

ПОТЕНЦИЈАЛНА УЛОГА ГЉИВЕ *ALTERNARIA TENUIS* У БИОРЕМЕДИЈАЦИЈИ ЕКОСИСТЕМА КОНТАМИНИРАНИХ ЕТОКСИЛОВАНИМ АЛКОХОЛОМ

Виолета Јаковљевић¹, Мирослав Врвић²

¹Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, Радоја Домановића 12, 34 000 Крагујевац, Србија

²Хемијски факултет, Универзитет у Београду, Студентски трг 12–16, 11 000 Београд, Србија

Abstract

JAKOVLJEVIĆ Violeta, M. VRVIĆ: THE POTENTIAL ROLE OF *ALTERNARIA TENUIS* IN BIOREMEDIATION OF ECOSYSTEMS CONTAMINATED WITH ETHOXYLATED ALCOHOL [¹Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovica 12, 34 000 Kragujevac, Serbia; ²Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 12-16, 11 000 Belgrade, Serbia]

Ethoxylated oleyl-cetyl alcohol (EOCA) is a nonionic surfactant, which has application in various industries (detergents, paper, oil, agriculture, pharmaceuticals). The increase in industrial production and consumption of these substances makes them one of the leading groups of environmental pollutants. From the environmental perspective, it is important to identify microorganisms that are tolerant to the presence of pollutants. Therefore, this study was designed with the aim to investigate the effect of EOCA (Henkel, Merima, Kruševac) on the growth and metabolic activity of *Alternaria tenuis* Nees. The fungus was isolated from sewage wastewater flowing into the riverbed Lepenica (Kragujevac, Serbia). The fungus was grown in liquid Czapek-Dox medium without and with the addition of pollutant in concentration of 0.1%, for 8 days. Changes in chemical and biochemical parameters: pH, the amount of free organic acids, proteins and monosaccharides (glucose and fructose), proteolytic activity and biomass dry weight were observed during the exponential growth phase (4th to 8th day). The pollutant was influence on increase in pH value of medium and amounts of free organic acids and proteins. The proteolytic activity of the fungus was inhibited (about 50%) by presence of the pollutant. Significant differences in metabolism of monosaccharides between media were observed in an initial growth phase (on 4th day). In medium with AOC, glucose metabolism was more intense compared to fructose, whereas there was expressed a contrary effect in control medium. The biomass dry weight production was inhibited by pollutant (about 65.4%). The obtained results indicate on potential application of fungus in bioremediation.

Key words: *Alternaria tenuis*, biomass, glucose, ethoxylated oleyl-cetyl alcohol, organic acids, pH, proteolytic activity, fructose

Сажетак

Етоксилувани олеил-цетил алкохол (ЕОЦА) је нејонска површинска активна супстанца, која има примену у разним индустријским производним процесима (детерџенти, папир, уља, пољопривреда, фармација). Пораст идустријске производње и потрошње ових супстанци сврстава их у групу водећих загађивача животне средине. Са аспекта заштите животне средине и могуће

примене микроорганизама у биоремедијацији, важно је идентификовати врсте које су толерантне на присуство полутаната. Стога, ово истраживање конципирано је са циљем да се испита дејство ЕОЦА (Henkel, Merima, Крушевац) на раст и метаболичку активност гљиве *Alternaria tenuis* Nees. Гљива је изолована из канализационих отпадних вода из домаћинства, на месту њиховог уливања у речно корито Лепенице (Крагујевац, Србија). Гљива је гајена у течной Czapek-Dox подлози без (контрола – К) и са додатком полутанта у концентрацији 0,1%, у времену од осам дана. Промене хемијских и биохемијских параметара: рН, количина слободних органских киселина, протеолитичка активност, количина протеина, глукозе и фруктозе, и укупна сува биомаса, праћене су у периоду раста гљиве од четвртог до осмог дана. Етоксилувани олеил-цетил алкохол деловао је на повећање рН вредности подлоге, количине излучених слободних органских киселина и протеина. Протеолитичка активност гљиве била је инхибирана (око 50%) дејством поменутог полутанта. Значајне разлике у метаболизму моносахарида између подлога уочене су у почетној фази раста гљиве. У подлози са ЕОЦА, метаболизам глукозе био је интензивнији у односу на фруктозу, а у контроли је забележен супротан ефекат. Продукција укупне суве биомасе гљиве била је инхибирана полутантом (око 65,4%). Добијени резултати указују на могућу примену гљиве у биоремедијацији водених екосистема контаминираних етоксилуваним алкохолима.

