

# Plijesni u prašini i žitaricama nakon poplave u Gunji

---

Šmalcelj, Filip

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:163:311230>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



**Filip Šmalcelj**

**Plijesni u prašini i žitaricama  
nakon poplave u Gunji**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Mikrobiologija s parazitologijom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za mikrobiologiju pod stručnim vodstvom dr. sc. Daniele Jakšić te je dio znanstveno-istraživačkog projekta (MycotoxA IP-09-2014-5982) kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost (HRZZ).

Zahvalio bih se svima na Zavodu za mikrobiologiju na ugodnoj i prijateljskoj atmosferi. Posebnu zahvalu bih uputio svojoj mentorici dr. sc. Danieli Jakšić, koja me svojim znanjem, vještinama i iskustvom vodila kroz izradu kako praktičnog, tako i pisanog dijela ovog rada. Posebno bih joj se zahvalio na razini strpljenja i razumijevanja koje je pokazala izlazeći mi u susret.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Pregled poplave u svibnju 2014.....	1
1.2. Aktivitet vode i plijesni .....	1
1.3. Plijesni u zatvorenom .....	2
1.4. Utjecaj plijesni na ljudsko zdravlje .....	2
1.5. Rod <i>Aspergillus</i> .....	3
1.5.1. <i>Aspergillus</i> sekcija <i>Circumdati</i> .....	4
1.5.2. <i>Aspergillus</i> sekcija <i>Flavi</i> .....	4
1.5.3. <i>Aspergillus</i> sekcija <i>Nigri</i> .....	5
1.5.4. <i>Aspergillus</i> sekcija <i>Versicolores</i> .....	5
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	7
3. MATERIJALI I METODE .....	8
3.1. Materijali .....	8
3.1.1. Mikološka analiza .....	8
3.1.2. Izolacija genomske DNA.....	9
3.1.3. Lančana reakcija polimeraze (PCR) .....	10
3.1.4. Detekcija DNA gel elektroforezom .....	11
3.2. Metode .....	11
3.2.1. Uzrokovanje .....	11
3.2.2. Mikološka analiza .....	12
3.2.3. Statistička obrada rezultata .....	12
3.2.4. Morfološko raspoznavanje aspergila iz sekcija <i>Circumdati</i> , <i>Flavi</i> , <i>Nigri</i> i <i>Versicolores</i> .....	12
3.2.5. Izolacija genomske DNA .....	13
3.2.6. Elektroforeza DNA .....	14
3.2.7. PCR .....	14
3.2.8. Određivanje slijedova nukleotida PCR produkata i identifikacija aspergila iz sekcija <i>Circumdati</i> , <i>Flavi</i> , <i>Nigri</i> i <i>Versicolores</i> do razine vrste.....	15
4. REZULTATI.....	16
4.1. Analiza uzoraka prašine.....	16
4.1.1. Kvantitativni sastav plijesni u uzorcima prašine.....	16
4.1.2. Kvalitativni sastav plijesni u uzorcima prašine.....	17
4.1.3. Ukupne koncentracije plijesni roda <i>Aspergillus</i> u uzorcima prašine.....	18

4.1.4. Koncentracija aspergila iz sekcija <i>Circumdati</i> , <i>Flavi</i> , <i>Nigri</i> i <i>Versicolores</i> u uzorcima prašine .....	19
4.1.5. Identifikacija aspergila iz sekcija <i>Circumdati</i> , <i>Flavi</i> , <i>Nigri</i> i <i>Versicolores</i> do razine vrste.....	21
4.2. Analiza uzoraka žitarica .....	25
4.2.1. Kvantitativni sastav plijesni u žitaricama .....	25
4.2.2. Kvalitativni sastav plijesni u uzorcima žitarica .....	26
4.2.3. Koncentracije aspergila u žitaricama .....	26
4.2.4. Aspergili iz sekcija <i>Circumdati</i> , <i>Flavi</i> , <i>Nigri</i> i <i>Versicolores</i> u žitaricama.....	27
5. RASPRAVA .....	28
5.1. Plijesni u prašini .....	28
5.2. Plijesni u žitaricama.....	31
6. ZAKLJUČCI.....	32
6.1. Mikološka analiza uzoraka prašine.....	32
6.2. Mikološka analiza žitarica .....	33
7. LITERATURA .....	34
8. SAŽETAK .....	42
9. SUMMARY .....	44
Temeljna dokumentacijska kartica / Basic documentation card.....	

