

# Tvorba mikotoksina aspergila u uvjetima ex vivo

---

**Akrap, Ana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:804849>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Ana Akrap**

**Tvorba mikotoksina aspergila u uvjetima *ex vivo***

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Mikrobiologija s parazitologijom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za mikrobiologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Maje Šegvić Klarić. Rezultati ovoga rada dio su znanstveno-istraživačkog projekta (Štetni učinci pojedinačnih i kombiniranih mikotoksina *Aspergillus* vrsta – MycotoxA IP-09-2014-5982) kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost, HRZZ.

*Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. sc. Maji Šegvić Klarić na ukazanom povjerenju, stručnom vodstvu, savjetima i strpljenju, višoj asistentici dr. sc. Danieli Jakšić na savjetima i pruženoj pomoći tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada, doc. dr. sc. Mirandi Sertić na provedenoj analizi te drugim djelatnicima Zavoda za mikrobiologiju koji su mi uljepšali boravak na Zavodu.*

*Ogromno hvala mojim roditeljima i prijateljima što su bili uz mene tijekom svih ovih godina!*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Mikotoksini plijesni roda <i>Aspergillus</i> .....	1
1.2. Aflatoksini .....	3
1.3. Fumonizini.....	4
1.4. Okratoksin A .....	6
1.5. Sterigmatocistin.....	7
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	9
3. MATERIJALI I METODE .....	10
3.1. Priprema izolata za ekstrakciju mikotoksina .....	10
3.2. Mikotoksinska ekstrakcija .....	11
3.3. Analiza mikotoksinskih ekstrakata vezanim sustavom tekućinske kromatografije i masene spektrometrije.....	12
3.4. Izrada mikroskopskih preparata .....	14
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	15
4.1. Kvantitativna analiza mikotoksinskih ekstrakata odabranih <i>Aspergillus</i> vrsta vezanim sustavom tekućinske kromatografije i masene spektrometrije .....	15
4.2. Morfologija kolonija odabranih <i>Aspergillus</i> vrsta na hranjivim podlogama CYA i BHA. 24	
5. ZAKLJUČCI.....	29
6. LITERATURA.....	30
7. SAŽETAK/SUMMARY .....	36

# 1. UVOD

## 1.1. Mikotoksini plijesni roda *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* obuhvaća više od 250 različitih vrsta plijesni kojima je zajednička jedinstvena morfološka struktura zvana konidijalna glavica. Sastoji se od izdužene strukture, konidiofora, koji završava terminalnom vezikulom na kojoj su smještene fialide s lancima konidija, spora kojima se aspergili razmnožavaju. Konidije su sitne i lako se prenose zrakom, a aspergili ih proizvode u velikom broju. Uz to, vrste ovog roda eksprimiraju enzime koji im omogućuju iskorištavanje različitih nutrijenata, rastu u širokom rasponu temperatura, a mnogi od njih su i kserofili (mogu rasti i uvjetima niskog aktiviteta vode,  $a_w < 0,8$ ), što pridonosi njihovoj globalnoj rasprostranjenosti (Klich, 2009).

Oko 40 vrsta patogeno je za čovjeka, a najznačajniji su *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* i *A. terreus*. Primarni put ulaska je inhalacija konidija uslijed koje se mogu razviti različita stanja skupno zvana aspergiloze. Rizičnu skupinu čine imunokompromitirani pojedinci, prvenstveno onkološki bolesnici i oboljeli od AIDS-a, budući da njihovi alveolarni makrofagi slabije fagocitiraju i uklanjaju konidije iz organizma, odnosno smanjen im je broj funkcionalnih pomagačkih T-limfocita. Aspergiloze se manifestiraju kao alergijske reakcije, sinusitisi, astme, otomikoze i onihomikoze, a najteži oblik je invazivna aspergiloza. Kod invazivne aspergiloze, iz udahnutih konidija se u alveolama razvijaju hife koje se šire parenhimom pluća prema krvnim žilama i, posljedično, u druge organe, stvarajući pritom različite apscese i nekrotične lezije. Većina slučajeva završava kobno zbog zakašnjele dijagnoze (Carroll i sur., 2016).

Aspergili proizvode niz sekundarnih metabolita od kojih su, za čovjeka, najvažniji mikotoksini jer mogu naštetiti njegovom zdravlju već u niskim koncentracijama. Sekundarni metaboliti su organski spojevi koje proizvode bakterije, gljivice i biljke, a koji nisu neophodni za njihov rast, razvoj i razmnožavanje, no mogu im osigurati opstanak omogućujući im obranu od štetnih utjecaja iz okoliša te komunikaciju s drugim mikroorganizmima (Bills i Gloer, 2016).

Premda nastaju iz uskog spektra primarnih metabolita različitim biosintetskim putevima, mikotoksini su strukturno heterogeni, što rezultira širokim spektrom štetnih učinaka kao što su mutagenost, karcinogenost, teratogenost, hepatotoksičnost, nefrotoksičnost, estrogeno djelovanje (Bennett i Klich, 2003). Za razliku od primarnih metabolita, mikotoksini su većinom specifični za vrstu, iako je horizontalni prijenos gena omogućio različitim vrstama proizvodnju istih mikotoksina (Frisvad, 2014).

Posljednjih desetljeća, zahvaljujući razvoju analitičkih metoda, broj otkrivenih mikotoksina i vrsta plijesni producenata je u porastu, no za čovjeka su, ekonomski i zdravstveno, najvažniji aflatoksini, trihoteceni, fumonizini, okratoksini i zearalenon, od kojih se unutar *Aspergillus* vrsta proizvode tri. Uz aflatoksine, fumonizine i okratoksine, aspergili proizvode sterigmatocistin, gliotoksin, patulin, citrinin te ciklopiazoničnu i penicilinsku kiselinu. Značajni producenti su i plijesni rodova *Penicillium* i *Fusarium* koje, zajedno s aspergilima, koloniziraju i kontaminiraju usjeve u svim fazama proizvodnje hrane. Unosom kontaminirane hrane biljnog, ali i životinjskog podrijetla, mikotoksini dopijevaju u čovjekov organizam. Uz oralni put unosa kao glavni, oni mogu biti inhalirani zajedno sa sporama ili apsorbirani preko kože, a postoji i sumnja da mogu nastati *in situ* kod oboljelih od mikoza (Klich, 2009).

Intoksikacije mikotoksinima nazivaju se mikotoksikozama, a ovisno o dozi i trajanju izloženosti razlikuju se akutne i kronične. Kod akutnih, organizam je izložen visokim dozama toksina unutar kratkog vremenskog intervala, što vodi naglom oštećenju organa i smrti, a kod kroničnih, organizam je dugotrajno izložen niskim, subtoksičnim dozama, što najčešće završava mutagenozom i/ili karcinogenozom (Bennett i Klich, 2003).

Faktori virulencije su, prema definiciji, tvari koje proizvodi mikroorganizam u određenim uvjetima okoliša, a koji mu omogućuju invaziju i infekciju domaćina najčešće zaobilaskom sustava obrane domaćina (pasivnih barijera i imunskog sustava), odnosno tvari koje pridonose sposobnosti mikroorganizma da izazove bolest u domaćinu (Hof, 2008). Premda su jedno od najvećih carstava živog svijeta, broj gljivica patogenih za životinje je malen u odnosu na broj gljivica patogenih za biljke i mikroorganizme, tako da su saznanja o ulozi sekundarnih metabolita u patogenezi mikoza čovjeka i životinja malena, a istraživanja ove problematike su, iz etičkih razloga, rijetka (Bennett i Klich, 2003). Uloga gliotoksina iz *A. fumigatus* u njegovoj virulentnosti je najbolje proučena. Sojevi *A. fumigatus* bez *laeA* gena, koji kodira za transkripcijski faktor važan za biosintezu sekundarnih metabolita plijesni, ne proizvode gliotoksin i pokazali su se slabije toksičnima za fagocite na mišjem modelu (Bok i sur., 2005). Gliotoksin je detektiran u serumu onkoloških bolesnika oboljelih od invazivne aspergiloze. Budući da je njen najčešći uzročnik *A. fumigatus*, pretpostavlja se da imunosupresivno djelovanje gliotoksina pridonosi njegovoj virulenciji (Lewis i sur., 2005). Aflatoksini iz *A. flavus*, drugog najčešćeg uzročnika invazivne aspergiloze, su se pokazali potencijalnim faktorima virulencije u *ex vivo* uvjetima (Klich i sur., 2009).

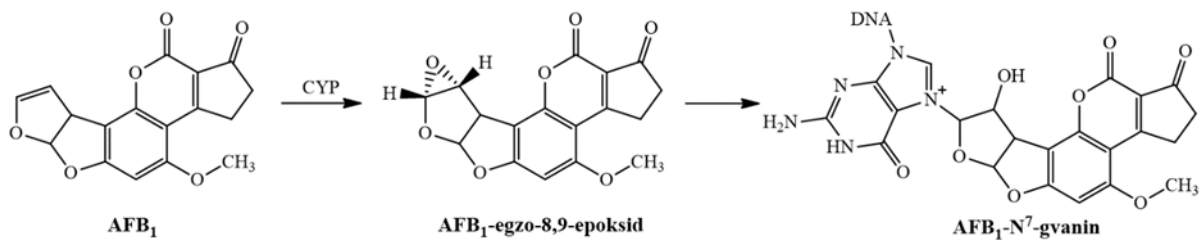
## 1.2. Aflatoksini

Aflatoksini su prvi put izolirani i strukturno karakterizirani 1960-ih godina iz kikirikija kontaminiranog *A. flavus*, čija je ingestija rezultirala pomorom purica od akutnog zatajenja jetre u Engleskoj. To su difuranokumarinski derivati nastali biosintezom iz poliketidnog prekursora. Biosinteza se odvija u oko 15 koraka, pri čemu su važni prekursori norsolorinska kiselina (prvi stabilni prekursor) i sterigmatocistin (Bennett i Klich, 2003).

Plijesni proizvode aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), aflatoksin B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), aflatoksin G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) i aflatoksin G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) od kojih je AFB<sub>1</sub> najzastupljeniji i najpotentniji. Naknadno su otkriveni i aflatoksini nastali biotransformacijom u sisavaca kao što je aflatoksin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) izoliran iz kravljeg mlijeka. Budući da kontaminiraju gotovo sve vrste usjeva (najčešće kukuruz, kikiriki i pamuk), za čovjeka su najznačajniji producenti aflatoksina aspergili sekcije *Flavi* – *A. flavus* i *A. parasiticus*. *A. flavus* proizvodi samo B tip, a *A. parasiticus* oba tipa aflatoksina (Varga i sur., 2009).

Akutne aflatoksikoze u čovjeka su relativno učestale u slabije razvijenim dijelovima svijeta, gdje je spektar dostupnih namirnica ograničen, a preventivni postupci se ne provode zbog nedostupnosti potrebne tehnologije te u 25% slučajeva završavaju smrtnim ishodom zbog oštećenja jetre. Kronična izloženost aflatoksinima dovodi do drugih štetnih učinaka kao što su mutagenost, karcinogenost i imunotoksičnost. Imunosupresivno djelovanje aflatoksina dokazano je na eksperimentalnim životinjama, no, zbog malog broja provedenih studija, na čovjeku nisu doneseni konačni zaključci. U peradi, svinja i štakora, aflatoksin B<sub>1</sub> uzrokuje aplaziju timusa, smanjuje aktivnost T-limfocita i fagocita te sustava komplementa. S druge strane, uzročno-posljedična veza aflatoksina i hepatocelularnog karcinoma dobro je opisana u literaturi. Epidemiološke studije na ljudima provedene u Kini i Africi pokazale su da kronična izloženost aflatoksinu povećava rizik od razvoja hepatocelularnog karcinoma, a rizik je još i veći kod zaraženih virusom hepatitisa B (Williams i sur., 2004).

Kod 50% oboljelih od hepatocelularnog karcinoma pronađena je specifična točkasta mutacija na kodonu 249 unutar tumor supresorskog *TP53* gena – transverzija gvanina u timin, koja rezultira njegovom inaktivacijom (Hussain i sur., 2007). Ova zamjena purinske baze pirimidinskom posljedica je metaboličke aktivacije aflatoksina. Enzimi citokrom P450 hidroksiliraju AFB<sub>1</sub> u elektrofilni aflatoksin B<sub>1</sub>-egzo-8,9-epoksid koji formira DNA adukt preko N<sup>7</sup> gvanina (Guengerich i sur., 1998). Predloženi mehanizam genotoksičnosti AFB<sub>1</sub> prikazan je na Slici 1.



**Slika 1.** Metabolička aktivacija aflatoksina B<sub>1</sub>

Premda je oralni put glavni put unosa, aflatoksini mogu ući u čovjekov organizam inhalacijom. Detektirani su u prašini i u krvi radnika u industrijskim pogonima za obradu kave, kakaa i začina (Brera i sur., 2002) te na životinjskim farmama (Selim i sur., 1998). Postoji i sumnja da su štetni i za druge organe uz jetru. Kohortna studija provedena na radnicima industrijskog pogona za preradu kikirikija pokazuje da bi aflatoksini mogli biti uključeni u patogenezu raka pluća (Hayes i sur., 1984), što potkrepljuje njihova aktivacija u plućnom tkivu dokazana *in vitro* (Kelly i sur., 1997).

Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) klasificira aflatoksine u kategoriju 1 karcinogena što znači da su dokazano karcinogeni za ljude (IARC, 2012).

### 1.3. Fumonizini

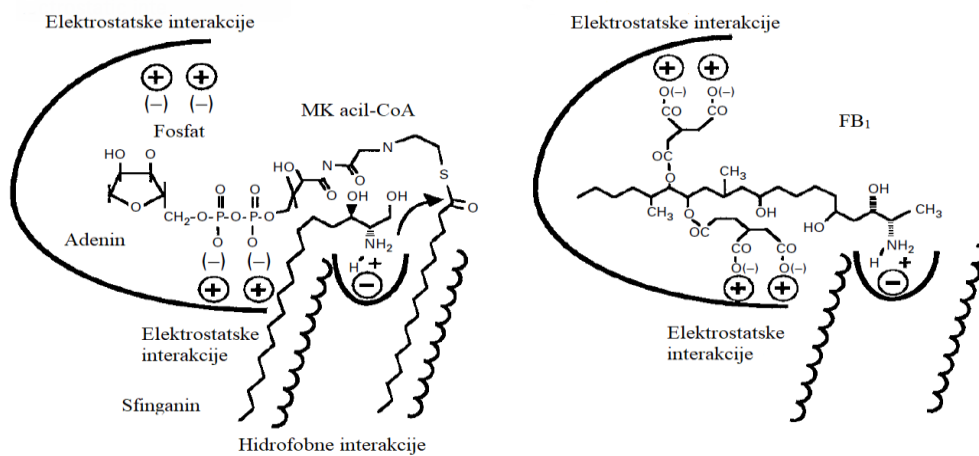
Fumonizini su prvi put izolirani i strukturno karakterizirani 1980-ih godina čime je riješen problem uzročnika niza epidemija u životinja povezanih s ingestijom kukuruza. To su strukturni izomeri građeni od zajedničkog ugljikohidratnog skeleta s esterificiranim karboksilnim skupinama, a međusobno se razlikuju prema broju i položaju hidroksilnih skupina. Do danas je otkriveno oko 25 pripadnika ove skupine mikotoksina, no najzastupljeniji su fumonizin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) i fumonizin B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) (Voss i sur., 2007).

Fumonizini, kao i aflatoksini, nastaju iz poliketidnog prekursora, a glavni producenti su vrste roda *Fusarium* od kojih se izdvaja *F. verticilloides* koja kontaminira kukuruz (Bills i Gloer, 2016; Bennett i Klich, 2003). U posljednjem desetljeću otkrivene su vrste roda *Aspergillus* koje proizvode fumonizine, no produkcija je, zasad, potvrđena samo u dvije vrste sekcije *Nigri* – *A. niger* i *A. welwitschiae* (Varga i sur., 2011; Varga i sur., 2010). Crni aspergili, za razliku od plijesni roda *Fusarium*, nemaju *fum2* gen potreban za biosintezu fumonizina B<sub>1</sub>, zbog čega mogu proizvoditi samo fumonizin B<sub>2</sub> (Manson i sur., 2010; Proctor i sur., 2006).



Za razliku od drugih mikotoksina, fumonizini su hidrofilne molekule, zbog čega je njihova apsorpcija slaba, neovisno o putu unosa, te su akutne intoksikacije rijetke (Bennett i Klich, 2003). Uzrokuju leukoencefalomalaciju u konja i plućni edem u svinja, a u čovjeka se povezuju sa slučajevima defekata neuralne cijevi u fetusa popraćenih manjkom folata (Voss i sur., 2007).

Prihvaćeni mehanizam neurotoksičnosti fumonizina objašnjava remećenjem normalnog metabolizma sfingolipida u stanici. Sfingolipidi su kompleksni lipidi prisutni u staničnim membranama (sfingomijelin), a uz građevnu funkciju, sudjeluju i u staničnoj signalizaciji i prepoznavanju. Građeni su od sfingoidne baze na koju je vezana masna kiselina i različiti supstituenti koji definiraju vrstu sfingolipida. Fumonizini, zbog strukturne sličnosti sa sfingoidnom bazom sfinganinom, kompetitivno inhibiraju ceramid sintazu, ključni enzim u biosintezi sfingolipida (Merrill i sur., 2001). Predloženi mehanizam inhibicije ceramid sintaze prikazan je na Slici 2. Smanjenje koncentracije sfingomijelina u membrani neurona narušava apsorpciju folne kiseline budući da on osigurava ispravno smatanje njenog transportnog proteina (Marasas i sur., 2004).



**Slika 2.** Model aktivnog mjesta ceramid sintaze i predloženi mehanizam inhibicije posredovane fumonizinom B<sub>1</sub>

Fumonizin B<sub>1</sub> dokazani je karcinogen na eksperimentalnim životinjama (štakorima i miševima), ali ne i u studijama na ljudima, zbog čega ga IARC klasificira u kategoriju 2B karcinogena, što znači da je on potencijalni karcinogen za čovjeka (IARC, 2002).

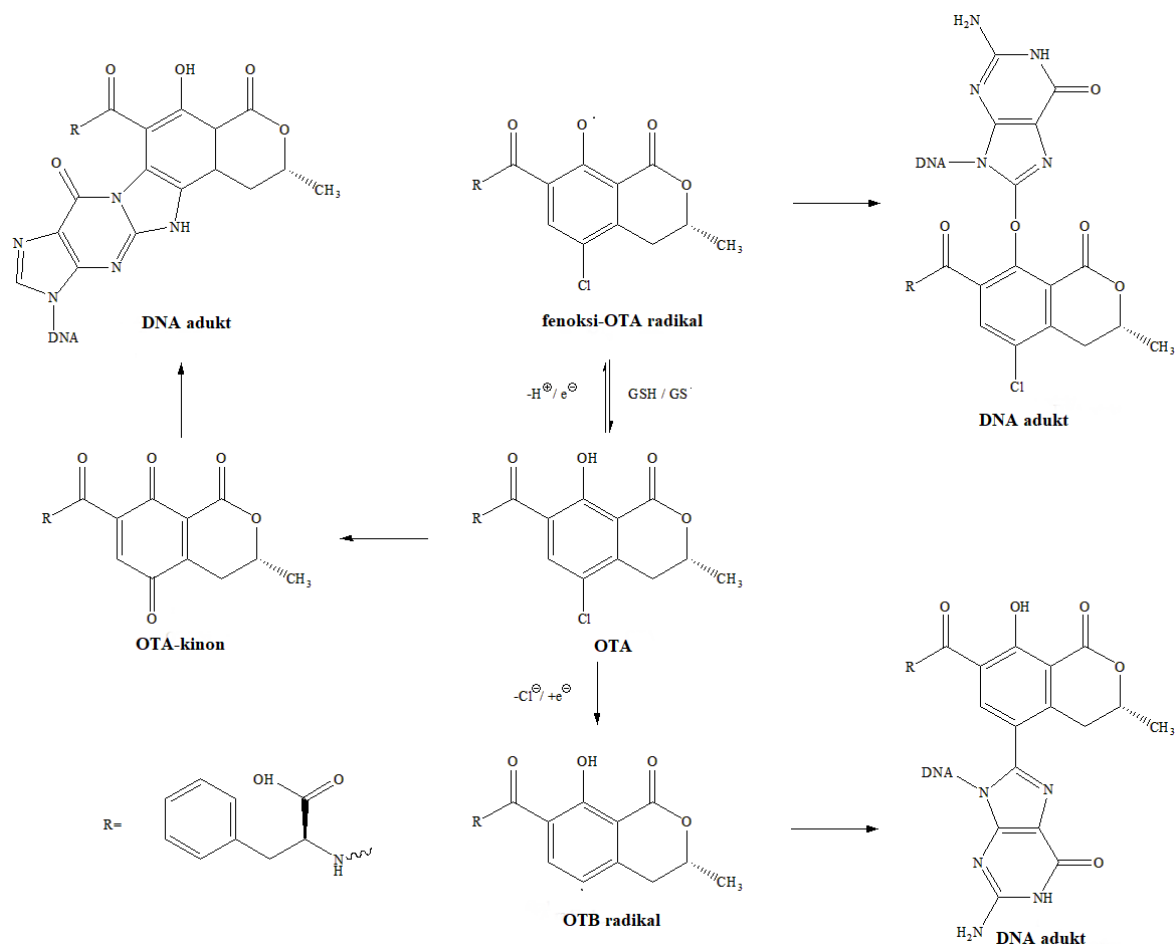
#### 1.4. Okratoksin A

Okratoksin A (OTA) je, prema biološkoj aktivnosti i rasprostranjenosti, drugi najvažniji mikotoksin aspergila. Izoliran je i strukturno karakteriziran nedugo nakon aflatoksina iz *A. ochraceus*. Riječ je o dihidroizokumarinskom derivatu amidom vezanim za aminokiselinu L-fenilalanin koji nastaje iz poliketidnog prekursora (Huffman i sur., 2010).

Produkcija okratoksina A zabilježena je i u drugim vrstama sekcije *Circumdati* (*A. westerdijkiae*) (Frisvad i sur., 2004), aspergilima sekcije *Nigri* (*A. niger*, *A. welwitschiae* (prije *A. awamori*)) (Perrone i sur., 2011; Teren i sur., 1996) te u nekim vrstama roda *Penicillium*. Budući da se *A. niger* koristi u prehrambenoj industriji (npr. za proizvodnju limunske kiseline i amilaze), neophodna je upotreba sojeva koji nisu mikotoksinogeni (Klich, 2009).

Plijesni koje proizvode okratoksin A koloniziraju različite žitarice, dominantno kukuruz, ječam, zob i rižu, te grožđe (Bennett i Klich, 2003), no identificirane su i u zraku stambenih i radnih sredina kao što su obnovljene poplavljene kuće i žitni mlin (Kovačević, 2018; Jakšić i Šegvić Klarić, 2014).

Okratoksin A je nefrotoksičan za sve ispitane vrste životinja, dokazani je karcinogen na glodavcima (miševima i štakorima), potencijalni je i hepatotoksin i imunotoksin, a kod čovjeka se povezuje s endemskom balkanskom nefropatijom. Slučajevi endemske balkanske nefropatije zabilježeni su u Hrvatskoj, Srbiji, Bugarskoj i Rumunjskoj, a kod oboljelih je povišena incidencija karcinoma gornjeg urinarnog trakta. Točan uzročnik do danas nije otkriven, a uz okratoksin A, sumnja se i na aristolohičnu kiselinu koju pronalazimo u biljci vučja stopa. Nefrotoksičnost, hepatotoksičnost i imunotoksičnost posljedica su inhibicije sinteze proteina, lipidne peroksidacije i modulacije signalizacijskog puta MAP kinaze. Mehanizam okratoksinom A posredovane karcinogeneze pretpostavlja oštećenje DNA kovalentnim vezanjem kinonskog intermedijera ili, rjeđe, fenoksi-OTA radikala nastalih njegovom biotransformacijom. DNA adukti na gvaninu izolirani su iz krvi i urina eksperimentalnih životinja (štakora i svinje) i oboljelih od endemske nefropatije (Malir i sur., 2016). Genotoksični metabolički put okratoksina A prikazan je na Slici 2.



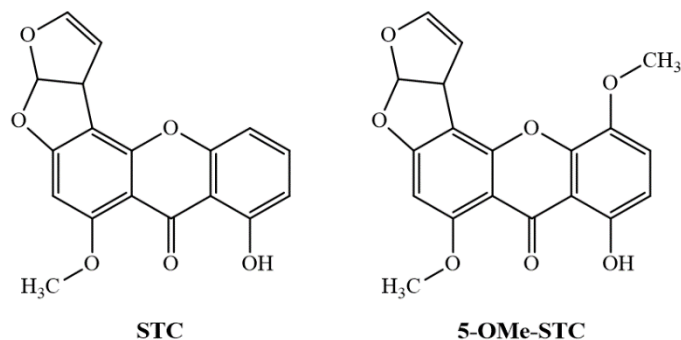
**Slika 2.** Biotransformacija okratoksina A uz formiranje DNA adukta

Prema posljednjoj provedenoj evaluaciji, IARC je klasificirao okratoksin A u kategoriju 2B karcinogena (IARC, 1993), no predlaže se reevaluacija u svjetlu novih dokaza.

### 1.5. Sterigmatocistin

Sterigmatocistin (STC) karakterističan je metabolit aspergila sekcije *Versicolores*. Od ukupno 17 do danas otkrivenih vrsta, samo dvije nisu producenti (Jakšić Despot i sur., 2015; Jurjević i sur., 2013). Aflatoksini i sterigmatocistin su strukturno slični jer je sterigmatocistin jedan od prekursora u njihovoj biosintezi, a razlikuju se u ksantonskom prstenu koji je odsutan iz strukture aflatoksina. Strukturne kemijske formule sterigmatocistina i njegovog metabolita 5-metoksisterigmatocistina (5-OMe-STC) prikazane su na Slici 4. Za razliku od aspergila sekcije *Flavi*, aspergili sekcije *Versicolores* ne mogu prevesti sterigmatocistin u izravni prekursor aflatoksina, O-metilsterigmatocistin, pa materijali kontaminirani ovim plijesnima sadrže visoke koncentracije sterigmatocistina, a niske aflatoksina (Rank i sur., 2011).