Кључне речи: *Alternaria tenuis*, биомаса, глукоза, етоксилувани олеил-цетил алкохол, органске киселине, рН, протеолитичка активност, фруктоза

УВОД

Етоксилувани олеил-цетил алкохол (ЕОЦА) је сурфактант из групе масних алколних етоксилата који чине економски најзначајнију групу нејонских сурфактаната (Fuchs и Mylonakis, 2009). Имају широку примену у детерџентима за домаћинства и комерцијалним детерџентима, средствима за чишћење и одржавање личне хигијене. Употребљавају се као средства за квашење и прање у козметичкој, пољопривредној, папирној, уљној и др. секторима индустријске прераде. Повољне карактеристике етоксилуваних алкохола као што су брза деградација, ниска до умерена пенушавост, толеранција на тврдоћу воде и способност чишћења у хладној води, разлог су константног повећања обима производње ових нејонских сурфактаната у свету, а нарочито у Европи, у последњих 20 година (Smits и сар., 2001). Са друге стране, нагли раст производње етоксилуваних алкохола указује на могућност повећања количине овог полутанта у воденим екосистемима, у концентрацијама изнад очекиваних. Након употребе, остаци сурфактаната и њихови деградациони продукти доспевају до постројења за прераду отпадних вода или директно на површину вода и седимената (Odds и сар., 2004). Експериментални резултати бројних биодеградационих студија добијени у лабораторијским условима потврдили су висок степен примарне и потпуне биодеградиције ових сурфактаната у животној средини (Estruch, 2000). Алкохолни етоксилати разграђују се биолошким третманом у постројењу за прераду отпадних вода у високом проценту (95–99%) (Ali и Wainwright, 1994; Jeon и Madsen, 2012). Концентрација укупних етоксилата у ефлуентима креће се у интервалу 1,0–23 $\mu\text{g/l}$ у Европи, Канади и Америци (Juhász и Naidu, 2000; Rabinovich и сар., 2004). Од средине седамдесетих до данас, спроведено је неколико студија процене ризика алкохолних етоксилата по животну средину (Shaw, 1993; Ying, 2006; HERA, 2009). Токсичност за акватичне организме, мерена као EC50, варира од веома токсичне (<1 mg/l) до опасне (између 10 и 100 mg/l).

Истовремено, студије повезане са разумевањем механизма биодеградиције алкохолних етоксилата у присуству комплексних микробиолошких заједница, спроведене су употребом различитих метода.

Биоремедијација је примена биодеградиције у циљу смањења концентрације полутаната у животној средини (Morrall и сар., 2006). Последње две деценије, бактерије су биле у фокусу биоремедијационих студија, док су гљиве мање проучене. Микоремедијација је иновативна биотехнологија која користи живе гљиве (мицелијуме) за чишћење контаминираних локација уз безбедно руковање отпадом применом метода *in situ* и *ex situ* (Eadsforth и сар., 2006). Филаментозне гљиве имају способност да расту на широком спектру супстрата излучивањем екстрацелуларних хидролитичких ензима. Штавише, услед широке супстратне специфичности њихове деградативне ензимске машинерије, гљиве могу да разграђују широк спектар органских и ксенобиотичких полутаната као што су петролејски угљоводоници, хлорофеноли, полициклични ароматични угљоводоници, пестициди, итд (Goyer, 1981; Talmadge, 1994). Ове особине гљива користе се у разне комерцијалне сврхе; у прехранбеној индустрији, за производњу корисних метаболита (антибиотици, алкалоиди, етанол, ензими, органске киселине) и у различитим биолошким процесима (биолошка контрола, биоизбелјивање, биоремедијација, третман отпада).

Претходна истраживања потврдила су да неке филаментозне гљиве (*Aspergillus niger*, *Trichotecium roseum*, *Fusarium oxysporum*, итд.) могу да расту и да метаболишу ЕОЦА у широком опсегу концентрација 0,01–1,0%. Стога је ово истраживање конципирано са циљем да се испита утицај поменутог полутанта у концентрацији 0,1% на метаболичку активност гљиве *Alternaria tenuis* као и њена толеранција на полутант. Добијени резултати могу да буду корисни са аспекта практичне примене гљиве у биоремедијацији и биотехнологији.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Моноспорна култура гљиве *Alternaria tenuis* Nees изолована је из отпадних вода пореклом из домаћинстава које се уливају у речно корито Лепенице (Крагујевац, Србија). Детерминација гљиве обављена је на Биолошком факултету у Београду, на основу морфолошких и анатомских карактеристика и помоћу систематског кључа (Nees, 1817). Гљиве су одржаване пресејавањем једном месечно на кромпир-декстрозном агару, у стерилним условима, и чуване у фрижидеру на 4°C.