## **1. UVOD**

### **1.1. Pregled poplave u svibnju 2014**

U BiH kroz 10 dana pale su ekstremne količine oborina, od 200 do 250 litara kiše po m<sup>2</sup>, mjestimično i više. Od 14. do 18. svibnja 2014. na hidrološkim postajama donje Save registrirani su najveći vodostaji u povijesti mjerenja. Apsolutno najveći vodostaji na postajama Slavonski Brod, Slavonski Šamac, Županja i Gunja izravna su posljedica ekstremnog dotoka rijeke Drine (procjena protoka Q 4000m<sup>3</sup>/s), Bosne (procjena protoka Q 3500m<sup>3</sup>/s), Vrbasa (procjena protoka Q 2000m<sup>3</sup>/s) i Une (procjena protoka Q 1750m<sup>3</sup>/s) (Abdulaj i sur., 2014). Na ukupno branjenoj dionici savskih nasipa od 214 km (područja Vukovarsko–srijemske i Brodsko–posavske županije), na dva mjesta došlo je u subotu 17. svibnja poslijepodne do gotovo istovremenog prodora nasipa: prvo na području Rajevog Sela, u 14 sati i 55 minuta, a zatim i kod Račinovaca, u 15 sati i 12 minuta, te izlivanja savskih voda u nizinsko zaobalje. Svih 3206 hektara površine općine Gunja je završilo pod vodom. Voda se na tom prostoru zadržala i do nekoliko tjedana, te uzrokovala pogodnu podlogu za razvoj različitih organizama, između ostalog i plijesni (Kratofil, 2014).

### **1.2. Aktivitet vode i plijesni**

Živi organizmi u potpunosti ovise o prisutnosti vode u tekućem stanju. Voda je osnovno otapalo i neophodna je za sve biološke reakcije, stoga udio vode izravno utječe na rast i razmnožavanje mikroorganizama. Reakcije u citoplazmi se odvijaju u vodenom mediju. Citoplazma je okružena membranom dvosmjerno propusnom za slobodne molekule vode. Samo slobodna voda može sudjelovati u reakcijama metabolizma (Adams i Moss, 2008). Ta slobodna voda se mjeri kao aktivitet vode. Aktivitet vode kao fizikalni parametar kvantificira odnos između vlage u hrani i količinu vode s kojom mikroorganizam raspolaže u reakcijama metabolizma (Pitt i Hocking, 1997). Citoplazma je po sastavu vodena otopina stoga ima manji aktivitet vode od destilirane (slatke) vode. Mikroorganizmi u okolišu destilirane (slatke) vode imaju neto pozitivan unos vode u stanicu sve dok se osmotski tlakovi ne izjednače. Nekontroliran ulazak vode će rezultirati prsnućem membrane. Gram-pozitivne bakterije, alge i plijesni imaju staničnu stjenku koja može izdržati 30 atm pritiska, omogućujući im preživljavanje u destiliranoj (slatkoj) vodi (Adams i Moss, 2008). U okolišu niskog aktiviteta vode osmotski tlakovi se izjednačavaju izlaskom vode iz stanice. Metabolička sposobnost mikroorganizma slabi te stanica gubi sposobnost rasta i

razmnožavanja. Kao odgovor na nepovoljne uvjete bakterije proizvode aminokiseline derivate, a plijesni poliole glicerola, arabitola i manitola da bi sačuvali integritet citoplazme (Adams i Moss, 2008). Kvasci i plijesni se u prirodi uglavnom nalaze u kiselijem i sušem okolišu od bakterija, te mogu tolerirati pa čak i rasti pri nižim aktivitetima vode u odnosu na bakterije (Christian, 2000). Za sporulaciju plijesni potreban je veći aktivitet vode nego za klijanje istih spora (Abellana i sur., 1999). Stoga su elementarne nepogode poput poplave idealno plodno tlo za razmnožavanje plijesni. Pri sanaciji štete od poplava prioritet je uništavanje svog organskog otpada da ne bi došlo do širenja potencijalne zaraze (Kuskunović i sur., 2014). Time građevinski materijal ostaje glavni izvor kontaminacije plijesni vodo-oštećenog zatvorenog prostora (Andersen i sur., 2011). Faktor aktiviteta vode je glavni čimbenik koji predviđa kontaminaciju plijesnima. Ovisi o vrsti materijala i temperaturi (Nielsen i sur., 2004). Što je duže aktivitet vode materijala iznad 0,75, veća je šansa pojave plijesni (Viitanen i sur., 2010). Kserofilne plijesni se mogu pojaviti pri aktivitetu vode materijala i od 0,45 (Park, 1982). Jednostavniji način procjene rizika kontaminacije plijesnima je mjerenje relativne vlažnosti zraka (WHO, 2009). Treba napomenuti da aktivitet vode i sadržaj vlage nisu isto (Karolyi, 2004).