Plijesni sekcije *Versicolores* kontaminiraju različite žitarice, no značajnije su kao kolonizatori stambenih i radnih prostora gdje su prisutne u zraku u visokim koncentracijama. One mogu rasti na materijalima siromašnim nutrijentima i širokom rasponu vrijednosti aktiviteta vode, te se smatraju najvažnijim uzročnicima sindroma bolesne zgrade (Jurjević i sur., 2012; Andersen i sur., 2011).



**Slika 3.** Strukturne kemijske formule sterigmatocistina (STC) i njegovog toksičnog metabolita 5-metoksisterigmatocistina (5-OMe-STC).

Budući da nema dokaza o karcinogenosti na ljudima, IARC klasificira sterigmatocistin u kategoriju 2B karcinogena jer je dokazana njegova toksičnost, mutagenost, citotoksičnost i karcinogenost *in vitro* i *in vivo* studijama na animalnim modelima (IARC, 2002). Sterigmatocistin uzrokuje hepatocelularni karcinom, hemangiosarkom jetre, adenokarcinom pluća te kožne tumore kod miševa, štakora, majmuna i dr. (EFSA, 2013).

Štetni učinci se ispoljavaju nakon njegove metaboličke aktivacije koja je, zbog strukturne sličnosti, analogna aktivaciji aflatoksina – citokrom P450 kataliziranom hidrosilacijom nastaje mutageni epoksid koji formira adukte s N<sup>7</sup> gvanina iz DNA. Međutim, zbog slabije peroralne apsorpcije u odnosu na AFB<sub>1</sub>, STC je slabije toksičan (Veršilovskis i de Saeger, 2010).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Plijesni roda *Aspergillus* proizvode veliki broj različitih sekundarnih metabolita od kojih su mnogi štetni za zdravlje čovjeka. Osim kemoraznolikosti, problem predstavlja i njihova globalna rasprostranjenost – aspergili su izolirani iz gotovo svih supstrata, od tla do zraka unutarnjih, radnih i stambenih, prostora iz kojeg potječu uzorci korišteni u ovom radu. Izloženost povećanim koncentracijama spora i/ili dijelova micelija plijesni u okolišu može rezultirati razvojem niza različitih, relativno benignih, ali kroničnih, zdravstvenih stanja koja mogu završiti kobno, posebno kod imunokompromitiranih bolesnika inficiranih toksinogenim sojevima jer se mikotoksine, unesene u organizam sporama ili stvorenima *in situ*, smatra odgovornima za egzacerbaciju simptoma.

Budući da su dokazi za *in situ* biosintezu mikotoksina oskudni, cilj ovog rada je ispitati toksinogeni potencijal u *ex vivo* uvjetima, odnosno kvalitativno i kvantitativno odrediti mikotoksine koje su proizveli odabrani aspergili uzgojeni na hranjivoj podlozi koja oponaša uvjete u ljudskim tkivima.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Priprema izolata za ekstrakciju mikotoksina

*Kemikalije i hranjive podloge:*

- Medij za trajno čuvanje kultura plijesni (glicerol : voda, 1:1 v/v)
- *Czapek Yeast Extract Agar* hranjiva podloga (CYA, Difco, SAD): 10,0 mL Czapek koncentrat [natrijev nitrat ( $\text{NaNO}_3$ ) 30,0 g, kalijev klorid (KCl) 5,0 g, magnezijev sulfat heptahidrat ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) 5,0 g, željezov (II) sulfat heptahidrat ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0,1 g otopljeni su u 100 mL destilirane vode), 1,0 mL otopina elemenata u tragovima [bakrov (II) sulfat pentahidrat ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) 0,5g, cinkov sulfat heptahidrat ( $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) 1,0 g otopljeni su u 100,0 mL destilirane vode], 1,0 g kalijev hidrogenfosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 5,0 g kvasčev ekstrakt, 30,0 g saharoza i 15,0 g agar – otopljeni su u 1,0 L destilirane vode. Tako priređena otopina sterilizirana je autoklaviranjem (121°C, 15 min).
- Modificirana *Brain Heart Agar* hranjiva podloga (BHA, Merck, Njemačka): 52,0 g BHI koncentrat [peptoni i infuzije telećeg mozga i goveđeg srca 27,5 g, D-glukoza 2,0 g, natrijev klorid (NaCl) 5,0 g, natrijev hidrogenfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 2,5 g, agar 15,0 g] i 4,0 g saharoza - otopljeni su u 1,0 L destilirane vode. Tako priređena otopina sterilizirana je autoklaviranjem (121°C, 15 min).

*Uređaji:*

- Autoklav ( $\varnothing$  300 x 500, Sutjeska, Beograd, Srbija)

Nakon odmrzavanja uzoraka *Aspergila* (N=8) pohranjenih u mediju za trajno čuvanje kultura plijesni, provedena je inokulacija po 3  $\mu\text{L}$  suspenzije izolata na tri mjesta na CYA hranjivu podlogu u sterilnim uvjetima, a potom su uzorci inkubirani oko 3 dana u mraku na 25°C. Svaki od izolata iz čiste kulture na CYA agaru reinokuliran je na modificiranu BHA hranjivu podlogu, a potom su uzorci inkubirani u mraku na 25°C i 37°C (7 dana za vrste iz sekcija *Circudati*, *Flavi* i *Versicolores* i 10 dana za vrste iz sekcije *Nigri*).

Uzorci obrađeni u ovom radu dio su znanstveno-istraživačkog projekta (Štetni učinci pojedinačnih i kombiniranih mikotoksina *Aspergillus* vrsta – MycotoxA IP-09-2014-5982) kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost, HRZZ. Oni su prethodno pokazali visok toksinogeni potencijal na CYA hranjivoj podlozi, no BHA je hranjiva podloga koja oponaša *in*

*vivo* uvjete, atipična za uzgoj plijesni. Njena pH vrijednost odgovara normalnoj pH vrijednosti ljudske krvi (7,4), a koncentracija glukoze (2 g/L) je nešto viša od normalne koncentracije glukoze u ljudskoj krvi (0,7-1,0 g/L) te je sličnija koncentraciji glukoze u krvi dijabetičara. Plijesnima odgovara visok udio ugljikohidrata, ali one preferiraju rasti i sintetizirati sekundarne metabolite u nešto kiselijem pH (5,5-6,5), tako da je BHA hranjiva podloga prikladnija za istraživanja bakterija budući da je blago lužnati pH optimalan za njihov rast. No kako su pH i koncentracija glukoze u krvi izrazito varijabilni biokemijski parametri kod imunokompromitiranih osoba, Klich i suradnici, čije je istraživanje poslužilo kao uzor ovom radu, odlučili su uzgajati filogenetski srodne aspergile na BHA hranjivoj podlozi uz različite vrijednosti pH i koncentracije ugljikohidrata (Klich i sur., 2009). Temperatura od 37°C odabrana je kao eliminacijski faktor. Budući da se radi o normalnoj čovjekovoj tjelesnoj temperaturi, patogene plijesni moraju moći rasti i pri toj temperaturi. Prema rezultatima Klich i suradnika, većina ispitanih aspergila proizvodila je odabrane mikotoksine u najvećim koncentracijama na hranjivim podlogama s visokim udjelom ugljikohidrata pa je BHA modificirana dodatkom saharoze u koncentraciji 4 g/L.

### **3.2. Mikotoksinska ekstrakcija**

*Kemikalije i pribor:*

- Ekstrakcijsko sredstvo za uzorke aspergila sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores*, producente aflatoksina B<sub>1</sub>, okratoksina A, sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina (metanol:diklormetan:etil-acetat, 1:2:3 uz 1% (v/v) mravlje kiseline)
- Ekstrakcijsko sredstvo za uzorke aspergila sekcije *Nigri*, producente fumonizina B<sub>2</sub> (70% metanol (v/v))
- Eppendorf tubice 1,5 ml (Eppendorf, Hauppauge, SAD)
- Celulozni nitratni membranski filteri veličine pora 0,45 µm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- Vijale za uzorkovanje 2,0 mL sustavom za tekućinsku kromatografiju (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

#### *Uređaji:*

- Ultrazvučna kupelj (Elma, Singen, Njemačka)
- Termoblok (Eppendorf ThermoMixer<sup>®</sup> C, Eppendorf, Njemačka)
- Termo-vakuum uparivač (Concentrator Plus, Eppendorf, Njemačka)

Mikroekstrakcija mikotoksina provedena je metodom po Smedsgaardu (Smedsgaard, 1997) iz čistih kultura *Aspergila* poraslih na BHA hranjivoj podlozi. Upotrebom metalnih cilindara promjera 6 mm izrezana su tri kružna isječka na tri mjesta na koloniji – jedan u centru kolonije, jedan na rubu kolonije udaljenom od drugih kolonija te jedan na rubu kolonije bliskom drugim kolonijama. Isječci su preneseni u vijale s 1000  $\mu\text{L}$  odgovarajućeg ekstrakcijskog sredstva. Ekstrakcija je provedena na ultrazvučnoj kupelji tijekom 45 minuta, a ekstrakti su preneseni u Eppendorf tubice sterilnom iglom i špricom kroz membranski filter. Ekstrakcijsko sredstvo je upareno u struji dušika pod vakuumom tijekom 30 minuta kako bi se uklonila organska otapala koja interferiraju s tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC), nakon čega je suhi ekstrakt otopljen u 500  $\mu\text{L}$  hladnog 70% metanola (v/v). Suhi ekstrakti koji nisu odmah bili uspješno otopljeni u metanolu postavljeni su u termoblok na 15 min pri temperaturi od 60°C i 550 rpm. Otopljeni ekstrakti (N=13) preneseni su u čiste vijale za uzorkovanje HPLC-om i pohranjeni na -20°C.

### **3.3. Analiza mikotoksinskih ekstrakata vezanim sustavom tekućinske kromatografije i masene spektrometrije**

#### *Kemikalije:*

- Standardna otopina aflatoksina B<sub>1</sub> u acetonitrilu koncentracije 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Standard fumonizina B<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka) otopljen u pročišćenoj vodi do koncentracije 0,1 mg/mL i razrijeđen do 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Standard okratoksina A (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka) otopljen u acetonitrilu do koncentracije 1 mg/mL i razrijeđen do 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Standardna otopina sterigmatocistina u acetonitrilu koncentracije 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka) razrijeđena do 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$



- Standardna otopina 5-metoksisterigmatocistina u acetonitrilu koncentracije 50 µg/mL (Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada) razrijeđena do 5 µg/mL

*Uređaji:*

- Vezani sustav tekućinske kromatografije (Agilent 1100 chromatograph, Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka) i masene spektrometrije LC/MSD Trap VL (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

Analiza mikotoksinskih ekstrakata provedena je na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Identifikacija aflatoksina B<sub>1</sub>, fumonizina B<sub>2</sub>, okratoksina A, sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina provedena je na tekućinskom kromatografu Agilent 1100, pri čemu je korištena Symmetry C18 kolona obrnutih faza, dimenzija 150 mm x 4,6 mm i veličine čestica 3,5 µm. Temperatura kolone iznosila je 35°C. Za aflatoksin B<sub>1</sub> korištena je izokratna metoda elucije mobilnom fazom stalnog sastava (metanol : pročišćena voda : mravlja kiselina, 50:50:0,1 v/v/v), pri čemu je brzina protoka mobilne faze bila 0,7 mL/min. Za fumonizin B<sub>2</sub> korištena je gradijentna metoda elucije mobilnom fazom promjenjivog udjela eluenta A (acetonitril + 0,1% mravlja kiselina (v/v)) i B (pročišćena voda + 0,1% mravlja kiselina (v/v)), pri čemu je brzina protoka mobilne faze bila 0,7 mL/min. Za okratoksin A korištena je izokratna metoda elucije mobilnom fazom stalnog sastava (metanol : pročišćena voda : mravlja kiselina, 60:40:0,1, v/v), pri čemu je brzina protoka mobilne faze bila 1,0 mL/min. Za sterigmatocistin i 5-metoksisterigmatocistin korištena je gradijentna metoda elucije mobilnom fazom promjenjivog udjela eluenta A (pročišćena voda) i B (metanol), pri čemu je brzina protoka mobilne faze bila 1,0 mL/min. Gradijentne metode elucije fumonizina B<sub>2</sub>, sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina detaljno su opisane u diplomskim radovima izrađenim na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova (Huskić, 2018; Popčević, 2017). Detekcija aflatoksina B<sub>1</sub>, fumonizina B<sub>2</sub> i okratoksina A vršena je MS detektorom, dok je detekcija sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina vršena primjenom detektora s nizom dioda (engl. *diode array detector*, DAD) na valnoj duljini od 245 nm. Strukturna karakterizacija i kvantifikacija svih mikotoksina provedena je masenim spektrometrom sastavljenim od elektrosprej ionizatora i analizatora stupice za ione. Analiza se provodila koristeći elektrosprej ionizaciju u pozitivnom načinu snimanja. Temperatura izvora iona iznosila je 325°C, a napon na kapilari 3,5 kV. Kao plin za sušenje korišten je dušik pri protoku 6 L/min i pri tlaku 10 psi. Spektar snimanja masa

iona bio je u rasponu  $m/z$  od 100 do 800. Kao plin za koliziju korišten je helij. Broj iona zadržanih u analizatoru iznosio je 30 000, a zadržavani su do 200 ms.