Суспензија спора гљиве познате густине (1×10^6 спора/ml), добијена помоћу хемоцитометра за бројање еритроцита, унета је у течну хранљиву подлогу по Czapek-у следећег састава (g/l): NaNO_3 –3; K_2HPO_4 –1; MgSO_4 –1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ –0,25; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ –0,01; сахароза–30; детсирована вода до 1000 ml (контрола-К). У Czapek-ову подлогу идентичног састава додат је етоксилвани олеил-цетил алкохол у концентрацији 0,1% (ЕОЦА подлога). У експерименту су коришћене Ерленмајер боце од 250 ml са 200 ml хранљиве подлоге, које су пре инокулације стерилисане у аутоклаву и охлађене. Инокулисане Ерленмајер боце постављене су на електричну мућкалицу Кинетор-м подешену на 250 обртаја у минути, тако да је обезбеђено стално, једнообразно мућкање

(аерација гљиве). Огледи су изведени на собној температури у условима алтернативне светлости (дан/ноћ) (Стојановић и сар., 2010) у временском периоду од осам дана.

Метаболичка активност гљиве тј. промене хемијских и биохемијских параметара: рН, количина слободних органских киселина, протеолитичка активност, количина протеина, глукозе и фруктозе, и укупна сува биомаса, праћене су у периоду раста гљиве, од четвртог до осмог дана.

За мерење рН вредности хранљивих подлога коришћен је рН-метар типа МА-5705 („Искра“, Крањ).

Протеолитичка активност ферментационе течности одређена је методом по Ансону (Anson, 1938) са супстратом казеином. Реакциона смеша је инкубирана на 37°C у трајању од 10 мин., а затим је реакција прекинута додавањем 1 ml 5% трихлорсирћетне киселине. Након филтрирања смеше кроз филтер-папир Whatman No. 1, супернатанту је додато 5 ml 6% Na₂CO₃ и 1 ml раствореног Folin-Ciocalteu реагенса. Смеша је инкубирана на собној температури 30 мин. До појаве плаво обојеног раствора. Апсорбанца је измерена спектрофотометријски на 660 nm и упоређена са стандардом – тирозином. Протеолитичка активност ферментационе течности изражена је јединицом ензимске активности (IU), до које се долази по следећем обрасцу:

$$IU/ml = ((\mu\text{mol Tyr}) \times (11)) / (1 \times 10 \times 2)$$

11 – укупна запремина узорка (у милилитрима)

1 – запремина ензима (у милилитрима)

10 – време инкубације (у минутима)

2 – запремина узорка коришћеног у спектрофотометрији (у милилитрима)

Слободне органске киселине одређене су методом јоноизмењивачке хроматографије (Bulen и сар., 1952) на следећи начин: у 10 ml ферментационе течности додато је 50 ml 70% етанола и реакциона смеша инкубирана је у воденом купатилу на 70°C/1 h. Филтрат, добијен филтрирањем реакционе смеше кроз филтер-папир Whatman No. 1, концентрован је на 50–60° C до запремине од 40 ml. Екстракту је додат активни угаљ и инкубиран је на 70° C у воденом купатилу око 30 мин. Активни угаљ уклоњен је филтрирањем екстракта, а волуметријски суд допуњен је дестилованом водом до 100 ml. Да би се израчунала концентрација слободних органских киселина у екстракту, вршена је титрација 10 ml екстракта са 0,1 M NaOH, у присуству 0,1% фенолфталеина као индикатора. Резултати су приказани у процентима (%).

Количина моносахарида (глукоза и фруктоза) одређена је методом силазне папирне хроматографије, након пропуштања 225 ml филтрата кроз претходно активiranу ањонску колону (Amberlite IR-120) и упаравања филтрата до запремине 5–10 ml. Микролитарска количина узорка нанета је на припремљене хроматографске траке Whatman No. 1. Након сушења траке су уроњене у систем солвента. Количина глукозе и фруктозе добијена је спектрофотометријски, мерењем апсорбанце на 600 nm, након реакције моносахарида са одговарајућим реагенсом и стварања плавозеленог комплекса (Stojanović и сар., 2011a).

