widocznych gołym okiem struktur. Przeprowadzono też obserwacje mikroskopowe w preparatach bezpośrednich przy powiększeniu całkowitym mikroskopu 400× (mikroskop Olympus cx 21). Przynależność do rodzaju *Byssochlamys* potwierdzano dodatkowo na podstawie porównania ze szczepami o ustalonej taksonomii *Byssochlamys fulva* (DSM 1808, DSM 62097), zakupionymi z międzynarodowej kolekcji mikroorganizmów DSMZ.

W celu uzyskania czystych kultur przeprowadzono hodowlę wyodrębnionych szczepów na podłożu PDA (Biocorp). Hodowlę prowadzono przez 10 dni w temperaturze 30°C. W celu otrzymania profili metabolicznych poszczególnych szczepów mikrogrzybów, po 10 dniach inkubacji, za pomocą jałowej bawełnianej bagietki pobierano inokulum do probówek zawierających 16 cm³ płynu inokulacyjnego (FF-IF o następującym składzie: 2,5 g Phytigel (Sigma), 0,3 g Tween 40 (Sigma), 1 dm³ wody demineralizowanej). Inokulum dodawano do uzyskania gęstości o 75% przepuszczalności (% T), wykonując pomiary za pomocą turbidymetru (Biolog, USA). Następnie 100 mm³ zawiesiny wprowadzano do każdego z 96 dołków znajdujących się na płytce i inkubowano w 30°C.

Charakterystykę profilu metabolicznego grzybów termoopornych z rodzaju *Byssochlamys* wykonano z wykorzystaniem systemu Biolog przy użyciu płytek FF. Metoda ta opiera się na analizie zmian reakcji kolorymetrycznej związanej z redukcją związków tetrazoliowych w odpowiedzi na proces metabolizowania (utleniania) substratów przez grzyby (Frąc, 2012). Wartość absorbancji mierzono przy długości fali 490 nm, w odstępach 24 h, przez 9 dni hodowli. Płytki FF zawierają 95 substratów, które są w różny sposób wykorzystywane przez poszczególne szczepy grzybów, tworząc unikalny dla danego organizmu wzór metaboliczny (Rice i Currah 2005; Singh 2009).

Różnice w profilach metabolicznych poszczególnych szczepów przedstawiono na podstawie wskaźników bioróżnorodności takich jak średnia absorbancja - Average Well Colour Development (AWCD) oraz Richness (R), w poszczególnych godzinach inkubacji, jak przedstawili Frąc i in. (2012). Średnia absorbancja jest miarą aktywności mikroorganizmów w próbie środowiskowej. $AWCD = \sum A_i/n$, gdzie „A_i” to wartość absorbancji z każdego dołka pomniejszona o wartość „A” próby kontrolnej (dla wody) dla każdej płytki, a „n” to liczba substratów na płytce. Wskaźnik różnorodności R (Richness) obliczono na podstawie liczby uruchomionych substratów węglowych, przyjmując pozytywną odpowiedź mikroorganizmów dla poszczególnych substratów przy A_i > 0,25.

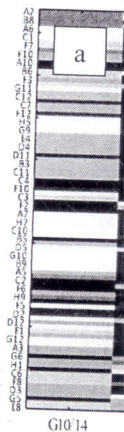
Analiza uzyskanych wyników obejmowała również określenie procentowego wykorzystania poszczególnych grup substratów węglowych oraz pojedynczych źródeł węgla w 168 h inkubacji. Grupowanie substratów, którymi opłaszczono są płytki Biolog FF w poszczególne kategorie, przeprowadzono zgodnie z klasyfikacją zaproponowaną przez Preston-Mafham i in. (2002):

- węglowodany (np. N-acetylo-D-galaktozamina, Sedoheptulozan, D-sorbitol, L-sorboza, Stachioza, Sacharoza, D-tagatoza, D-trehaloza, Ksylitol),
- aminy i amidy (np. D-glukozaamina, Glukuronamid, Alaninamid, 2-aminoetanol),
- aminokwasy (np. Kwas γ-aminomasłowy, L-asparagina, Kwas L-asparaginowy),
- kwasy karboksylowe i ketonowe (np. Kwas D-galakturonowy, Kwas D-glukonowy),
- polimery (np. Tween 80, α-cyklodekstryna, β-cyklodekstryna,),
- pozostałe (np. Amygdalina, Fosforan 1-glukozy, Glicerol, Salicyna, Kwas bromobursztynowy).