### **3.4. Izrada mikroskopskih preparata**

*Kemikalije i pribor:*

- Laktofenol (Merck, Njemačka)
- Pokrovna stakalca (24x40 mm, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co, Njemačka)
- Predmetna stakalca (26x76 mm, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co, Njemačka)
- Mikrobiološka eza (Copan Italia S.p.A, Italija)

*Uređaji:*

- Mikroskop (Microscope BX40, Olympus, Japan)

Mikroskopski preparati izrađeni su za svaku od vrsta iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* poraslih na modificiranom BHA agaru. Na predmetno stakalce stavljen je jedna kap laktofenola na koju je ezom prebačen dio kulture nakon čega je postavljeno pokrovno stakalce. Preparat je promatran pod mikroskopom pod povećanjem do 400 puta uz fotografiranje.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

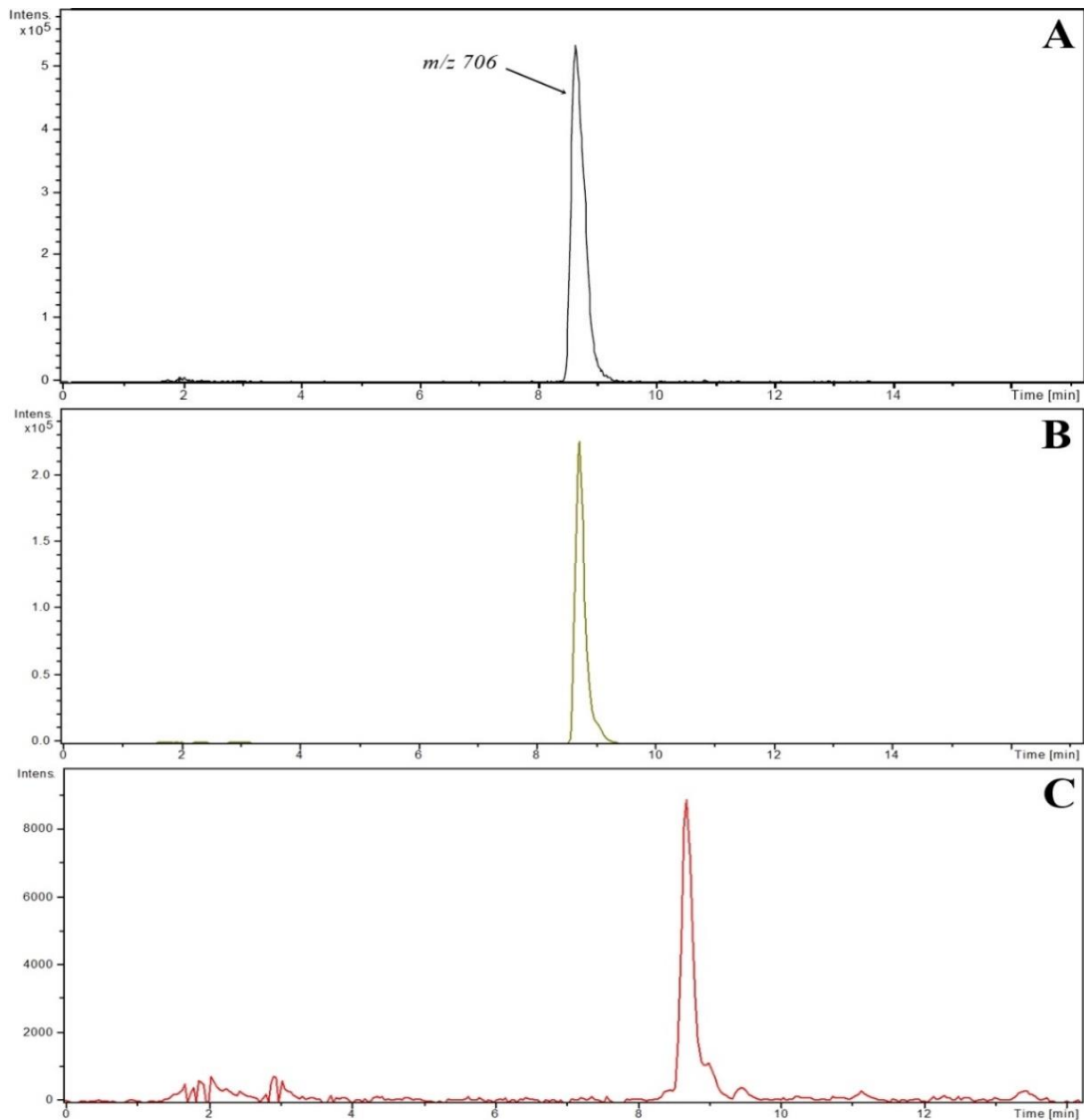
### 4.1. Kvantitativna analiza mikotoksinskih ekstrakata odabranih *Aspergillus* vrsta poraslih na BHA hranjivoj podlozi vezanim sustavom tekućinske kromatografije i masene spektrometrije

Na modificiranu BHA hranjivu podlogu inokulirano je 8 različitih vrsta aspergila iz 4 sekcije izoliranih iz zraka ili prašine poplavljenog i nepoplavljenog područja. Dvije inokulirane vrste, *A. flavus* i *A. niger*, nalaze se među tri najčešća uzročnika invazivne aspergiloze. Svih 8 inokuliranih vrsta formiralo je kolonije na BHA podlozi pri 25°C, a tek tri (*A. flavus*, *A. welwitschiae* i *A. niger*) pri 37°C, što nije iznenađujuće budući da rast ispitivanih aspergila sekcija *Circumdati* i *Versicolores*, prema dostupnoj literaturi, nije zabilježen niti na CYA hranjivoj podlozi pri 37°C (Jakšić i sur., 2015; Visagie i sur., 2014.; Jurjević i sur., 2012). Iznimka je bio *A. griseoaurantiacus* iz sekcije *Versicolores* koji je formirao kolonije pri 37°C, ali je njihov promjer bio tek oko 2 mm te, očekivano, nije proizvodio sterigmatocistin i 5-metoksisterigmatocistin. S druge strane, iako je njegov rast zabilježen u rasponu temperatura od 12°C do 48°C, optimalna temperatura za rast *A. flavus* je 37°C što pridonosi njegovoj patogenosti za čovjeka (Hedayati i sur., 2007).

Premda je *A. flavus* formirao kolonije na BHA podlozi na obje ispitivane temperature, aflatoxin B<sub>1</sub> nije detektiran u njegovim ekstraktima što je u skladu s rezultatima iz literature prema kojima je *A. flavus* proizvodio aflatoxin B<sub>1</sub> na BHA podlozi samo pri temperaturi od 25°C i pri koncentracijama ugljikohidrata pet puta višima od koncentracije korištene u ovom radu (Klich i sur., 2009). Regulacija genske ekspresije proteina potrebnih za biosintezu aflatoxina na molekularnoj razini nije potpuno razjašnjena, no eksperimentalno je utvrđeno da vanjski faktori, kao što su izvor ugljika i dušika, pH hranjive podloge, temperatura, aktivitet vode i dr., igraju važnu ulogu. Optimalni izvori ugljika su jednostavni ugljikohidrati, kao što je saharoza korištena u ovom radu, a do proizvodnje aflatoxina ne dolazi jedino na hranjivom mediju koji sadrži nitate i nitrite. Iako *A. flavus* raste pri temperaturi od 37°C, temperature više od 36°C zaustavljaju biosintezu aflatoxina, a negativan utjecaj pokazao je i lužnati pH podloge (Yu i sur., 2012). Osim o vanjskim faktorima, toksinogeni potencijal ovisi i o samom soju. Bennett i Klich navode da tek polovica sojeva *A. flavus* proizvodi aflatoxine (Bennett i Klich, 2003). S druge strane, čak 76% sojeva izoliranih iz zraka i prašine žitnog mlina pokazalo se aflatoxinogenim, a svojstvo proizvodnje AFB<sub>1</sub> koreliralo je s prisustvom gena za transkripcijski faktor važan za regulaciju biosinteze (*afIR*), reduktazu norsolorinske kiseline

(*norA*) i O-metiltransferaze (*omtA*), no otkriveni su sojevi kod kojih su navedeni geni bili prisutni u genomu, no nisu proizvodili aflatoksine u koncentracijama iznad limita detekcije (Jakšić i sur., 2019). U istom istraživanju je *in vitro* pokazano da AFB<sub>1</sub>, sam ili u kombinaciji s drugim metabolitima *A. flavus*, može naštetiti epitelnim stanicama dišnih puteva radnika mlina koji su mu kronično izloženi. Nedavno su izolirani sojevi *A. flavus* iz Južne Koreje koji, uz aflatoksine B tipa, proizvode i aflatoksine G tipa, što se kosi s dugogodišnjom tezom prema kojoj je *A. flavus* sposoban proizvoditi isključivo aflatoksine B tipa (Frisvad i sur., 2019). Budući da soj korišten u ovom radu nije ispitan na aflatoksine G tipa, postoji mogućnost da je i on jedan od njihovih producenata.

Crni aspergili rasli su na BHA podlozi pri obje temperature, međutim fumonizin B<sub>2</sub> pronađen je samo u ekstraktima izoliranim iz kolonija poraslih pri 25°C. U tim ekstraktima detektiran je protonirani molekulski ion [M+H]<sup>+</sup> kojem odgovara vrijeme zadržavanja od 8,7 min u kromatogramu izoliranog iona (engl. *extracted ion chromatogram*, EIC), odnosno fragment *m/z* 706 u masenom spektru standarda fumonizina B<sub>2</sub>. EIC standarda fumonizina B<sub>2</sub> koncentracije 10 µg/mL i ispitanih ekstrakata prikazani su na Slici 5.



**Slika 5.** EIC protoniranog molekuskog iona  $[M+H]^+$  ( $m/z$  706) standarda fumonizina  $B_2$  koncentracije  $10 \mu\text{g/mL}$  (A), ekstrakta iz *A. welwitschiae* (B) i *A. niger* (C) poraslih na BHA hranjivoj podlozi pri temperaturi od  $25^\circ\text{C}$

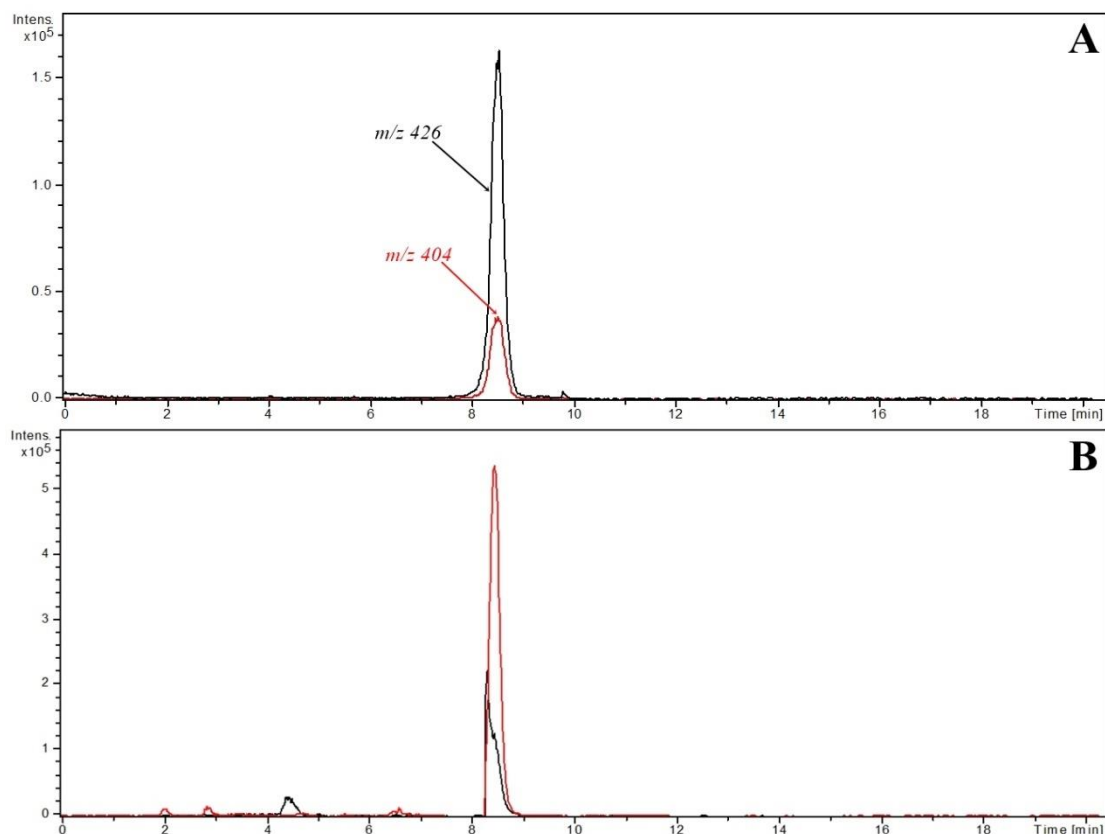
Kvantifikacija je provedena metodom vanjskog standarda te su dobivene koncentracije fumonizina  $B_2$  u iznosu od  $3,12 \mu\text{g/mL}$  za *A. welwitschiae* i  $0,12 \mu\text{g/mL}$  za *A. niger* iz čega proizlazi da je *A. welwitschiae* potentniji producent na BHA hranjivoj podlozi. Rezultati kvantitativne analize prikazani su u Tablici 1. Prema dostupnoj literaturi, toksinogeni potencijal vrsta sekcije *Nigri* u *ex vivo* uvjetima dosad nije ispitan, no dobivene koncentracije odgovaraju toksinogenom potencijalu ispitanih vrsta na CYA hranjivoj podlozi. Jakšić i suradnici pokazali su da je *A. niger* slabiji proizvođač fumonizina  $B_2$  od *A. welwitschiae* na CYA hranjivoj podlozi pri  $25^\circ\text{C}$  što upućuje na *A. welwitschiae* kao dominantnog producenta fumonizina  $B_2$  unutar sekcije crnih aspergila. Premda fumonizin  $B_2$  nije detektiran u *ex vivo* uvjetima, niti u pacijenata

s aspergilozom, *in vitro* istraživanja konstantno upućuju na njegovu citotoksičnost. U istom istraživanju je pokazano da je FB<sub>2</sub> slabo toksičan za humane stanice pluća što upućuje na ulogu drugih sekundarnih metabolita crnih aspergila u njihovoj citotoksičnosti kao što je elastaza (Jakšić i sur., 2018). Elastaza je dokazani faktor virulencije za *A. fumigatus* jer mu olakšava ulazak u organizam dišnim sustavom. *A. welwitschiae* proizvodi veće količine elastaze od *A. niger* (Varga i sur., 2011) čime se može objasniti veća toksičnost ekstrakta *A. welwitschiae* na humanim stanicama što su opazili Jakšić i suradnici. Ispitivanja utjecaja vanjskih faktora na biosintezu pokazala su da *A. niger* proizvodi fumonizin B<sub>2</sub> u najvećim koncentracijama pri blago sniženom aktivitetu vode ( $a_w = 0,99$ ) i temperaturi između 25 i 30°C na CYA hranjivoj podlozi obogaćenoj natrijevim kloridom. S druge strane, dodatak natrijeva klorida u hranjivu podlogu nepovoljno djeluje na proizvodnju fumonizina u vrstama roda *Fusarium* koje ih, uz to, preferiraju proizvoditi pri temperaturi između 20 i 25°C (Mogensen i sur., 2010; Mogensen i sur., 2009).