### **1.3. Plijesni u zatvorenom**

Plijesni u zatvorenom prostoru je nemoguće u potpunosti ukloniti. Sastavni su dio bioaerosola i kao takve iz vanjskog zraka ulaze u zatvorene prostore (Ponce-Caballer i sur., 2010). Za preživljavanje trebaju samo izvor organskog materijala (najčešće celuloza, prašina) i vlagu, što im omogućava veliku rasprostranjenost i bioraznolikost. Posebnu pažnju treba obratiti na podrum, ventilacijske otvore, praonice rublja, kupaone, te ostala mjesta visoke vlažnosti koje treba održavati provjetrenima. Od materijala treba izdvojiti tekstil kao glavni materijal podložan razvoju plijesni. Tekstil se treba održavati čistim i suhim (Bode i Munson, 1995). Ne postoje usuglašene smjernice sigurnih koncentracija plijesni u zraku za zatvorene prostore. Općenito se smatra sigurnim za zdravlje ljudi ujednačenost sastava bioaerosola u zatvorenom prostoru i vanjskom okolišu ([www.who.int](http://www.who.int)).

### **1.4. Utjecaj plijesni na ljudsko zdravlje**

Plijesni utječu na zdravlje ljudi na više različitih načina. Moguće reakcije se svrstavaju u jednu od tri skupine: reakcije osjetljivosti (npr. alergije), infekcije plijesnima (npr. aspergiloze), i reakcije toksičnosti (npr. mikotoksini) ([www.who.int](http://www.who.int)).

Plijesni se uglavnom povezuju s reakcijama preosjetljivosti tipa I koje su posredovane imunoglobulinom E (IgE). To su nespecifične alergijske reakcije na plijesni, koje u nekim slučajevima mogu dovesti do astme. Neke plijesni, primjerice vrste rodova *Penicillium* i *Aspergillus*, mogu dovesti do reakcija preosjetljivosti tipa III koje su posredovane imunoglobulinom G (IgG), a moguće su i reakcije osjetljivosti kombiniranog tipa (www.who.int).

Ekstrinzični alergijski alveolitis je upalna bolest pluća koja zahvaća distalne dijelove dišnih putova u uvjetima intenzivnog i/ili produženog izlaganja česticama prašine manjim od 5 mikrometara ( $\mu\text{m}$ ). Ako je plijesan sastavni dio prašine, može doći do imunosne reakcije senzibilizacije na antigene plijesni. Svako daljnje izlaganje antigenu dovodi do patološkog stanja koje karakterizira kašalj i simptomi inhalacijske groznice (povišena tjelesna temperatura, bolovi u mišićima, bol u prsima, malaksalost). Produžena izloženost alergenu može dovesti do kroničnog bronhitisa, anoreksije te ireverzibilnog oštećenja pluća (Husain i Kumar, 2005).

Mjesto potencijalne infekcije mogu biti koža i meko tkivo, oči, nos i sinusi, pluća (neinvazivni aspergilom), supkutano tkivo noge i stopala, te kost i/ili mišić (Cortez i sur., 2008). Gljivične neinvazivne bolesti uglavnom uzrokuju upalnu reakciju na mjestu infekcije popraćene bolovima. Ovisno o uzročniku mikoze se liječe antifungalnim lijekovima i/ili operativno (Chandrasekar, 2009). Najčešće invazivne gljivične infekcije su mikoze dišnoga sustava koje se mogu proširiti na ostale dijelove tijela (Singh i Paterson, 2005), a u slučaju zahvaćenosti centralnog živčanog sustava ishod može biti fatalan (Genzen i Kenney, 2009). Mikoze su uglavnom uzrokovane plijesnima roda *Aspergillus* koje čine oko 90 % svih mikoza (Pagano i sur., 2006). U novije vrijeme poseban izazov u liječenju su mikoze izazvane plijesnima roda *Mucor*, osobito kod imunokompromitiranih pacijenata (Paterson i Lima, 2017).

Mikotoksini su heterogena skupina nisko molekularnih sekundarnih metabolita filamentoznih gljivica toksičnog učinka na kralježnjake. Zbog raznolike kemijske strukture te različitog biokemijskog podrijetla teško ih je klasificirati. Kliničari ih dijele prema utjecaju na organe, primjerice hepatotoksični, nefrotoksični, imunotoksični, dok ih stanični biolozi dijele prema utjecaju na stanicu: teratogeni, mutageni, karcinogeni (Bennett i Klich, 2003).

### **1.5. Rod *Aspergillus***

*Aspergillus* je rod koji obuhvaća 344 različitih vrsta plijesni koje su široko rasprostranjene po cijelom svijetu (Samson i sur., 2014). Od posebnog su značaja za zdravlje ljudi, kako zbog



alergijskog potencijala, tako i zbog tvorbe mikotoksina, vrste aspergila iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores*. Konidije i dijelovi micelija ovih vrsta veličinom 2–5 µm često se nalaze u zraku i ljudi ih svakodnevno udišu što može dovesti do inicijacije ili pogoršanja već postojeće bolesti dišnog sustava (Krishnan i sur., 2009).