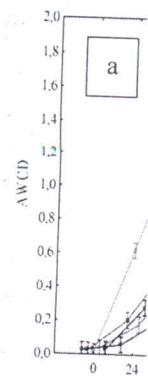
Podobieństwa i różnice w profilach metabolicznych poszczególnych szczepów zwizualizowano za pomocą analizy skupień (mapa grupowania obiektów i cech) i drzewa podobieństwa (metoda Warda), a określono na podstawie kryteriów Sneatha. Analizę skupień przeprowadzono na znormalizowanych danych absorbancji ze średnich wartości z trzech odczytów. Analizy statystyczne przeprowadzono za pomocą programu Statistica (StatSoft v.10, Tulsa, OK, Stany Zjednoczone, 2011).

3. Wynik

Przeanalizowano charakterystyki grupowania źródeł węgla na matrycy szczepami a najniższą



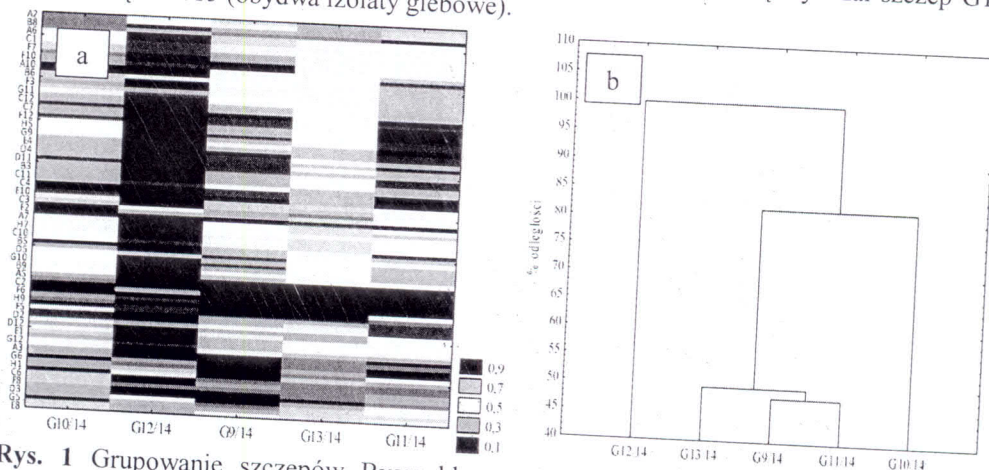
Rys. 1 Grupy poszczególnych substratów; i Największą i szczeru war i wysokim po i t j. G11/14, i wartością AV