**Tablica 1.** Rezultati kvantitativne analize ekstrakata dobivenih iz vrsta sekcije *Nigri*, producenata FB<sub>2</sub>, poraslih na BHA hranjivoj podlozi

SEKCIJA	VRSTA	MFBF	UZORAK	FB <sub>2</sub> (µg/mL)	FB <sub>2</sub> (µg/mL)
				pri 25°C	pri 37°C
<i>Nigri</i>	<i>A. welwitschiae</i>	AN 12137	prašina, obnovljena kuća, Gunja	3,12	0
<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	AN 12371	zrak, Gornji Stupnik	0,12	0

Okratoksin A pronađen je samo u ekstraktu *A. westerdijkiae* iz sekcije *Circumdati* porasle pri 25°C. U tom ekstraktu detektiran je protonirani molekularni ion [M+H]<sup>+</sup> kojem odgovara vrijeme zadržavanja od 8,3 min u EIC, odnosno fragment *m/z* 404 u masenom spektru i aduktor molekularnog iona s natrijem [M+Na]<sup>+</sup> kojem odgovara vrijeme zadržavanja od 8,4 min u EIC, odnosno fragment *m/z* 426 u masenom spektru standarda okratoksina A koncentracije 10 µg/mL. EIC standarda okratoksina A i ispitanog ekstrakta prikazani su na Slici 6.



**Slika 6.** EIC protoniranog molekuskog iona  $[M+H]^+$  ( $m/z$  404) i aduktora s natrijem  $[M+Na]^+$  ( $m/z$  426) standarda OTA koncentracije 10  $\mu\text{g/mL}$  (A) i ekstrakta iz *A. westerdijkiae* (B) poraslog na BHA hranjivoj podlozi pri temperaturi od 25°C

Kvantifikacija je provedena metodom vanjskog standarda te je dobivena koncentracija okratoksina A u iznosu od 27,78  $\mu\text{g/mL}$  za *A. westerdijkiae*. Rezultati kvantitativne analize prikazani su u Tablici 2. Produkcija okratoksina A od strane *A. westerdijkiae*, vrste filogenetski srodne *A. ochraceus* iz koje je okratoksin izvorno izoliran, nije iznenađujuća budući da su Klich i suradnici pokazali da nešto filogenetski udaljenije vrste iste sekcije (*A. flocculosus* i *A. pseudoelegans*) također produciraju okratoksin A (Klich i sur., 2009). Dostupni podaci iz literature za crne aspergile su oskudni. Iako su najvažnija sekcija plijesni u biotehnologiji i prehrambenoj tehnologiji, njihova identifikacija i klasifikacija predstavljaju izazov budući da ih gotovo nemoguće razlikovati na osnovu fenotipa. *A. niger* i *A. welwitschiae* su toliko srodni da im je, uz fenotipska obilježja, i ekstranolni profil gotovo identičan, a razlike postaju vidljive tek na razini gena, npr. gena za kloroperoksidazu za koju se pretpostavlja da sudjeluje u biosintezi okratoksina (Varga i sur., 2011). O biosintetskom putu okratoksina se i danas relativno malo zna, no očekuje se sekvenciranjem genoma njegovih producenata dobiti bolji uvid u regulaciju biosinteze na molekularnoj razini (Huffman i sur., 2012). Zasad je promatran

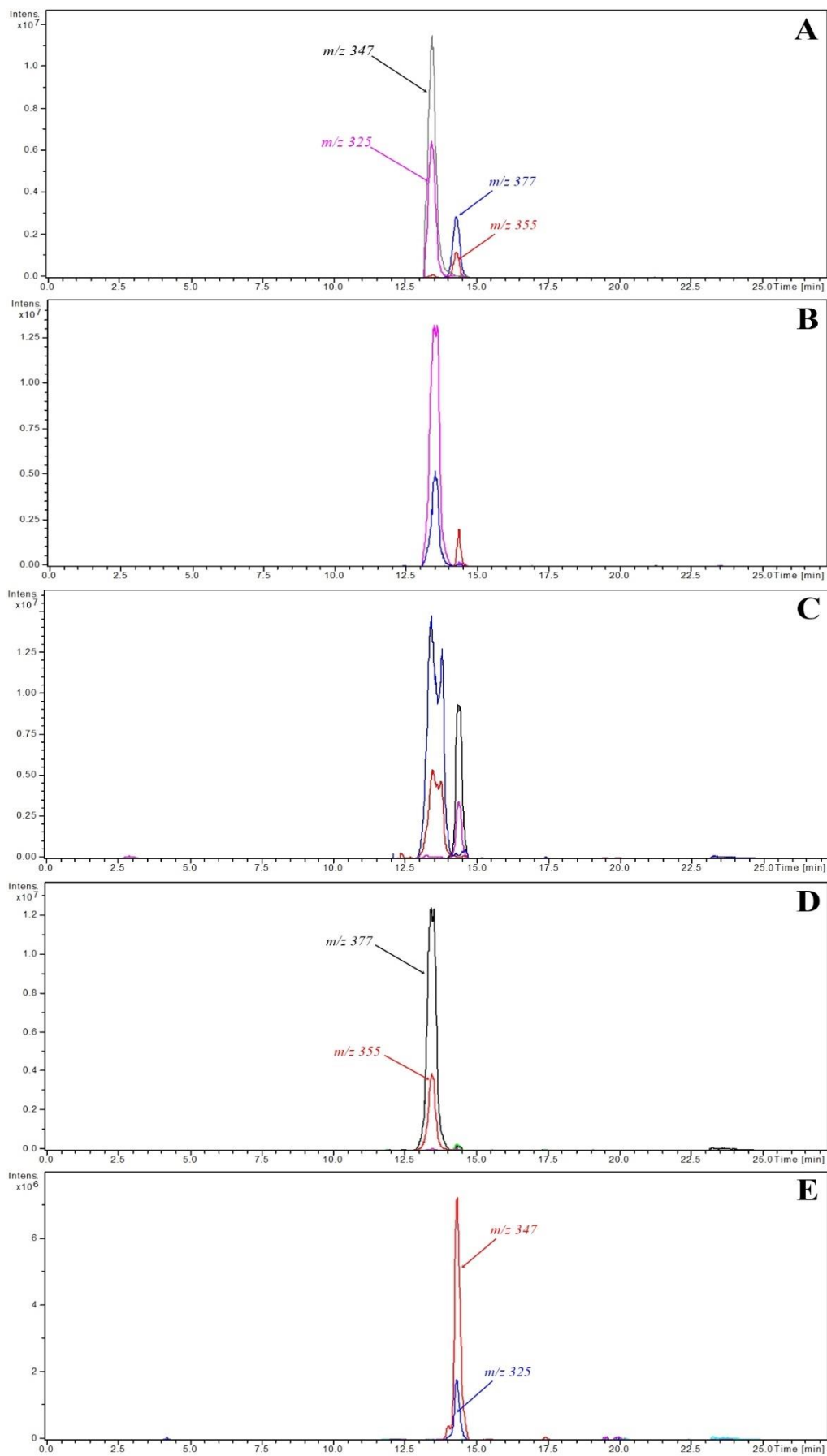
učinak vanjskih faktora na rast plijesni i proizvodnju okratoksina pri čemu je opaženo da svjetlost valnih duljina 455-470 nm i 627 nm inhibitorno djeluje na sporulaciju, formiranje micelija i proizvodnju okratoksina kod *A. niger* budući da inducira lipoperoksidazu koja generira reaktivne kisikove spojeve što povećava oksidativni stres organizma (Fanelli i sur., 2012; Reverberi i sur., 2010). Uloga pH medija u regulaciji biosinteze okratoksina kod *A. niger* nije velika. Naime, *A. niger* raste i proizvodi mikotoksine, pa i okratoksin A, u širokom rasponu pH vrijednosti, no najveća proizvodnja OTA opažena je pri blago kiselim uvjetima (5,35) (Passamani i sur., 2014).

**Tablica 2.** Rezultati kvantitativne analize ekstrakata dobivenih iz vrsta sekcija *Circumdati* i *Nigri*, producenata OTA, poraslih na BHA hranjivoj podlozi

SEKCIJA	VRSTA	MFBF	UZORAK	OTA (µg/mL) pri 25°C	OTA (µg/mL) pri 37°C
<i>Circumdati</i>	<i>A. westerdijkiae</i>	AC 12375	zrak, Gornji Stupnik	27,78 µg/mL	-
<i>Nigri</i>	<i>A. welwitschiae</i>	AN 12137	prašina, obnovljena kuća, Gunja	0	0
<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	AN 12371	zrak, Gornji Stupnik	0	0

Sterigmatocistin je pronađen u ekstraktima *A. creber*, *A. puulaauensis* i *A. griseoaurantiacus*. U tim ekstraktima detektiran je protonirani molekularni ion  $[M+H]^+$  kojem odgovara vrijeme zadržavanja 14,2 min u EIC, odnosno fragment  $m/z$  325 u masenom spektru i aduktor s natrijem  $[M+Na]^+$  kojem odgovara vrijeme zadržavanja 14,4 min u EIC, odnosno fragment  $m/z$  347 u masenom spektru standarda sterigmatocistina koncentracije 5 µg/mL. 5-metoksisterigmatocistin je pronađen u ekstraktima *A. creber*, *A. puulaauensis* i *A. jensenii*. U tim ekstraktima detektiran je protonirani molekularni ion  $[M+H]^+$  kojem odgovara vrijeme zadržavanja 13,4 min u EIC, odnosno fragment  $m/z$  355 u masenom spektru i aduktor s natrijem  $[M+Na]^+$  kojem odgovara vrijeme zadržavanja 13,5 min u EIC, odnosno fragment  $m/z$  377 u masenom spektru standarda 5-metoksisterigmatocistina koncentracije 5 µg/mL. EIC standarda i ispitanih ekstrakta prikazani su na Slici 7.





Slika 7. EIC protoniranog molekuskog iona  $[M+H]^+$  ( $m/z$  325) i aduktora s

natrijem  $[M+Na]^+$  ( $m/z$  347) standarda STC koncentracije  $5 \mu\text{g/mL}$  te protoniranog molekuskog iona  $[M+H]^+$  ( $m/z$  355) i aduktora s natrijem  $[M+Na]^+$  ( $m/z$  377) standarda 5-OMe-STC koncentracije  $5 \mu\text{g/mL}$  (A), ekstrakta dobivenog iz *A. creber* (B), *A. puulaauensis* (C), *A. jensenii* (D) i *A. griseoaurantiacus* (E) poraslih na BHA hranjivoj podlozi pri temperaturi od  $25^\circ\text{C}$

Kvantifikacija je provedena metodom kalibracije, a jednadžbe kalibracijskih pravaca glasile su  $y = 1126163,471x + 17361168,422$  za sterigmatocistin i  $y = 4662808,355x + 50918674,777$  za 5-metoksisterigmatocistin. Koncentracije sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina u pojedinom ekstraktu prikazane su u Tablici 3. *A. puulaauensis* se pokazao kao dominantan producent sterigmatocistina, a *A. jensenii* 5-metoksisterigmatocistina.