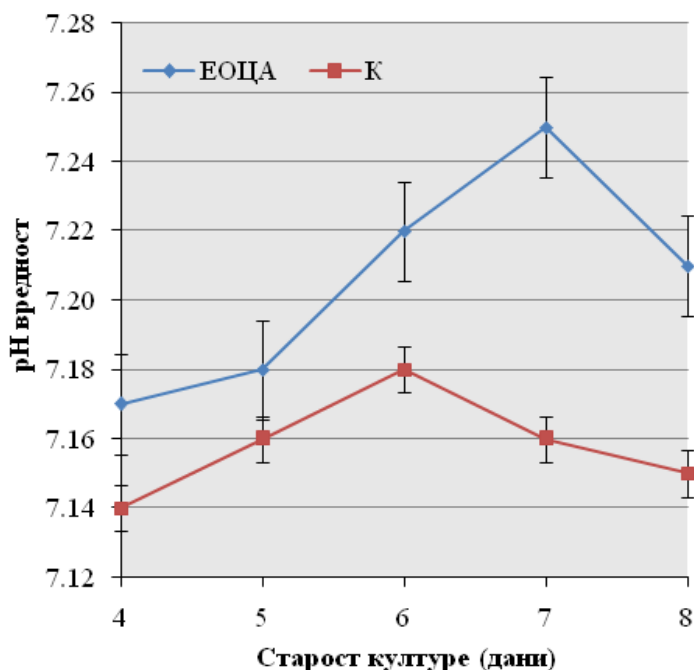
Количина протеина одређена је методом по Kjeldahl-у, на основу количине азота присутног у гљиви (Stojanović и сар., 2011a) применом следеће формуле:

Количина протеина (mg/ml) = 6.25 x количина азота (mg/ml)

Количина суве биомасе мицелијума *A. tenuis* добијана је на основу разлике у маси претходно измерене суве филтер-хартије и укупне масе филтер-хартије заједно са мицелијом гљиве. Количина суве биомасе изражена је у грамима по литру ферментационе течности (g/l).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

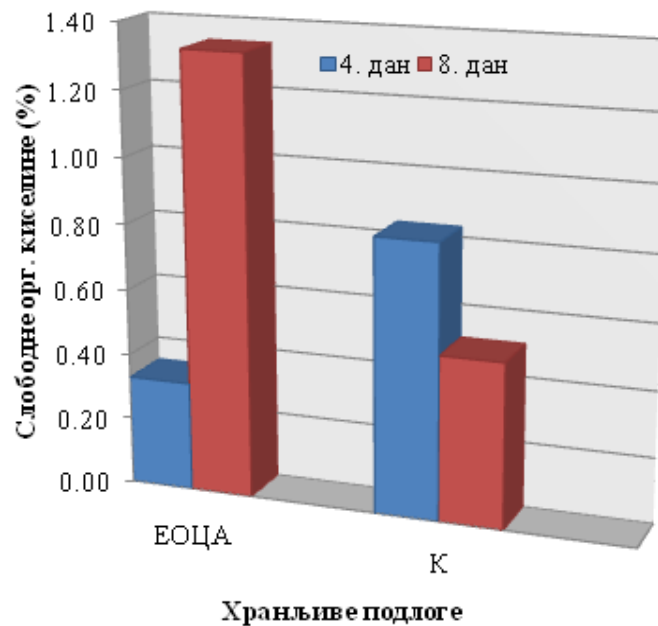
Присуство 0.1% ЕОЦА у хранљивој подлози *A. tenuis* утицало је на повећање иницијалне рН вредности у односу на контролу (Слика 1). Промене рН вредности настају као резултат искоришћавања хранљивих материја у подлози током раста гљиве, и излучивања киселих и алкалних метаболита. У контролној подлози, рН вредност повећавала се од четвртог до шестог дана, услед интензивног метаболизма и раста гљиве, а након тога забележен је пад рН вредности. У подлози са ЕОЦА, рН вредност повећавала се до седмог дана, затим је нагло опала. Најмање промене забележене су у периоду од четвртог до петог дана, што се може објаснити периодом адаптације гљиве на присуство полутанта. Најинтензивније промене забележене су у периоду од петог до седмог дана и указују на интензивнији раст гљиве у наведеном периоду. Током огледног периода, у К подлози рН се кретала у неутралном интервалу, док је у подлози са ЕОЦА рН варирала од неутралне ка благо алкалној средини. Резултати Eshel и сар. (2002) показали су да гљива има способност повећавања рН инфицираног воћа и поврћа акумулацијом амонијака.