### **1.5.1. *Aspergillus* sekcija *Circumdati***

*Aspergillus* sekcija *Circumdati* uključuje vrste s biserijskim konidijalnim glavama u žutoj do oker boji (Visagie i sur., 2014). Mnoge vrste te skupine su od ekonomskog značaja. *Aspergillus ochraceus* i *Aspergillus sclerotiorum* se koriste za biokemijsku transformaciju steroida, alkaloida i fenazina (Chen i sur., 1994). *Aspergillus sclerotiorum* i *Aspergillus melleus* su važan izvor proteolitičkih enzima s antifungalnim svojstvima (Matsukuma i sur., 1991) dok *Aspergillus ochraceus* može proizvoditi mikotoksin okratoksin A (OTA) čak i u nestašici nutrijenata (Lai i sur., 1970). OTA je potentni nefrotoksin, a prvi put je izoliran u Južnoafričkoj Republici kao metabolit vrste *Aspergillus ochraceus*. Kontaminacija ovim mikotoksinom je proučena na žitaricama i u mesu (Adams i Moss, 2008). Na našim prostorima posebno je zabilježena akumulacija u svinjskom mesu, a konzumiranje toga mesa kroz duže vrijeme može dovesti do endemske nefropatije (Milićević i sur., 2008). Balkanska endemska nefropatija je jedinstvena kronična bolest nefrona dugog inkubacijskog perioda. Ime joj dolazi od primijećene visoke prevalencije u balkanskim zemljama, a OTA je jedan od etioloških čimbenika (Pavlović, 2013). Osim nefrotoksičnosti, OTA je dokazani imunosupresiv, teratogen i karcinogen (Bui-Klimke i Wu, 2015).

### **1.5.2. *Aspergillus* sekcija *Flavi***

*Aspergillus* sekcija *Flavi* povijesno uključuje vrste s konidijalnim glavama u nijansama žuto-zelene do smeđe, te tamni sklerocij. Ta sekcija je bitna u biotehnologiji hrane i zdravstvenoj industriji (Varga i sur., 2011). Izolati takozvanih pripitomljenih vrsta poput *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae* i *Aspergillus tamarii* se koriste u fermentaciji orijentalne hrane te kao vektori genske ekspresije (Campbell-Platt i Cook, 1989). Genetski modificirani sojevi vrste *Aspergillus oryzae* koriste se za proizvodnju enzima uključujući laktaze, pektin esteraze, lipaze, proteaze i xylanaze (Pariza i Johnson, 2001). Veliki broj sekcije *Flavi* proizvodi mikotoksine poput nitropropionske, tenuazoične i ciklopiazonske kiseline, te aflatoksine, posebno aflatoksin B<sub>1</sub>

(AFB<sub>1</sub>) (Varga i sur., 2011). AFB<sub>1</sub> je otkriven 1962. kada je na farmi purana u istočnoj Engleskoj došlo do pomora preko 100 000 purana. Detektiran je u hrani za purane na temelju plave fluorescencije pod UV svjetlom, a dokazano je da ga proizvodi plijesan *Aspergillus flavus* koja je rasla na hrani za perad (Adams i Moss, 2008). AFB<sub>1</sub> je kancerogen skupine IA prema klasifikaciji Svjetske agencije za istraživanje raka (eng. International Agency for research on Cancer, IARC) (IARC, 1993). Mehanizam toksičnosti je posredovan citokromom P450 koji pretvara aflatoksin u reaktivni 8,9-epoksid, koji se može vezati na proteine i DNA (Bennet i Klich, 2003).

### **1.5.3. *Aspergillus* sekcija *Nigri***

Aspergili iz sekcije *Nigri* još se nazivaju crnim aspergilima koji se lako morfološki raspoznaju po crnim kolonijama, no taksonomsko raspoznavanje unutar sekcije je teže zbog suptilnih razlika između vrsta (Silva i sur., 2011). Crni aspergili su sveprisutni u okolišu te su jedan od najčešćih posrednika u kvarenja hrane (Pitt i Hocking, 1997). Često se koriste u Aziji za proizvodnju fermentirane hrane i pića, osobito vrsta *Aspergillus luchuensis* (Hong i sur., 2013). Crni aspergili se koriste u proizvodnji organskih kiselina, prvenstveno limunske i glukonske kiseline (Adams i Moss, 2008).