**Tablica 3.** Rezultati kvantitativne analize ekstrakata dobivenih iz vrsta sekcije *Versicolores*, producenata STC i 5-OMe-STC, poraslih na BHA hranjivoj podlozi pri temperaturi od  $25^\circ\text{C}$

SEKCIJA	VRSTA	MFBF	UZORAK	STC ( $\mu\text{g/mL}$ )	5-OMe-STC ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Versicolores</i>	<i>A. creber</i>	AV 12296	zrak, obnovljena kuća, Gunja	0,59	42,79
<i>Versicolores</i>	<i>A. puulaauensis</i>	AV 12688	prašina, obnovljena kuća, Gunja	112,96	98,82
<i>Versicolores</i>	<i>A. jensenii</i>	AV 12694	prašina, obnovljena kuća, Gunja	< LOQ	48,18
<i>Versicolores</i>	<i>A. griseoaurantiacus</i>	AV 12745	prašina, Gornji Stupnik	73,92	0

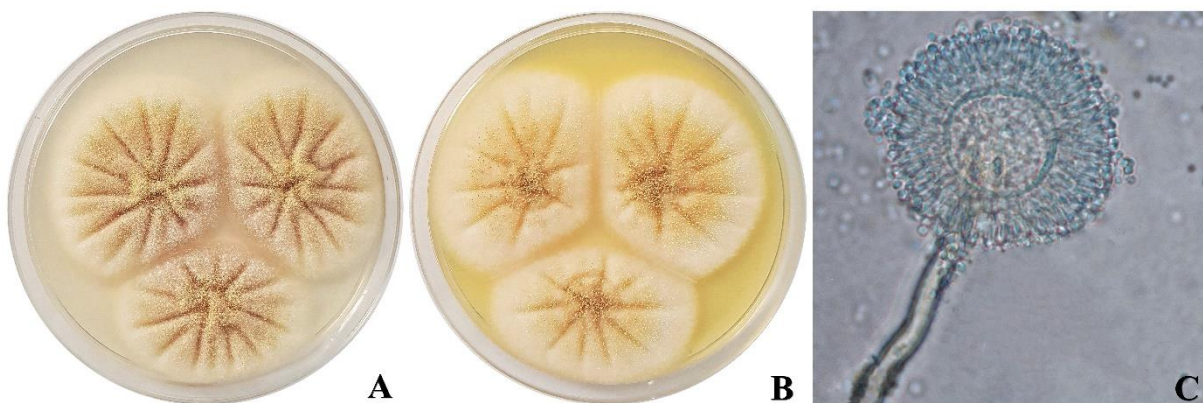
Prema dostupnoj literaturi, toksinogeni potencijal vrsta sekcije *Versicolores* dosad nije ispitan u *ex vivo* uvjetima. Ovim radom je prvi put, koliko je poznato, potvrđena proizvodnja sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina unutar sekcije *Versicolores* na BHA podlozi. Vrste sekcije *Versicolores* većim dijelom su identificirane u prošlom desetljeću, tako da je broj

ispitivanja provedenih na njima oskudan. Jurjević i suradnici, koji su identificirali čak 9 novih aspergila ove sekcije, proveli su ispitivanja njihove toksinogenosti na Czapekovm bujonu uz dodatak 20% saharoze (CB20) i bujonu s kvašćevim ekstraktom (engl. *Yeast Extract Broth*, YEB) pri 25°C prema kojima je najpotentniji producent sterigmatocistina bio *A. jensenii* što je naknadno potvrđeno na CYA hranjivoj podlozi pri istoj temperaturi. Zanimljivi su podaci dobiveni za *A. creber* – neki sojevi su pri istim uvjetima u tekućem hranjivom mediju proizvodili i do 2 233 ng/mL sterigmatocistina, a neki tek 11 ng/mL. Premda ovakve razlike u toksinogenom potencijalu mogu proizlaziti iz različitih okolišnih faktora, vjerojatnije je da su one posljedica varijacija unutar vrste, odnosno između sojeva. Premda niti jedna vrsta ove sekcije nije formirala kolonije pri 37°C, niti su sterigmatocistin i/ili 5-metoksisterigmatocistin detektirani u pacijenata s aspergilozom, zbog visoke moći proizvodnje mikotoksina pri sobnoj temperaturi, visoke koncentracije u zraku i prašini radnih i stambenih prostora te *in vitro* dokazane citotoksičnosti njihovih mikotoksina na humanim stanicama pluća, aspergili sekcije *Versicolores* predstavljaju opasnost za ljude koji su im dugoročno izloženi (Kovačević, 2018; Jakšić i sur., 2016; Jurjević i sur., 2013, Jakšić i sur., 2012).

#### 4.2. Morfologija kolonija odabranih *Aspergillus* vrsta na hranjivim podlogama CYA i BHA

Za opis kolonija korištene su oznake koje odgovaraju bojama iz Raynerove mikološke tablice boje (Rayner, 1970); oznake boja su prikazane brojevima u zagradi.

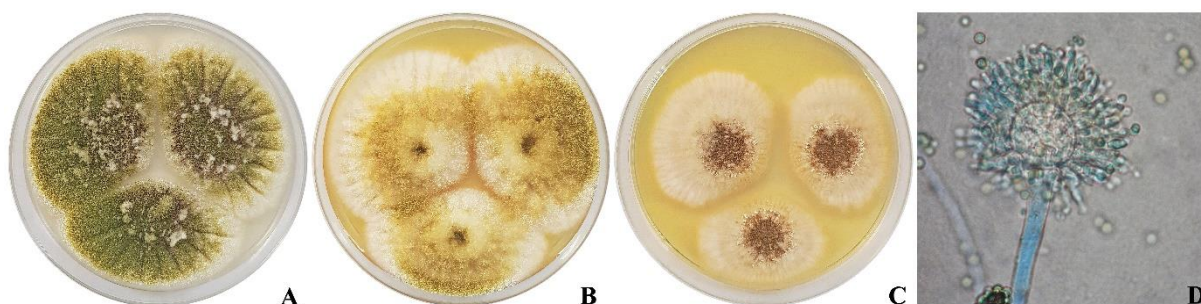
Vrsta *A. westerdijkiae* iz sekcije *Circumdati* raste na hranjivim podlogama CYA i BHA pri temperaturi od 25°C. Rast kolonija nije opažen na hranjivoj podlogi BHA pri temperaturi od 37°C. Na obje hranjive podloge, *A. westerdijkiae* formira brzorastuće kolonije svijetlo bež boje (45) sa vidljivim žućkastim (11) konidijama. Tekstura kolonija je baršunasta. Promjeri kolonija iznose 34-53 mm za CYA (Slika 7, A) te 38-52 mm za BHA (Slika 7, B). Kondiofor ove vrste porasle na BHA hranjivoj podlozi ne razlikuje se od konidiofora vrste porasle na CYA hranjivoj podlozi opisanog u literaturi (Samson i sur., 2010). Vezikule su velike i okrugle, okružene cilindričnim metulama i krušolikim fjalidama (Slika 7, C).



**Slika 7.** Morfologija kolonija *A. westerdijkiae* iz sekcije *Circumdati* nakon 7 dana uzgoja pri 25°C na hranjivim podlogama CYA (A) i BHA (B). Mikromorfologija kondijalne glavice nakon 7 dana uzgoja pri 25°C na hranjivoj podlozi BHA (C).

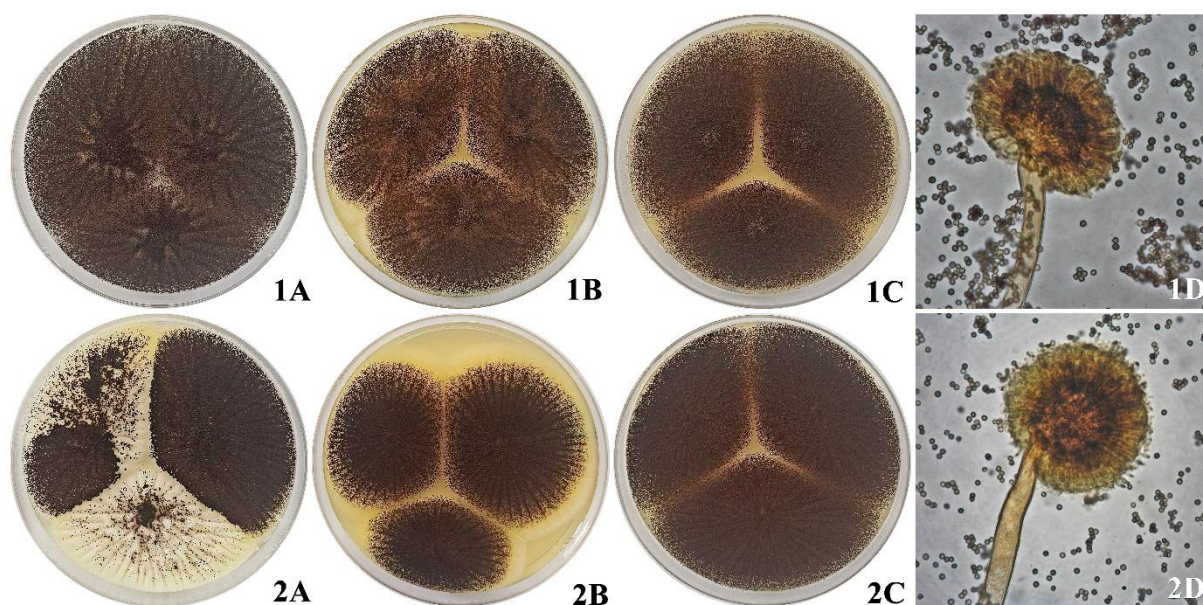
Vrsta *A. flavus* iz sekcije *Flavi* raste na hranjivoj podlozi CYA pri temperaturi od 25°C i na hranjivoj podlozi BHA pri temperaturama od 25°C i 37°C. Na obje hranjive podloge i pri obje temperature, *A. flavus* formira brzorastuće kolonije promjera 38-63 mm za CYA (Slika 8, A), 35-64 mm za BHA pri 25°C (Slika 8, B) te 32-47 mm za BHA pri 37°C (Slika 8, C). Kolonije porasle na CYA bijelog su sklerocija kojeg zaklanja velika količina intenzivno zelenih (17) konidija. Tekstura kolonija je baršunasta s nakupinama nalik na pamuk smještenim oko središta kolonije. Kolonije porasle na BHA pri 25°C imaju žućkasto-zelene (13) konidije, a kolonije porasle na BHA pri 37°C imaju tamnosmeđe (63) konidije smještene tek oko središta. Tekstura kolonija je baršunasta. Kondiofor ove vrste porasle na BHA hranjivoj podlozi ne

razlikuje se od konidiofora iste vrste porasle na CYA hranjivoj podlozi opisanog u literaturi (Samson i sur., 2010). Vezikule su okrugle i okružene kruškolikim fjalidama na kojima su smještene žućkaste konidije (Slika 8, D).



**Slika 8.** Morfologija kolonija *A. flavus* iz sekcije *Flavi* nakon 7 dana uzgoja pri 25°C na hranjivoj podlozi CYA (A) i nakon 7 dana uzgoja pri 25°C (B) i pri 37°C (C) na hranjivoj podlozi BHA. Mikromorfologija konidijalne glavice nakon 7 dana uzgoja pri 25°C na hranjivoj podlozi BHA (D).