Rys. 2 Źródło (AWCD) oraz i Szcz i (G11/14 i G1 i Richness w c

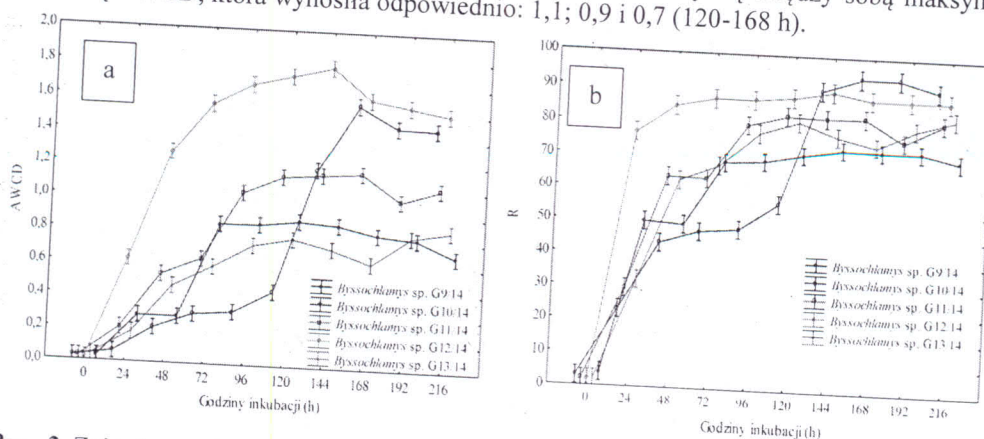
3. Wyniki

Przeprowadzone analizy wykazały, że badane szczepy z rodzaju *Byssochlamys* charakteryzowały się odmienną aktywnością metaboliczną. Na Rys. 1. przedstawiono grupowanie szczepów *Byssochlamys* względem podobieństwa do wykorzystania poszczególnych źródeł węgla zlokalizowanych na płytce FF (po 168 h inkubacji płytki). Wyniki zwizualizowane na matrycy wykorzystania substratów (Rys. 1a), jak i dendrogram podobieństwa między szczepami (Rys 1b) wskazują, że najwyższą aktywność kataboliczną wykazał szczep G12/14, a najniższą G13/15 (obydwa izolaty glebowe).



Rys. 1 Grupowanie szczepów *Byssochlamys* względem podobieństwa do wykorzystania poszczególnych źródeł węglazlokalizowanych na płytce Biolog® FF; a) matrix wykorzystania substratów; b) dendrogram podobieństwa między szczepami.

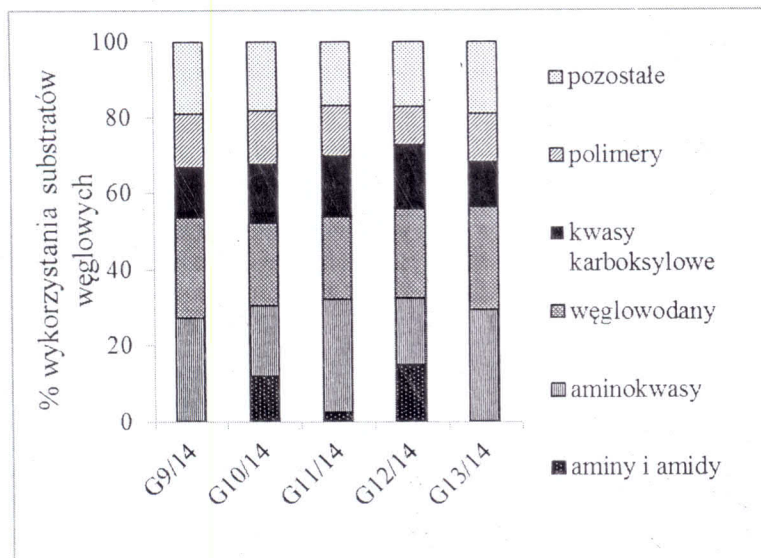
Rys. 2. przedstawia zmiany wskaźników bioróżnorodności a) Average Well Colour Development (AWCD) oraz b) Richness (R), w poszczególnych godzinach inkubacji płytek. Największą średnią absorbancją (AWCD) już w 24 h inkubacji wykazał szczep G12/14. Dla tego szczepu wartość AWCD stopniowo wzrastała do 120 h i utrzymała się w kolejnych dniach na wysokim poziomie 1,6-1,8. Bardzo podobną tendencję zanotowano dla trzech innych szczepów tj. G11/14, G9/14 i G13/14, niemniej jednak wszystkie różniły się między sobą maksymalną wartością AWCD, która wynosiła odpowiednio: 1,1; 0,9 i 0,7 (120-168 h).



Rys. 2 Zróżnicowanie wskaźników bioróżnorodności a) Average Well Colour Development (AWCD) oraz b) Richness (R), w poszczególnych godzinach inkubacji płytki FF.

Szczepy wyizolowane z materiału, który został poddany działaniu wysokiej temperatury (G11/14 i G12/14), wykazały zbliżoną do siebie tendencję zmian wskaźnika bioróżnorodności Richness w czasie inkubacji i przyjmowały najwyższe wartości tego wskaźnika spośród

wszystkich porównywanych szczepów. Największe różnice między szczepami zanotowano w stosunku do wykorzystania amin i amidów (Rys. 3). Szczepy G9/14 i G13/14 niemalże nie wykorzystywały tej grupy substratów (0,3%), a G11/14 wykorzystywał je w bardzo niewielkim stopniu (2,6%) na rzecz aminokwasów (26,58%).



Rys. 3 Procent wykorzystania grup substratów węglowych umieszczonych na płytce Biolog® FF.