Fumozini kao toksični produkti plijesni roda *Fusarium* su proučeni tek 1988. Glavna prepreka u analitici fumozina je bila njihova hidrofilna struktura (Blackwell i sur., 1996). Kada je analitički problem riješen otkrila se njihova sveprisutnost na kukuruzu. Među fumozinima najbolje je istražen fumonizin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) koji je potentni inhibitori ceramid sintetaza, čime interferira u metabolizmu sfingolipida. Učinak na organizam ovisi o životinjskoj vrsti (Adams i Moss, 2008). Kod konja (Marasas i sur., 1988) i zečeva (Bucci i sur., 1966) uzrokuje leukoencefalomaciju, plućni edem i hidrotoraks kod svinja (Harrison i sur., 1990), hepatotoksičnost u jetri štakora (Pozzi i sur., 2001), te potencijalno rak jednjaka u ljudi (Sydenham i sur., 1991). Vrste *A. niger* i *A. welwitschiae* proizvođači su strukturnih analoga FB<sub>1</sub>, primjerice fumonizina B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) (Frisvad i sur., 2007).

### **1.5.4. *Aspergillus* sekcija *Versicolores***

Razvoj molekularnih metoda identifikacije upotrebom različitih genskih markera kao što su Internal transcribed spacer (ITS), beta tubulin (*BenA*) i kalmodulin (*CaM*) omogućio je razlučivanje vrsta unutar ove sekcije (Jurjević i sur., 2012; Peterson, 2008). Aspergili iz ove

sekcije izolirani su iz različitih supstrata, a najviše iz zraka i prašine zatvorenih prostora gdje su najučestalije vrste *A. creber* i *A. jensenii* (Jakšić Despot i sur., 2016; Jurjević i sur., 2012).

Kao glavni sekundarni metabolit aspergila iz sekcije *Versicolores* ističe se sterigmatocistin (STC). Proizvode ga gotovo sve vrste unutar sekcije uključujući *A. amoenus*, *A. creber*, *A. cvjetkovicii*, *A. fructus*, *A. griseoaurantiacus*, *A. jensenii*, *A. pepii*, *A. puulaauensis*, *A. subversicolor*, *A. tennesseensis*, *A. venenatus*, *A. protuberus*, *A. versicolor*, dok *A. austroafricanus* i *A. tabacinus* nisu producenti STC. STC je prekursor u biosintezi aflatoksina, a toksični, mutageni i kancerogeni učinci pokazani su na brojnim staničnim i životinjskim modelima (Jakšić Despot, 2016; Gao i sur., 2015; Bünger i sur., 2004; Sivakumar i sur., 2001). Prema klasifikaciji Svjetske agencije za istraživanje raka (eng. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) STC je potencijalni kancerogen za ljude pa spada u skupinu 2B (IARC, 1993).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Povećana dostupnost vode predstavlja glavni faktor za rast plijesni. Stoga se u građevinama nakon poplave u Gunji očekuje porast kolonija na vlažnim zidovima odakle se putem konidija i dijelova micelija šire zrakom u okoliš, a taloženjem nakupljaju u prašini u zatvorenim prostorima. Plijesni su učestali kontaminanti hrane za ljude i životinje te je za očekivati povećanu koncentraciju plijesni na uskladištenim žitaricama. Obzirom na njihov alergeni, invazivni i toksični potencijal od posebnog javnozdravstvenog interesa su plijesni roda *Aspergillus* iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores*. Kako bi se procijenio rizik za zdravlje ljudi u Gunji specifični ciljevi ovog rada su:

- Odrediti broj i kvalitativni sastav plijesni u prašini i žitaricama u poplavnom pogođenom području i kontrolnom području. Odrediti razliku u zastupljenosti aspergila u prašini/žitaricama u poplavnom pogođenom području i kontrolnom području
- Na temelju morfoloških obilježja i analize nukleotidnih slijedova dijela gena *CaM* do razine vrste identificirati aspergile iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* izoliranih iz uzoraka prašine i žitarica .

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Mikološka analiza

###### 3.1.1.1. Kemikalije i hranjive podloge

- Peptonska voda (Biolife, Italija): pepton 10 g, natrijev klorid (NaCl) 5 g, bezvodni natrijev hidrogenfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 3,5 g, monokalijev fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1,5 g

Praškaste supstance otopljene su u litri destilirane vode uz zagrijavanje do vrenja. Tako priređena otopina sterilizirana je autoklaviranjem ( $121\text{ }^\circ\text{C}$ , 15 min) nakon čega se dodaje polisorbat 80 (Tween 80; Sigma-Aldrich, Njemačka) 1% v/v.

- Dikloran 18% glicerolni agar (DG-18; Oxoid, UK): glukoza 10 g, pepton 5 g, monokalijev fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1 g, magnezijev sulfat heptahidrat ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0,5 g, agar 15 g, glicerol 220 g, dikloran (0,2% w/v u etanolu, 1 mL) 2 mg i kloramfenikol 100 mg.