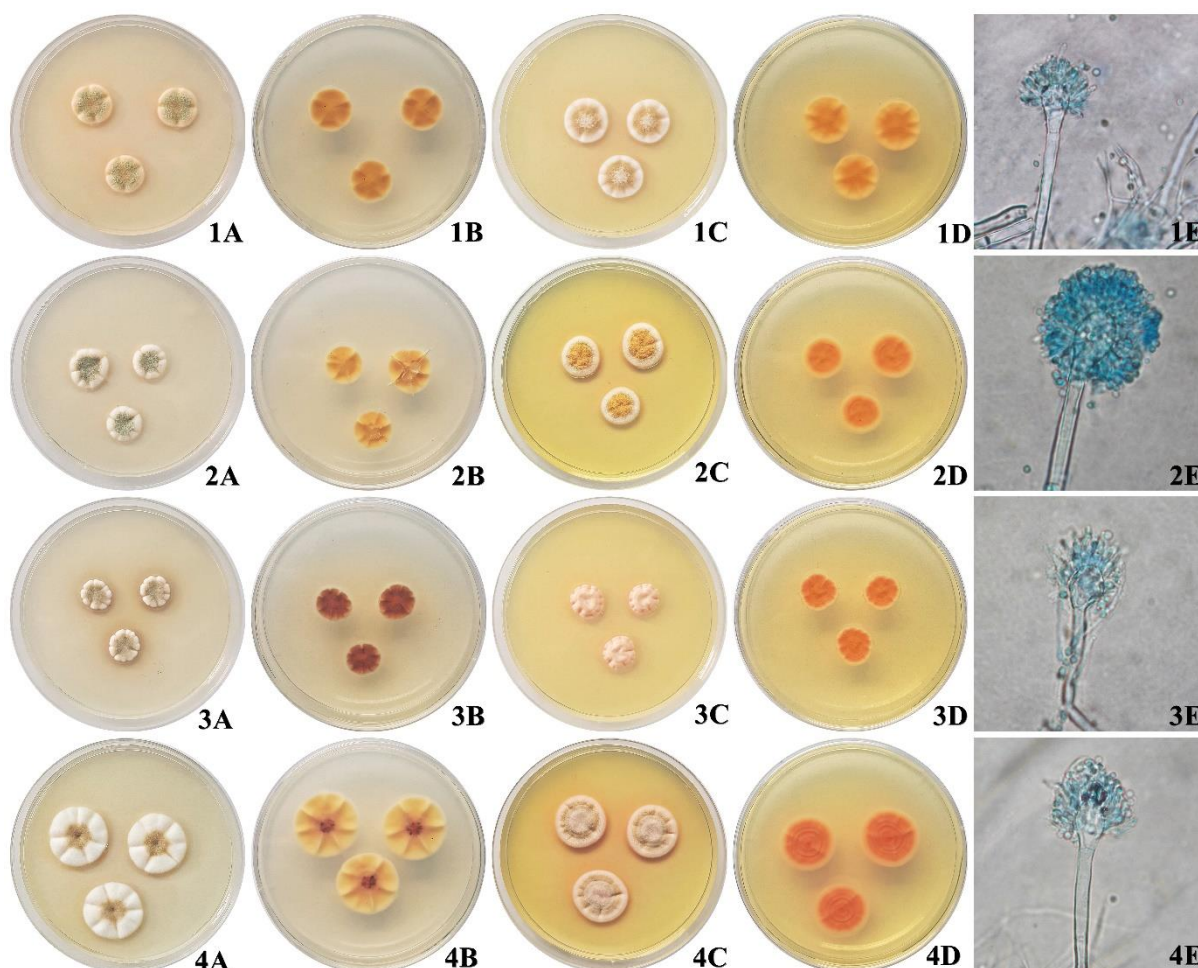
Vrste sekcije *Nigri*, *A. welwitschiae* i *A. niger*, rastu na hranjivoj podlozi CYA pri 25°C i na hranjivoj podlozi BHA pri 25°C i pri 37°C. *A. welwitschiae* na obje hranjive podloge pri obje temperature formira brzorastuće kolonije žućkasto bijelog (46) sklerocija prekrivenog velikim brojem tamnosmeđih (63) do crnih (104) konidija. Promjeri kolonija iznose 68-76 mm za CYA (Slika 9, 1A), 60-65 mm za BHA pri 25°C (Slika 9, 1B) te 65-67 mm za BHA pri 37°C (Slika 9, 1C). Konidijalne glavice su velike, vezikula ovalna i okružena cilindričnim metulama i fjalidama. *A. niger* na obje hranjive podloge pri obje temperature formira kolonije žućkasto bijelog (46) sklerocija prekrivenog tamnosmeđim (63) do crnim (104) konidijama. Promjeri kolonija iznose 64-71 mm za CYA (Slika 9, 2A), 56-64 mm za BHA pri 25°C (Slika 9, 2B) i 64-73 mm za BHA pri 37°C (Slika 9, 2C). Konidijalne glavice su velike, vezikula okrugla i okružena cilindričnim metulama i fjalidama. Konidiofori vrsta poraslih na BHA hranjivoj podlozi ne razlikuju se od konidiofora vrsta poraslih na CYA hranjivoj podlozi opisanih u literaturi (Perrone i sur., 2011; Samson i sur., 2010).



**Slika 9.** Morfologija kolonija *Aspergillus* vrsta iz sekcije *Nigri*: *A. niger* (1) i *A. welwitschiae* (2) nakon 7 dana uzgoja pri 25°C na hranjivim podlogama CYA (1A i 2A) i BHA (1B i 2B) i pri 37°C na hranjivoj podlozi BHA (1C i 2C). Mikromorfologija konidijalnih glavica nakon 7 dana uzgoja pri 25°C na hranjivoj podlozi BHA (1D i 2D).

Vrste sekcije *Versicolores*, *A. creber*, *A. puulaauensis*, *A. jensenii* i *A. griseoaurantiacus*, rastu na obje hranjive podloge pri temperaturi od 25°C. Rast kolonija nije opažen na BHA hranjivoj podlozi pri temperaturi od 37°C. Sve vrste ove sekcije formiraju spororastuće kolonije na obje hranjive podloge. *A. creber* stvara baršunaste kolonije bež (46) i maslinasto zelene (89) boje na CYA podlozi, dok na BHA stvara kolonije sličnog izgleda, no nešto šireg bijelog ruba sa sitnim paučinastim nakupinama u središtu. Promjeri kolonija iznose 16-17 mm za CYA (Slika 10, 1A i 1B) te 16-20 mm za BHA (Slika 10, 1C i 1D). Konidijalna glavica je relativno malena, kruškolikog oblika s cilindričnim metulama i fijalidama (Slika 10, 1D). Kondiofor ove vrste porasle na BHA podlozi ne razlikuje se od konidiofora iste vrste porasle na CYA podlozi opisanog u literaturi (Jurjević i sur., 2012). *A. puulaauensis* stvara baršunaste kolonije ispupčenog ruba bež boje (46) i maslinasto zelenog (89) središta na CYA podlozi, dok na BHA podlozi stvara kolonije bijele i narančaste (12) boje. Promjeri kolonija iznose 14-18 mm za CYA (Slika 10, 2A i 2B) te 16-18 mm za BHA (Slika 10, 2C i 2D). Konidijalna glavica je relativno malena, vezikula kruškolika i okružena brojnim metulama i fijalidama. Kondiofor ove vrste porasle na BHA podlozi ne razlikuje se od konidiofora iste vrste porasle na CYA podlozi opisanog u literaturi (Jurjević i sur., 2012). *A. jensenii* stvara kolonije uskog bijelog ruba i maslinasto zelenog (89) središta, tamnocrvenog (39) naličja na CYA podlozi, dok na BHA podlozi stvara kolonije koncentričnih krugova među kojima se

izmjenjuju krugovi svijetlo ružičaste (37) i bijele boje; naličje kolonije je zagasito narančasto (42). Promjeri kolonija su 12-14 mm za CYA (Slika 10, 3A i 3B) te 13-16 mm za BHA (Slika 10, 3C i 3D). Konidijalna glavica je mala, ovalne vezikule okružene manjim brojem metula i kruškolikih fjalida. Konidiofor ove vrste porasle na BHA podlozi ne razlikuje se od konidiofora iste vrste porasle na CYA podlozi opisane u literaturi (Jurjević i sur., 2012). *A. griseoaurantiacus* stvara kolonije širokog bijelog ruba i oker (87) središta, naličja svijetlo narančaste (41) do tamnocrvene (39) boje na CYA podlozi, dok na BHA podlozi stvara kolonije uskog bijelog ruba i sivkastog (108) središta te zagasito narančastog (42) naličja. Promjeri kolonija iznose 24 mm za CYA (Slika 10, 4A i 4B) i 24-26 mm za BHA (Slika 10, 4C i 4D). Konidijalna glavica je malena, a vezikula ovalna te okružena manjim brojem kruškolikih fjalida. Konidiofor ove vrste porasle na BHA podlozi ne razlikuje se od konidiofora iste vrste porasle na CYA opisane u literaturi (Visagie i sur., 2014).



**Slika 10.** Morfologija kolonija *Aspergillus* vrsta iz sekcije *Versicolores*: *A. creber* (1), *A. puulaauensis* (2), *A. jensenii* (3) i *A. griseoaurantiacus* (4) nakon 7 dana uzgoja pri 25°C na hranjivim podlogama CYA (1A i 1B, 2A i 2B, 3A i 3B, 4A i 4B) i BHA (1C i 1D, 2C i 2D, 3C i

*3D, 4C i 4D). Mikromorfologija konidijalnih glavica nakon 7 dana uzgoja pri 25°C na hranjivoj podlozi BHA (1E, 2E, 3E i 4E).*



## 5. ZAKLJUČCI

- Od 8 inokuliranih izolata sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* na BHA hranjivu podlogu, svi su formirali kolonije pri temperaturi od 25°C, dok su pri temperaturi od 37°C, porasla samo 3 izolata – *A. flavus*, *A. welwitschiae* i *A. niger*.
- Aflatoksin B<sub>1</sub> nije detektiran u ekstraktima *A. flavus*.
- Fumonizin B<sub>2</sub> detektiran je u ekstraktima sekcije *Nigri* pri 25°C u koncentraciji od 3,12 µg/mL za *A. welwitschiae* i 0,12 µg/mL za *A. niger*, no nije detektiran u ekstraktima sekcije *Nigri* pri 37°C.
- Okratoksin A detektiran je u ekstraktu *A. westerdijkiae* u koncentraciji od 27,78 µg/mL, no nije detektiran u ekstraktima vrsta sekcije *Nigri*.
- Sterigmatocistin je detektiran u ekstraktima sekcije *Versicolores* u koncentraciji od 0,59 µg/mL za *A. creber*, 112,96 µg/mL za *A. puulaauensis* i 73,92 µg/mL za *A. griseoaurantiacus*.
- 5-metoksisterigmatocistin je detektiran u ekstraktima sekcije *Versicolores* u koncentraciji od 42,79 µg/mL za *A. creber*, 98,82 µg/mL za *A. puulaauensis* i 48,18 µg/mL za *A. jensenii*.
- Postoje značajne razlike u izgledu kolonija *A. flavus* i *Aspergila* sekcije *Versicolores* između BHA hranjive podloge i CYA hranjive podloge.
- Nema mikromorfoloških razlika između iste vrste *Aspergila* poraslih na BHA hranjivoj podlozi i CYA hranjivoj podlozi.
- Budući da niti jedna ispitana vrsta *Aspergila* nije rasla i/ili proizvela mikotoksine pri tjelesnoj temperaturi čovjeka, aflatoksin B<sub>1</sub>, fumonizin B<sub>2</sub>, okratoksin A, sterigmatocistin i 5-metoksisterigmatocistin vjerojatno nisu potencijalni faktori virulencije *Aspergila*.

## 6. LITERATURA

- Andersen B, Frisvad JC, Sondergaard I, Rasmussen IB, Larsen L. Associations between fungal species and water-damaged building materials. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77, 4180–4188.
- Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*, 2003, 16, 497-516.
- Bills GF, Gloer JB. Biologically active secondary metabolites from the fungi. *Microbiol Spectr*, 2016, 4, 1-32.
- Bok JW, Balajee S, Marr KA, Andes D, Nielsen KF, Frisvad JC, Keller NP. LaeA, a regulator of morphogenetic fungal virulence factors. *Eukaryot Cell*, 2005, 4, 1574-1582.
- Brera C, Caputi R, Miraglia M, Iavicoli I, Salerno A, Carelli G. Exposure assessment to mycotoxins in workplaces: aflatoxins and ochratoxin A occurrence in airborne dusts and human sera. *Microchem J*, 2002, 73, 167-173.
- Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner T. Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology. New York, 2016, McGraw-Hill Medical, str. 690.
- EFSA-CONTAM. Scientific opinion on the risk for public and animal health related to the presence of sterigmatocystin in food and feed. *EFSA J*, 2013, 11.
- Fanelli F, Schmidt-Heydt M, Haidukowski M, Geisen R, Logrieco A, Mule G. Influence of light on growth, conidiation and the mutual regulation of fumonisin B-2 and ochratoxin A biosynthesis by *Aspergillus niger*. *World Mycotoxin J*, 2012, 5, 169–176.
- Frisvad JC. Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species. *Front Microbiol*, 2014, 5, 773.
- Frisvad JC, Frank JM, Houbraken JAMP, Kuijpen JAPA, Samson RA. New ochratoxin producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Stud Mycol*, 2004, 53, 23-44.
- Frisvad JC, Hubka V, Ezekiel CN, Hong SB, Novakova A, Chen AJ, Arzanlou M, Laren TO, Sklenar F, Mahakamchanakul W, Samson RA, Houbraken J. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Stud Mycol*, 2019, 93, 1-63.

- Guengerich FP, Johnson WW, Shimada T, Ueng YF, Yamazaki H, Langouët S. Activation and detoxication of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Mutat Res*, 1998, 402, 121-128.
- Hayes RB, van Nieuwenhuize JP, Raatgever JW, ten Kate FJ. Aflatoxin exposures in the industrial setting: an epidemiological study of mortality. *Food Chem Toxicol*, 1984, 22, 39-43.
- Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 2007, 153, 1677-1692.
- Hof H. Mycotoxins: pathogenicity factors or virulence factors?. *Mycoses*, 2008, 51. 93-94.
- Huffman J, Gerber R, u L. Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers*, 2010, 93, 764-776.
- Huskić M. Strukturna karakterizacija fumonizina masenom spektrometrijom. Diplomski rad. Zagreb, 2018.
- Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC. TP53 mutations an hepatocellular carcinoma: insights into ethiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene*, 2007, 26, 2166-2176.
- IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, 1993, IARC Press.
- IARC. Traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, 2002, IARC Press.
- IARC. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: chemical agents and related occupations. A review of human carcinogens. Lyon, 2012, IARC Press.
- Jakšić D, Kocsubé S, Bencsik O, Kesckeméti A, Szekeres A, Jelić D, Kopjar N, Vagvölgyi C, Varga J, Šegvić Klarić M. Aflatoxin production and in vitro toxicity of *Aspergilli* section *Flavi* isolated from air samples collected from different environments. *Mycotoxin Res*, 2019 (u printu).