4. Dyskusja

Z dokonanego przeglądu literatury wynika, że dotychczas nie podjęto zagadnienia charakterystyki profilu metabolicznego grzybów z rodzaju *Byssoschlamys* z wykorzystaniem systemu Biolog przy użyciu płytek FF. Pojawiają się natomiast doniesienia, w których dokonywana jest ocena podstawowych właściwości katabolicznych mikrogrzybów należących do innych gatunków i wyizolowanych z takich środowisk jak np. gleba czy osady z przemysłu mleczarskiego (Frąc, 2012; Frąc i in. 2014). Metodę „fizjologicznego profilowania” opartą o katabolizm szczepów autorzy zastosowali w ww. pracach do charakterystyki profilu metabolicznego grzybów strzępkowych, które znane są z tego, że charakteryzują się unikalnym szlakiem biochemicznym, w wyniku asymilacji zróżnicowanych prostych i złożonych związków, potrzebnych im do produkcji różnych metabolitów. Biochemiczny profil tych mikroorganizmów często wykorzystywany jest do ich identyfikacji, co więcej, ocena profilu metabolicznego grzybów może być przydatna w określeniu ich uzdolnień do utylizacji i degradacji różnych związków węgla (Singh 2009).

Dotychczas do wykrywania grzybów wykorzystywana jest technika PCR (Polimerase Chain Reaction), gdzie jako marker molekularny stosowany jest gen β -tubuliny (Hosoya i in. 2012), co pozwoliło na filogenetyczną klasyfikację grzybów na poziomie gatunku (Balajee i in. 2009). Metody molekularne w stosunku do konwencjonalnych technik wykrywania obecności grzybów termoopornych w surowcach przetwórstwa owocowego nie są tak czasochłonne. W zależności od zastosowanego typu reakcji PCR można uzyskać jednocześnie ilościową i jakościową ocenę kontaminacji surowców zarodnikami *Byssoschlamys*. Metody molekularne pozwoliły wyjaśnić, że anamorfą (formą rozmnażającą się wyłącznie bezpłciowo) *Byssoschlamys* jest *Paecilomyces*. W ten sposób *P. variotii*, *B. fulva*, *B. nivea*, *B. zollemae* i *B. verrucosa* zostały zakwalifikowane do rodzaju *Byssoschlamys* (Samson, 1974; Samson i Tansey, 1975). Analiza filogenetyczna genów kodujących β -tubulinę i kalmodulinę wykazała, że do rodzaju

*Byssoschl
verrucosa*

zróżnicow
z rodzaju *L*
ich szybki
grzybów te

5. Wnios

W
należących
termoopor
Biolog® z
W
aktywność
węglowyc
(obydwa s
w stosunk
wykorzyst
(2,6%) na
czynniki o
zwalczaniu
katabolicz
uwzględni
fluktuacyjn

6. Literat

Albrecht D
in Aspe
Balajee SA
Fusariu
should
Dijksterhu
Mycol
117.
Domsch K
Fassatiova
Ferreira EI
juice ar
Frąc M (20
na ró
Monog
Frąc M, Gi
Fruit-b
Frąc M, Je
charact
Advanc
Hosoya K,
method
Klich MA

Byssochlamys zalicza się sześć gatunków: *B. fulva*, *B. lagunculariae*, *B. nivea*, *B. zollerniae*, *B. verrucosa* i *B. spectabilis* (Hosoya i in 2012; Nakayama i in. 2010).

Z drugiej strony ciekawym zagadnieniem, a jednocześnie niebadanym do tej pory jest zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe uzdolnień metabolicznych termoopornych szczepów z rodzaju *Byssochlamys* i możliwość wykorzystania uzdolnień katabolicznych tych szczepów do ich szybkiej identyfikacji, jak i poszukiwania związków, które mogłyby ograniczać rozwój grzybów tego rodzaju.

5. Wnioski

W niniejszej pracy podjęto temat podobieństwa metabolicznego izolatów grzybowych należących do rodzaju *Byssochlamys*. Uzdolnienia metaboliczne (kataboliczne) grzybów termoopornych zostały scharakteryzowane na podstawie analiz z wykorzystaniem systemu Biolog® z użyciem płytek FF dedykowanych do badania grzybów strzępkowych.