Слика 1. Промене рН вредности хранљивих подлога у периоду од четвртог до осмог дана

Количина слободних органских киселина коју је гљива излучила у хранљивим подлогама на почетку и на крају огледног периода приказана је на Слици 2. Добијени резултати јасно показују да је гљива у раној фази развића (четвртог дана) излучила око 3 пута већу количину слободних органских киселина у К подлози у односу на подлогу са ЕОЦА. У контролној подлози са сахарозом као јединим извором угљеника, метаболизам

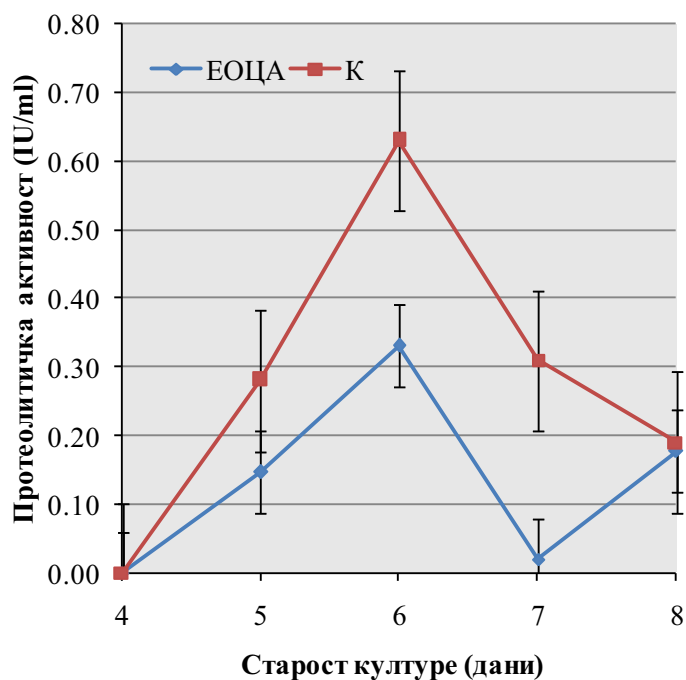
се одвијао несметано, услед чега је и продукција органских киселина интензивна. Присуство ЕОЦА у подлози вероватно је имало утицаја на спорији метаболизам сахарозе и њених деривата (глукозе и фруктозе), па је и продукција органских киселина била мања. Супротан ефекат забележен је на крају огледног периода (осмог дана), када је количина излучених органских киселина у подлози са ЕОЦА била 2,5 пута већа у односу на контролу. У каснијем периоду развића гљиве продукција органских киселина у К подлози опала је услед потрошње угљених хидрата, али је у подлози са ЕОЦА продукција органских киселина повећана услед споријег раста гљиве. Добијени резултати у сагласности су са резултатима добијеним у идентичним истраживањима са гљивама *Penicillium verrucosum* (Стојановић и сар., 2010; 2011б) и *Fusarium oxysporum* (Јаковљевић и сар., 2014).



Слика 2. Количина слободних органских киселина измерена у хранљивим подлогама у раној (четврти дан) и касној (осми дан) фази развића