- Jakšić D, Kocsubé S, Bencsik O, Kecsckeméti A, Szekeres A, Jelić D, Kopjar N, Vagvölgyi C, Varga J, Šegvić Klarić M. Fumonisin production and toxic capacity in airborne black *Aspergilli*. *Toxicol In Vitro*, 2018, 53, 160-171.
- Jakšić D, Puel O, Canlet C, Kopjar N, Kosalec I, Šegvić Klarić M. Cytotoxicity and genotoxicity of versicolorins and 5-methoxysterigmatocystin in A549 cells. *Arch Toxicol*, 2012, 86, 1583-1591.
- Jakšić Despot D, Kocsubé S, Bencsik O, Kecsckeméti A, Szekeres A, Vágvölgyi C, Varga J, Šegvić Klarić M. New sterigmatocystin-producing species of *Aspergillus* section *Versicolores* from indoor air in Croatia. *Mycol Progress*, 2017, 16, 63-72.
- Jakšić Despot D, Kocsubé S, Bencsik O, Kecsckeméti A, Szekeres A, Vágvölgyi C, Varga J, Šegvić Klarić M. Species diversity and cytotoxic potency of airborne sterigmatocystin-producing *Aspergilli* from the section *Versicolores*. *Sci Total Environ*, 2016, 562, 296-304.
- Jakšić Despot D, Šegvić Klarić M. A year-round investigation of indoor airborne fungi in Croatia. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2014, 65, 209-218.
- Jurjević Ž, Peterson SW, Horn BW. *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus sequence based phylogeny. *IMA Fungus*, 2012, 3, 59-79.
- Jurjević Ž, Peterson SW, Solfrizzo M, Peraica M. Sterigmatocystin production by nine newly described *Aspergillus versicolores* species grown on two different media. *Mycotoxin Res*, 2013, 29, 141-145.
- Kelly JD, Eaton DL, Guengerich FP, Coulombe RA Jr. Aflatoxin B<sub>1</sub> activation in human lung. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1997, 144, 88-95.
- Klich MA. Health effects of *Aspergillus* in food and air. *Toxicol Ind Health*, 2009, 25, 657-667.
- Klich MA, Tang S, Denning DW. Aflatoxin and ochratoxin production by *Aspergillus* species under ex vivo conditions. *Mycopathologia*, 2009, 168, 185-191.
- Kovačević I. Bioraznolikost aspergila sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* u prašini nakon poplave. Zagreb, 2018.

- Lewis RE, Wiederhold NP, hi J, Han XY, Komanduri KV, Kontoyiannis DP, Prince RA. Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis. *Infect Immun*, 2005, 73, 635-637.
- Malir F, Ostry V, Pfohl-Leszkowicz A, Malir J, Toman J. Ochratoxin A: 50 Years of Research. *Toxins*, 2016, 8, 191.
- Marasas WF, Riley RT, Hendricks KA, Stevens VL, Sadler TW, Gelineau-van Waes J, Missmer SA, Cabrera J, Torres O, Gelderblom WC, Allegood J, Martinez C, Maddox J, Miller JD, Starr L, Sullards MC, Roman AV, Voss KA, Wang E, Merrill AH Jr. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *J Nutr*, 2004, 134, 711-716.
- Månsson M, Klejnstrup ML, Phipps RK, Nielsen KF, Frisvad JC, Gotfredsen CH, Larsen TO. Isolation and NMR characterization of fumonisin B<sub>2</sub> and a new fumonisin B<sub>6</sub> from *Aspergillus niger*. *J Agric Food Chem*, 2010, 58, 949-953.
- Merrill Jr AH, Sullards MC, Wang E, Voss KA, Riley RT. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ Health Perspect*, 2001, 109, 283-289.
- Mogensen JM, Frisvad JC, Thrane U, Nielsen KF. Production of fumonisins B<sub>2</sub> i B<sub>4</sub> by *Aspergillus niger* on grapes and raisins. *J Agric Food Chem*, 2010, 58, 954-958.
- Mogensen JM, Frisvad JC, Nielsen KF, Samson RA. Effect of temperature and water activity on the production of fumonisins by *Aspergillus niger* and different *Fusarium* species. *BMC Microbiol*, 2009, 9, 281.
- Passamani FR, Hernandez T, Lopes NA, Bastos SC, Santiago WD, Cardoso MDG, Batista LR. Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian grapes. *J Food Prot*, 2014, 77, 1947–1952.
- Perrone G, Stea G, Epifani F, Varga J, Frisvad JC, Samson RA. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biol*, 2011, 115, 1138-1150.

- Popčević M. Optimizacija HPLC-DAD-MS metode za analizu sterigmatocistina i 5-metoksisterigmatocistina. Diplomski rad. Zagreb, 2017.
- Proctor RH, Plattner RD, Desjardins AE, Busman M, Butchko RAE. Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: Genetic basis of naturally occurring chemical variation. *J Agric Food Chem*, 2006, 54, 2424-2430.
- Rank C, Nielsen KF, Larsen TO, Varga J, Samson RA, Frisvad JC. Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biology*, 2011, 115, 406-420.
- Rayner RW. A Mycological Colour Chart. Kew, Surrey, Commonwealth Mycological Institute, England, British Mycological Society, 1970.
- Reverberi M, Punelli F, Scarpari M, Camera E, Zjalic S, Ricelli A, Fanelli C, Fabbri AA. Liperoxidation affects ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus* and its interaction with wheat seeds. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85, 1935–1946.
- Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B. Food and indoor fungi. CBS laboratory manual series, 2010.
- Selim MI, Juchems AM, Pependorf W. Assessing airborne aflatoxin B1 during on-farm grain handling activities. *Am Ind Hyg Assoc J*, 1998, 59, 252-256.
- Smedsgaard J. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. *J Chromatogr A*, 1997, 760, 264-270.
- Teren J, Varga J, Hamari Z, Rinyu E, Kevei F. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*, 1996, 134, 171-176.
- Varga J, Frisvad JC, Kocsubé S, Brankovics B, Tóth B, Szigeti G, Samson RA, Varga A, Frisvad A. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*: Extrolite analysis. *Stud Mycol*, 2011, 69, 1-17.
- Varga J, Frisvad JC, Samson RA. A reappraisal of fungi producing aflatoxins. *World Mycotoxin J*, 2009, 2, 263-277.
- Varga J, Kocsubé S, Suri K, Szigeti G, Szekeres A, Varga M, Tóth B, Bartók T. Fumonisin contamination and fumonisin producing black *Aspergilli* in dried vine fruits of different origin. *Int J Food Microbiol*, 2010, 143, 143-149.

- Veršilovskis A, De Saeger S. Sterigmatocystin: occurrence in foodstuffs and analytical methods - an overview. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54, 136-147.
- Visagie CM, Hirooka Y, Tanney JB, Whitfield E, Mwangi K, Meijer M, Amend AS, Seifert KA, Samson RA. Aspergillus, Penicillium and Talaromyces isolated from house dust samples collected around the world. *Stud Mycol*, 2014, 78, 63-139.
- Visagie CM, Varga J, Houbraken J, Meijer M, Koscsube S, Yilmaz N, Fotadar R, Seifert KA, Frisvad JC, Samson RA. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (Aspergillus section Circumdati). *Stud Mycol*, 2014, 78, 1-61.
- Voss KA, Smith GA, Haschek WM. Fumonisin: Toxokinetics, mechanism of action and toxicity. *Anim Feed Sci Technol*, 2007, 137, 299-325.
- Williams, JH, Phillips, TD, Jolly, PE, Stiles, JK, Jolly, CM, Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr*, 2004, 80, 1106-22.
- Yu J. Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective on reducing aflatoxin contamination. *Toxins*, 2012, 4, 1024-1057.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Plijesni roda *Aspergillus* predstavljaju prijetnju čovjekovom zdravlju jer se inhalacija njihovih konidija i dijelova micelija povezuje s nizom različitih patoloških stanja respiratornog sustava. Aspergili su producenti velikog broja mikotoksina, sekundarnih metabolita koji djeluju karcinogeno, hepatotoksično, nefrotoksično i imunotoksično, a mogli bi biti odgovorni za egzacerbaciju simptoma aspergiloza budući da su detektirani i u tjelesnim tekućinama oboljelih. Kako bi se ispitala uloga mikotoksina u virulenciji aspergila, osam vrsta aspergila iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* inokulirano je na *Brain Heart Agar* (BHA) hranjivu podlogu, koja oponaša uvjete u čovjekovim tkivima, uz dodatak saharoze u koncentraciji od 4 g/L pri temperaturama od 25°C i 37°C, nakon čega je uslijedila mikotoksinska ekstrakcija iz čistih kultura plijesni. Kvalitativna i kvantitativna analiza ekstrakata vršena je vezanim sustavom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije. Od osam izolata, tek su tri formirala kolonije pri 37°C, no niti jedan nije producirao ciljne mikotoksine na čovjekovoj tjelesnoj temperaturi zbog čega je malo vjerojatno da su aflatoxin B<sub>1</sub>, fumonizin B<sub>2</sub>, okratoksin A, sterigmatocistin i 5-metoksisterigmatocistin faktori virulencije aspergila.

*Aspergillus* species represent a threat to the human health due to the association of the inhalation of their conidia and mycellium parts with several pathological conditions of the respiratory system. They produce a large number of mycotoxins, secondary metabolites with carcinogenic, hepatotoxic, nephrotoxic and immunotoxic effects, that could be responsible for exacerbation of symptoms of aspergillosis as they have been detected in the body fluids of patients suffering from this group of diseases. In order to determine the role of mycotoxins in the *Aspergillus* virulence, eight species from the sections *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* and *Versicolores* was inoculated on the brain heart infusion agar (BHA), growth medium which imitates human tissues, with the addition of 4 g/L succrose at 25 and 37°C. Analysis of the mycotoxin extracts was performed with a coupled high performance liquid chromatography-mass spectrometry system. Out of eight isolates, only three formed colonies at 37°C, but not one produced the expected mycotoxins at the human body temperature. This leads to conclusion that aflatoxin B<sub>1</sub>, fumonisin B<sub>2</sub>, ochratoxin A, sterigmatocystin and 5-methoxysterigmatocystin are not virulence factors of the *Aspergillus* species



## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za mikrobiologiju  
Schrottova 39/I. kat, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### TVORBA MIKOTOKSINA ASPERGILA U UVJETIMA *EX VIVO*

Ana Akrap

#### SAŽETAK

Plijesni roda *Aspergillus* predstavljaju prijetnju čovjekovom zdravlju jer se inhalacija njihovih konidija i dijelova micelija povezuje s nizom različitih patoloških stanja respiratornog sustava. *Aspergilli* su producenti velikog broja mikotoksina, sekundarnih metabolita koji djeluju karcinogeno, hepatotoksično, nefrotoksično i imunotoksično, a mogli bi biti odgovorni za ezgarcebaciju simpetoma budući da su detektirani i u tjelesnim tekućinama oboljelih od aspergiloza. Kako bi se ispitala uloga mikotoksina u virulenciji aspergila, odnosno sposobnost njihove biosinteze *in situ*, osam vrsta iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* inokulirano je na *Brain Heart Agar* (BHA), hranjivu podlogu koja oponaša uvjete u ljudskim tkivima, uz dodatak saharoze u koncentraciji od 4 g/L pri temperaturama od 25°C i 37°C. Ekstrakti mikotoksina iz čistih kultura plijesni analizirani su vezanim sustavom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije. Od osam izolata, tek su tri formirala kolonije pri 37°C, no niti jedan nije producirao mikotoksine na čovjekovoj tjelesnoj temperaturi zbog čega je malo vjerojatno da su aflatoksin B<sub>1</sub>, fumonizin B<sub>2</sub>, okratoksin A, sterigmatocistin i 5-metoksisterigmatocistin faktori virulencije aspergila.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 36 stranica, 10 grafičkih prikaza, 3 tablice i 60 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: BHA, aflatoksini, fumonizini, okratoksin A, sterigmatocistin, *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri*, *Versicolores*

Mentor: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Irena Brčić Karačonji**, viši znanstveni suradnik Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

Rad prihvaćen: srpanj 2019.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Microbiology  
Schrottova 39/1st floor, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### MYCOTOXIN PRODUCTION BY *ASPERGILLUS* SPECIES UNDER *EX VIVO* CONDITIONS

**Ana Akrap**

#### SUMMARY

*Aspergillus* species represent a threat to the human health due to the association of the inhalation of their conidia and mycellium parts with several pathological conditions of the respiratory system. They produce a large number of mycotoxins, secondary metabolites with carcinogenic, hepatotoxic, nephrotoxic and immunotoxic effects, that could be responsible for exacerbation of symptoms of aspergillosis as they have been detected in the body fluids of patients suffering from this group of diseases. In order to determine the role of mycotoxins in the *Aspergillus* virulence, eight species from the sections *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* and *Versicolores* was inoculated on the brain heart infusion agar (BHA), growth medium which imitates human tissues, with the addition of 4 g/L succrose at 25 and 37°C. Analysis of the mycotoxin extracts was performed with a coupled high performance liquid chromatography-mass spectrometry system. Out of eight isolates, only three formed colonies at 37°C, but not one produced the expected mycotoxins at the human body temperature. This leads to conclusion that aflatoxin B<sub>1</sub>, fumonisin B<sub>2</sub>, ochratoxin A, sterigmatocystin and 5-methoxysterigmatocystin are not virulence factors of the *Aspergillus* species.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 36 pages, 10 figures, 3 tables and 60 references. Original is in Croatian language.

Keywords: BHA, aflatoxins, fumonisins, ochratoxin A, sterigmatocystin, *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri*, *Versicolores*

Mentor: **Maja Šegvić Klarić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Maja Šegvić Klarić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Irena Brčić Karačonji, Ph.D.** Senior Scientific Associate, Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb

The thesis was accepted: July 2019.