Wykazano, że szczepy z rodzaju *Byssochlamys* charakteryzowały się odmienną aktywnością metaboliczną, przy czym najwyższą aktywnością w stosunku do substratów węglowych zgromadzonych na płytce FF charakteryzował się szczep G12/14, a najniższą G13/15 (obydwa szczepy wyizolowano z gleby). Największe różnice między szczepami zanotowano w stosunku do wykorzystania amin i amidów. Szczepy G9/14 i G13/14 niemalże nie wykorzystywały tej grupy substratów, a G11/14 wykorzystywał je w bardzo niewielkim stopniu (2,6%) na rzecz aminokwasów (29,58%). Związki z grupy amin i amidów można uznać za czynniki ograniczające wzrost grzybów termoopornych, co może znaleźć zastosowanie w ich zwalczaniu. Zastosowanie konkretnych związków wymaga jednak porównania zdolności katabolicznych większej liczby szczepów, pochodzących z różnych środowisk w celu uwzględnienia różnic fenotypowych związanych ze miejscem bytowania (zmiennoscą fluktuacyjną).

6. Literatura

- Albrecht D, Guthke R, Brakhage AA i in. (2010) Integrative analysis of the heat shock response in *Aspergillus fumigatus*. *BMC Genomics* 11: 1–17.
- Balajee SA, Borman AM, Brandt ME i in. (2009) Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Mucorales* species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? *Journal of Clinical Microbiology* 47: 877–884.
- Dijksterhuis J (2007) Heat-resistant ascospores, In: Dijksterhuis J and Samson RA (Eds.). *Food Mycology. A Multifaceted Approach to Fungi and Food*, CRC Press; Boca Raton, FL, 101–117.
- Domsch KH, Gams W, Anderson TH (1993) *Compendium of soil fungi* IHW Verlag.
- Fassatiowa O (1983) *Grzyby mikroskopowe w mikrobiologii technicznej* WNT.
- Ferreira EHR, Rosenthal A, Calado V I in. (2009) *Byssochlamys nivea* inactivation in pineapple juice and nectar using high pressure cycles. *Journal of Food Engineering* 95: 664–669.
- Frąc M (2012) Ocena mikologiczna osadu z oczyszczalni ścieków mleczarskich oraz jego wpływ na różnorodność funkcjonalną mikroorganizmów glebowych. *Acta Agrophysica Monographiae*.
- Frąc M, Gryta A, Bilińska N i in. (2013) Sequence of Heat-resistant Fungal Strain Isolated from Fruit-based Product. NCBI, GenBank.
- Frąc M, Jezińska-Tys S, Yaguchi T (2015) Occurrence, detection and molecular and metabolic characterization of heat-resistant Fungi in soil and plants and their rise to human health, *Advances in Agronomy* 132: 161–204.
- Hosoya K, Nakayama M, Matsuzawa T i in. (2010) Risk analysis and development of a rapid method for identifying four species of *Byssochlamys*. *Food Control* 26: 169–173.
- Klich MA (1996) *Identification of common Aspergillus species*. CBS.

- Nakayama M, Hosoya K, Matsuzawa T i in. (2010) A rapid method for identifying *Byssoschlamys* and *Hamigera*, *Journal of Food Production* 73: 1486–1492.
- Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson PF (2002) Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilization profiles – a critique. *FEMS Microbiology Ecology* 42: 1-14.
- Rice AV, Currah RS (2005) Profiles from Biolog FF plates and morphological characteristics support the recognition of *Oidiodendron fomicola* sp. *Studies in Mycology* 53: 75-82.
- Sant'Ana AS, Rosenthal A and Massaguer PR (2009) Heat resistance and the effects of continuous pasteurization on the inactivation of *Byssoschlamys fulva* ascospores in clarified apple juice. *Journal of Applied Microbiology* 107: 197–209.
- Samson RA, Houbraken J, Varga J I in. (2009) Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssoschlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. *Persoonia* 22: 14–27.
- Samson RA (1974) *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Studies in Mycology* 6:1–119.
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC i in. (1996) Introduction to food-borne fungi. CBS Baarn. The Netherlands.
- Samson RA, Hong S, Peterson SW i in. (2007) Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Studies in Mycology* 59: 147–203.
- Frąc M, Oszust K, Lipiec J i in. (2014) Soil microbial functional and fungal diversity as influenced by municipal sewage sludge accumulation. *International Journal of Environmental Resources and Public Health* 11(9): 8891–8908.