Praškaste supstance otopljene su u litri destilirane vode uz zagrijavanje do vrenja. Tako priređena otopina sterilizirana je autoklaviranjem ( $121\text{ }^\circ\text{C}$ , 15 min).

- Dikloran-Rose Bengal-kloramfenikolni agar (DRBC; Oxoid, UK): glukoza 10 g, pepton 5 g, monokalijev fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1 g, magnezijev sulfat heptahidrat ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0,5 g, agar 15 g, dikloran (0,2% w/v u etanolu, 1 mL) 2 mg i kloramfenikol 100 mg.

Praškaste supstance otopljene su u litri destilirane vode uz zagrijavanje do vrenja. Tako priređena otopina sterilizirana je autoklaviranjem ( $121\text{ }^\circ\text{C}$ , 15 min) nakon čega je dodan Rose Bengal (5 % w/v u  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 mL) 25 mg.

- Czapek-agar sa kvašćevim ekstraktom (CYA; Difco, SAD): Czapek koncentrat (natrijev nitrat ( $\text{NaNO}_3$ ) 30 g, kalijev klorid (KCl) 5 g, magnezijev sulfat heptahidrat ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) 5 g i željezov sulfat heptahidrat ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0,1 g otopljeni su u 100 mL destilirane vode) 10 mL, otopina elemenata u tragovima (bakrov sulfat pentahidrat ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) 0,5 g i cinkov sulfat heptahidrat ( $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) 1 g otopljeni su u 100 mL destilirane vode) 1 mL, monokalijev fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1 g, kvašćev ekstrakt 5 g, saharoza 30 g i agar 15 g.

Praškaste supstance otopljene su u litri destilirane vode. Tako priređena otopina sterilizirana je autoklaviranjem ( $121\text{ }^\circ\text{C}$ , 15 min).

- Malt-ekstrakt agar (MEA; Oxoid, UK): Malt ekstrakt (Oxoid CM0059) 50 g, cinkov sulfat heptahidrat ( $ZnSO_4 \times 7H_2O$ ) 0,01 g, bakrov sulfat pentahidrat ( $CuSO_4 \times 5H_2O$ ) 0,005 g.

Praškaste supstance otopljene su u litri destilirane vode. Tako priređena otopina sterilizirana je autoklaviranjem (121 °C, 15 min).

### 3.1.1.2. Uredaji

- Autoklav ( $\varnothing$  300 x 500, Sutjeska, Beograd, Srbija)
- Lupa (Stereo Zoom Microscope SZH-ILLD, Olympus, Japan)
- Termostatorana tresilica (Orbital Shaker-Incubator Grant-Bio ES20, Grant Instruments (Cambridge) Ltd., UK)

### 3.1.2. Izolacija genomske DNA

#### 3.1.2.1. Kemikalije i materijali

- Medij za izolaciju DNA: glukoza (10 g/l), pepton (10 g/l) i kvašćev ekstrakt (10 g/l)

Praškaste supstance otopljene su u destiliranoj vodi, a nakon autoklaviranja (121 °C, 15 min) u komori za aseptički rad razdijeljene u mikroepruvete od 1,5 ml.

- Sterilni pijesak
- Otopina za lizu: NucleoSpin® Plant II buffer PL2

PL2 je komercijalna alkoholna otopina bazirana na natrijevom dodecil sulfatu (SDS) kao detergentu.

- RNaza A
- Otopina za precipitaciju: NucleoSpin® Plant II buffer PL3

PL3 je komercijalna alkoholna otopina bazirana na kalijevom acetatu kao sredstvu za taloženje.

- NucleoSpin® Filter (ljubičasti prsten)
- Otopina za vezanje DNA: NucleoSpin® Plant II buffer PC

PC je komercijalni pufer baziran na gvanidin-hidrokloridu i etanolu.

- NucleoSpin® Filter (zeleni prsten)

- Otopina za pročišćavanje DNA: NucleoSpin® Plant II buffer PW1, NucleoSpin® Plant II buffer PW2

PW1 i PW2 su komercijalni puferi bazirani na gvanidin-hidrokloridu i propanolu.