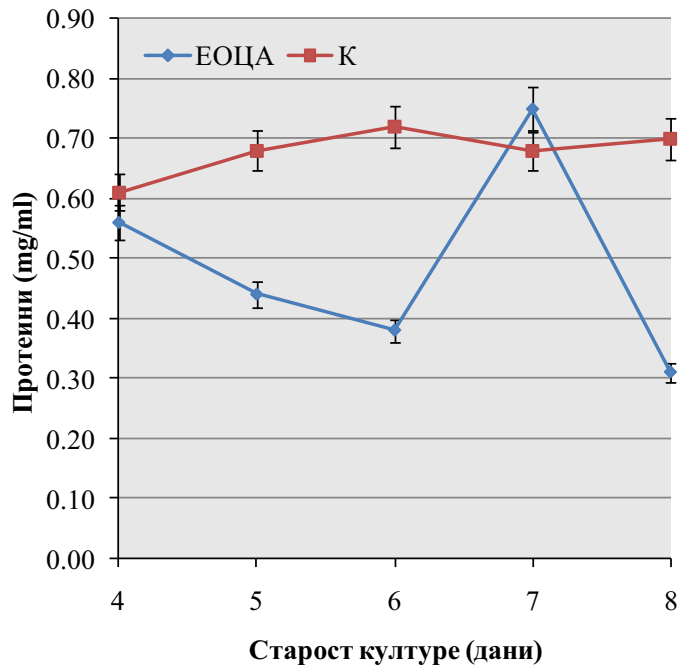
Протеолитичка активност *A. tenuis* у периоду од четвртог до осмог дана имала је веома сличну динамику у обе хранљиве подлоге (Слика 3). Ензимска активност била је потпуно инхибирана четвртог дана у обе подлоге, а затим се нагло повећавала до шестог дана, када су измерени максимуми ензимске активности. Инхибиција ензимске активности у раној фази развића гљиве може се објаснити концентрацијом угљених хидрата у подлози. Смањивањем концентрације угљених хидрата повећавала се протеолитичка активност у подлогама. Максимум ензимске активности (0,62 IU/ml) у К подлози био је двоструко виши у односу на измерени максимум (0,32 IU/ml) у подлози са ЕОЦА. Изражено у процентима, ЕОЦА инхибирао је око 50% ензимске активности. Након шестог дана, ензимска активност опадала је до краја огледног периода у контроли, док је у подлози са ЕОЦА након наглог пада (од шестог до седмог дана) поново била у порасту (од седмог до осмог дана). У литератури се могу наћи различити подаци везани за утицај ЕОЦА на протеолитичку активност гљива. ЕОЦА у концентрацији 0,1% испољио

је стимулативно дејство на протеолитичку активност *F. oxysporum* (Јаковљевић и сар., 2014).



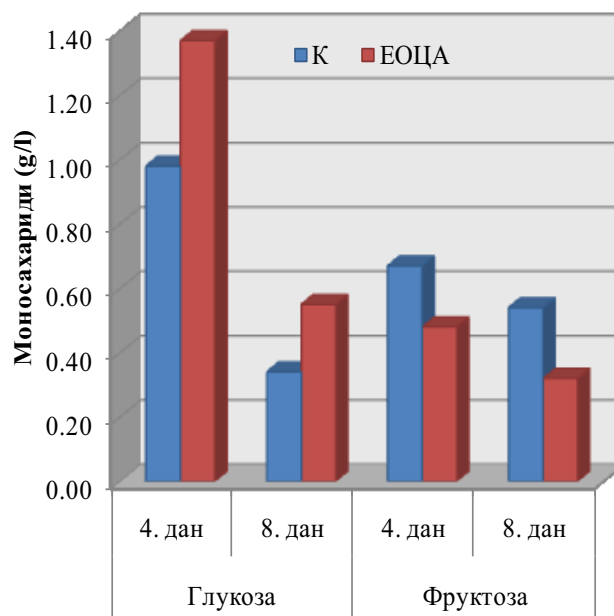
Слика 3. Протеолитичка активност *A. tenuis* у периоду од четвртог до осмог дана

Количина протеина коју је гљива *A. tenuis* продуковала у хранљивим подлогама у периоду од четвртог до осмог дана приказана је на Слици 4. У К подлози количина протеина повећавала се упоредо са растом гљиве од четвртог до шестог дана, док је супротан ефекат забележен у подлози са ЕОЦА. У каснијој фази развића, од шестог до осмог дана, количина протеина незнатно се смањила у контроли. ЕОЦА је инхибирао продукцију протеина у највећем периоду развоја гљиве, изузев у периоду од шестог до седмог дана, када је измерена већа количина протеина у односу на контролу. Ови резултати могу се протумачити смањењем концентрације азота из подлоге која је у корелацији са растом гљиве и продукцијом органских киселина (Scervino и сар., 2011). Подаци из литературе (Стојановић и сар., 2010; 2011б) показују да код већине испитаних гљива, ЕОЦА утиче на знатно смањење количине протеина у периоду од четвртог до осмог дана. Међутим, код гљиве *F. oxysporum* (Јаковљевић и сар., 2014), сагласно са резултатима добијеним у овој студији, ЕОЦА је утицао на продукцију веће количине протеина. Очигледно је да и у случају продукције протеина, морфолошко-физиолошке разлике између гљива имају велики значај.



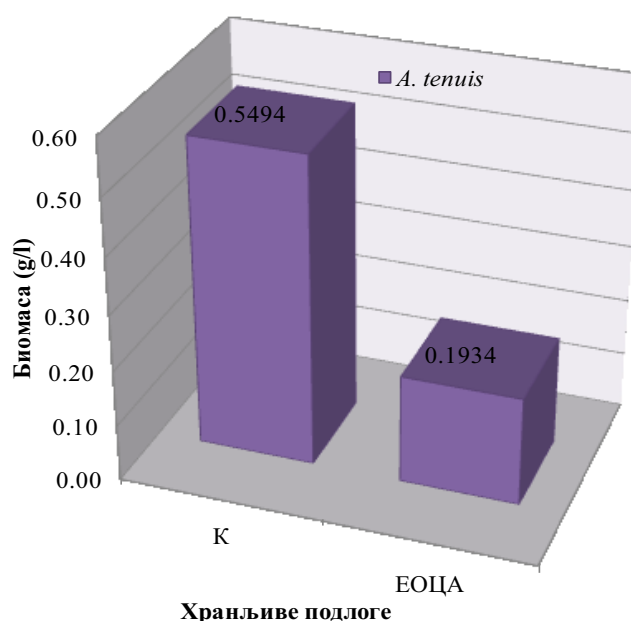
Слика 4. Количина протеина *A. tenuis* у хранљивим подлогама у периоду од четвртог до осмог дана

Количина моносахарида (глукозе и фруктозе) у хранљивим подлогама мерена је четвртог и осмог дана огледа, а добијени резултати приказани су на Слици 5. У обе хранљиве подлоге, четвртог дана, измерена је већа количина глукозе него фруктозе, из чега се може закључити да је у раном периоду развоја гљива за свој метаболизам користила већу количину фруктозе него глукозе. У наведеном периоду, у подлози са ЕОЦА, измерена је већа количина глукозе, али мања количина фруктозе у односу на контролу. Старењем гљиве (осмог дана) дошло је до драстичног смањења количине глукозе, али веома благог смањења фруктозе у обе подлоге. Ови резултати указују да је у каснијим фазама развоја гљиве метаболизам глукозе био интензивнији него метаболизам фруктозе. У литератури се може наћи само једна студија у којој је испитиван утицај ЕОЦА на количину глукозе и фруктозе у подлози инокулисаног гљивом *F. oxysporum* (Јаковљевић и сар., 2014), али су резултати супротни резултатима добијеним у овом раду.



Слика 5. Количина моносахарида (глукозе и фруктозе) у хранљивим подлогама у раној (четврти дан) и касној (осми дан) фази развића

Количина суве биомасе мицелије у хранљивим подлогама, измерена на крају огледног периода (осмог дана), представљена је на Слици 6. На основу приказаних резултата јасно се може видети да је биомаса *A. tenuis* измерена у контролној подлози била око 3 пута већа у односу на биомасу измерену у подлози са 0,1% ЕОЦА. Дакле, укупна сува биомаса гљиве била је инхибирана полутантом око 65,4%. Инхибиција биомасе у присуству полутанта може да се објасни периодом адаптације и успореним растом гљиве. Инхибиција биомасе дејством поменутог полутанта такође је потврђена и у случају других гљива, али је проценат инхибиције различит, у зависности од врсте гљива и њихових морфофизиолошких карактеристика (Стојановић и сар., 2011а; Јаковљевић и сар., 2014).