- Otopina za eluciju DNA: NucleoSpin® Plant II buffer PE
- Otopina za taloženje DNA: izopropanol (Kefo d.o.o., Sisak, Hrvatska)
- Otopina za ispiranje DNA: etanol 96 % v/v (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

### **3.1.2.2. Uređaji**

- Centrifuga (Table top Centrifuge Z 326 K, Hermle, LaborTechnik, Njemačka)
- Vortex (IKA® VORTEX 3, Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Termoblok (Eppendorf ThermoMixer® C, Eppendorf, Njemačka)
- Termo-vakuum uparivač (Concentrator Plus, Eppendorf, Njemačka)

### **3.1.3. Lančana reakcija polimeraze (PCR)**

#### **3.1.3.1. Reagensi za PCR**

- Taq reakcijski pufer 10X: 25mM MgCl<sub>2</sub> (Takara Bio SAD)
- Smjesa polinukleotida: dNTP; 2,5mM (Takara Bio SAD)
- Taq DNA polimeraza: 250 U (Takara Bio SAD)
- Voda: čistoće za upotrebu u molekularnoj biologiji, bez nukleaza (Takara Bio SAD)
- F-primer (cmd-5) za umnažanje gena za kalmodulin (CaM): 32,3nmol (Metabion, Njemačka)
- R-primer (cmd-6) za umnažanje gena za kalmodulin (CaM) 28,7nmol (Metabion, Njemačka)
- Serumski albumin goveda (bovine serum albumin, BSA; Sigma-Aldrich, Njemačka)

#### **3.1.3.2. Uređaji**

- Centrifuga (Table top Centrifuge Z 326 K, Hermle, LaborTechnik, Njemačka)
- Vortex (IKA® VORTEX 3, Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Uređaj za PCR (T-100 Thermal Cyclers, BioRad, SAD)

### 3.1.4. Detekcija DNA gel elektroforezom

#### 3.1.4.1. Kemikalije i materijali

- Agarozna (SeaKem<sup>®</sup> LE Agarose, Lonza, SAD)
- TAE pufer 50X: tris baza (40 mM), octena kiselina (20 mM), EDTA (1 mM) u destiliranoj vodi, pH8,3 (AccuGENE 50 X; Lonza, Belgija).

Radna otopina pufera (1X) priređena je razrjeđivanjem destiliranom vodom.

- Pomoćna boja za praćenje elektroforeze; loading buffer 6X (Takara, SAD)
- Fluorescentna boja GelStar 10,000X (Lonza, SAD).

Radna otopina boje priređena je miješanjem s pomoćnom bojom (1:1000). U vodenoj otopini za gel-elektroforezu ukupno razrjeđenje fluorescentne boje je 10000.

#### 3.1.4.2. Uređaji

- Sustav za elektroforezu (Sub-Cell<sup>®</sup> GT Agarose Gel Electrophoresis Systems, BioRad, SAD)
- UV transiluminator (UVITEC, UK)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Uzrokovanje

Uzorci obrađeni u ovom radu dio su znanstveno istraživačkog projekta (Štetni učinci pojedinačnih i kombiniranih mikotoksina *Aspergillus* vrsta-MycotoxA, IP-09-2014-5982, 2016-2020, prof. dr. sc. Maja Šegvić Klarić).

11 uzoraka prašine (10 g – 20 g) prikupljeno je iz poplavnog područja u Gunji u veljači 2017. 5 uzoraka dolazi iz neobnovljenih kuća te 5 iz obnovljenih kuća. Jedan dodatan uzorak je prikupljen u obnovljenoj školi. Prikupljeno je i 6 uzoraka žitarica: 1 crne zobi, 2 kukuruza, 3 pšenice. Također su prikupljeni kontrolni uzorci u Gornjem Stupniku: 6 uzoraka prašine (10 g - 20 g), i to 5 uzoraka iz kuća te 1 iz lokalne škole. Prikupljeno je i 5 uzoraka žitarica: 4 kukuruza, 1 ječam. Do provođenja analize svi uzorci su bili pohranjeni u hermetičke vrećice na -20°C.



### 3.2.2. Mikološka analiza

Vagano je 1 – 2 g uzorka prašine, odnosno 10 g samljevenih žitarica te pomiješano s peptonskom vodom u omjeru 1:10 do 1:30 (matične suspenzije). Suspenzije hrane i prašine homogenizirane su na termostatiranoj tresilici (25 °C, 45 min, 300 o/min). Iz matičnih suspenzija priređen je koncentracijski niz (1:10) tako da je matična suspenzija uzastopno razrijeđena četiri puta (radne suspenzije) te je po 100 µL suspenzije svakog od razrjeđenja ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) raspoređeno na površinu DG-18 i DRBC agara. Tako priređene hranjive podloge inkubirane su na 25 °C u mraku 5 do 7 dana te je na temelju poraslih kolonija određena koncentracija plijesni u prašini odnosno u hrani (CFU/g) prema formuli:

$$N = \frac{\sum C}{V \times (n_1 + 0,1 \times n_2) \times d}$$

N-CFU/g; koncentracija vijabilnih plijesni po gramu prašine

$\sum C$ -suma svih poraslih kolonija na DG-18 ili DRBC na dva uzastopna odgovarajuća razrjeđenja

V-volumen inokuluma (mL) stavljenog na svaku hranjivu podlogu

$n_1$ -broj hranjivih podloga u prvom brojevom razrjeđenju

$n_2$ -broj hranjivih podloga u drugom brojevom razrjeđenju

d-razrjeđenje iz kojeg su dobiveni prvi brojevi

### 3.2.3. Statistička obrada rezultata

Rezultati mikološke analize izraženi su kao srednje vrijednosti koncentracije (CFU/g) plijesni u grupi od interesa (Gunja/Gornji Stupnik). Za svaku skupinu uzoraka izračunata je aritmetička sredina, standardna devijacija, medijan, minimum, maksimum te prvi i treći kvartil.