Слика 6. Количина суве биомасе гљиве у хранљивим подлогама осмог дана

ЗАКЉУЧАК

ЕОЦА 0,1% концентрације није имао фунгицидно дејство; гљива је расла и развијала се, али је због периода адаптације укупна биомаса била смањена у односу на контролу. Тестирани полутант деловао је на повећање рН вредности подлоге, количине излучених слободних органских киселина и протеина. Протеолитичка активност гљиве задржала је око 50% активности у присуству поменутог полутанта. ЕОЦА је утицао на метаболизам моносахарида, у правцу интензивнијег метаболизма глукозе у односу на фруктозу. Добијени резултати указују на могућу примену гљиве *A. tenuis* у биоремедијацији екосистема контаминираних ЕОЦА, али такође и у индустрији детерџената и прехранбеној индустрији.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ali, T.A., A.M. Wainwright : Growth of *Phanerochaete chrysosporium* in soil and its ability to degrade the fungicide benomyl. *Biores.Technol.*, 49 (3): 197–201, 1994.
2. Anson, M.L. : The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 22 (1): 79–89, 1938.
3. Bulen, W.A., J.E. Varner, R.C. Burrell : Separation of Organic Acids from Plant Tissues, *Anal. Chem.*, 24 (1): 187–190, 1952.
4. Eadsforth, C.V., A.J. Sherren, M.A. Selby, R. Toy, W.S. Eckhoff, D.C. McAvoy, E. Matthijs: Monitoring of environmental fingerprints of alcohol ethoxylates in Europe and Canada. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 64 (1): 14–29, 2006.
5. Eshel, D., I. Miyara, T. Ailing, A. Dinoor D. Prusky: pH Regulates Endoglucanase Expression and Virulence of *Alternaria 64lternate* in Persimmon Fruit. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15 (8): 774–779, 2002.
6. Estruch, F. : Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev.*, 24 (4): 469–86, 2000.
7. Fuchs, B.B., E. Mylonakis: Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. *Eukaryot. Cell*, 8 (11): 1616–25, 2009.
8. Goyer, M.M., J.H. Perwak, A, Sivak, P.S. Thayer: Human safety and environmental aspects of major surfactants (supplement). Report to the Soap and Detergent Association, 1981.
9. Human and Environmental Risk Assessments (HERA): Alcohol ethoxylates (AE) human and environmental risk assessment. <http://www.heraproject.com>. 2009.
10. Jakovljević, V.D., J.M. Milićević, J.D. Stojanović, S.R. Solujić, M.M. Vrvic: Influence of detergent and its components on metabolism of *Fusarium oxysporum* in submerged fermentation. *Hem. Ind.*, 68 (4): 465–474, 2014.
11. Jeon, C.O., E.L. Madsen: In situ microbial metabolism of aromatic-hydrocarbon environmental pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 24 (1): 1–8, 2012.
12. Juhasz, A.L., R. Naidu: Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int. Biodeter. Biodegrad.*, 45 (1): 57–88, 2000.

13. Morrall, S.W., W.S. Eckhoff, A. Evans, M.L. Cano, J.C. Dunphy, D.C. McAvoy: Removal of alcohol ethoxylates and environmental exposure determination in the United States. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 64 (1): 3–13, 2006.
14. Nees Von Esenbeck, C.G. : **Das System DER Pilze and Schwamme and Atlas**, Wurzburg 2: 329, 1817.
15. Odds, F.C., A.J. Brown, N.A. Gow: *Candida albicans* genome sequence: A platform for genomics in the absence of genetics. *Genome Biol.*, 5 (7): 230, 2004.
16. Rabinovich, M.L., A.V. Bolobova, L.G. Vasilchenko: Decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics by fungi. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 40 (1): 5–23, 2004.
17. Scervino, J.M., V.L. Papinutti, M.S. Godoy, M.A. Rodriguez, I. Della Monica, M.J. Pettinari, A.M. Godeas: Medium pH, carbon and nitrogen concentrations modulate the phosphate solubilization efficiency of *Penicillium purpurogenum* through organic acid production. *J. Appl. Microbiol.*, 110 (5): 1215–1223, 2011.
18. Shaw, A.H. : Surfactants update. *Soap Cosmet. Chem. Spec.* 69: 24-32, 1993.
19. Smits, G.J., H. van den Ende, F.M. Klis: Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology*, 147 (4): 781–794, 2001.
20. Stojanović, J., V. Jakovljević, I. Matović, O. Gajović, Z. Mijušković, T. Nedeljković: The influence of detergents, sodium tripoly-phosphates and ethoxylated oleyl-cetyl alcohol on metabolism of the fungi *Penicillium verrucosum* Peyronel. *Acta Vet- Beograd*, vol 60, (1): 67–77, 2010.
21. Stojanović, J., V. Jakovljević, I. Matović, O. Gajović, Z. Mijušković, T. Nedeljković: Influence of detergent on metabolic activity of fungi *Aspergillus niger*. *Natural Science*, 3 (6): 466–470, 2011a.
22. Stojanović, J., J. Milićević, O. Gajović, V. Jakovljević, I. Matović, Z. Mijušković, T. Nedeljković: The effects of detergent, sodium tripoly-phosphate and ethoxylated oleyl-cetyl on metabolic parameters of the fungus *Trichothecium roseum* Link. *Arch. Biol. Sci. Belgrade.*, 63 (4): 1001–1006, 2011b.
23. Talmadge, S.S. : Environmental and human safety of major surfactants: alcohol ethoxylates and alkylphenol ethoxylates. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, 191–364, 1994.
24. Ying, G.G. : Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environ.Int.*, 32(3):417–431, 2006.

Примљено: 15.10.2015.

Одобрено: 20.04.2016.