### 3.2.4. Morfološko raspoznavanje aspergila iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores*

Plijesni porasle na DG-18, odnosno DRBC agaru koje su po makroskopskim obilježjima i mikromorfologiji odgovarale aspergilima iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* izolirane se na hranjive podloge CYA i MEA. Na temelju morfoloških obilježja izolati aspergila porasli na hranjivim podlogama CYA i MEA nakon inkubacije (7 dana, 25 °C) identificirani su do razine sekcije usporedbom s literaturnim podacima (Samson i sur., 2010). Inokulacija na hranjive podloge radila se je u komori steriliziranoj UVC germicidnom lampom, uz upotrebu zaštitnih sredstava (kuta, rukavice, zaštitna maska) uz plamenik. Izolirani aspergili iz sekcija

*Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* pohranjeni su u zbirku mikrobnih kultura Zavoda za mikrobiologiju, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta te su korišteni u daljnoj analizi.

### **3.2.5. Izolacija genomske DNA**

Iz poraslih kultura prikupljenih izolata aspergila iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* (CYA, 25 °C, 7 dana) provedena je inokulacija u 1 ml medija za izolaciju DNA uz inkubaciju na 25 °C, 2–3 dana. Izolacija genomske DNA provedena je iz porasloga micelija upotrebom komercijalnog seta NucleoSpin® Plant II na sljedeći način:

1. Micelij je centrifugiranjem (11000 g, 10 min) odvojen od tekućeg medija koji je odbačen.
2. Staničnom talogu dodano je 300 µl otopine za lizu (NucleoSpin® Plant II buffer PL2) uz 10 µl RNase A. Kako bi se poboljšala liza staničnih struktura smjesi je dodano malo sterilnoga pijeska (otprilike 1 mg) te je suspenzija homogenizirana uz pomoć mikropistila, a potom inkubirana 20 min na 65 °C u termobloku.
3. Nakon hlađenja suspenzije dodano je 100 µL otopine za precipitaciju proteina i staničnoga otpada (NucleoSpin® Plant II buffer PL3). Smjesa je dobro promiješana na automatskoj miješalici (vorteksu) te inkubirana 5 min u zamrzivaču (-20 °C)
4. Nakon centrifugiranja (11000 g, 2 min) proteini i stanični otpad zadržani su na odgovarajućem filteru (NucleoSpin® Filter), a u čistu mikropipetu prikupljen je filtrat sa genomskom DNA.
5. Genomska DNA izdvojena je iz otopine propuštanjem kroz NucleoSpin® Filter (zeleni prsten) uz dodatak 450 µl kaotropne otopine soli (NucleoSpin® Plant II buffer PC). Postupak je proveden centrifugiranjem (11000 g, 1 min)
6. Pročišćavanje genomske DNA od zaostalih soli provedeno je pročišćavanjem dodatkom 400 µl pufera NucleoSpin® Plant II buffer PW1 uz centrifugiranje (11000 g, 1 min) te 2 ispiranja puferom NucleoSpin® Plant II buffer PW2. Prvo ispiranje provedeno je sa 700 µl (11000 g 1 min), a drugo s 200 µl (11000 g, 2 min). Nakon svakog centrifugiranja filtrati su odbačeni.
7. Pročišćena genomska DNA na filtru, osušena od etanola u rotacijskom vakuum uparivaču (1200 o/min, 10 min), eluirana je u čistu epruvetu. Za eluciju se koristi otopina za eluciju DNA ( NucleoSpin® Plant II buffer PE) uz inkubaciju na 65 °C 5 min, a filtrat s otopljenom genomskom DNA prikuplja se centrifugiranjem (11000 g, 1 min).

### 3.2.6. Elektroforeza DNA

Uspješnost izolacije DNA provjerena je elektroforezom na agarozu (1 %) u TAE puferu (1X):

1. U čiste mikroeprovete pomiješano je 4  $\mu\text{L}$  otopine DNA sa 3  $\mu\text{L}$  radne otopine boje. Po potrebi su korišteni drugi omjeri.
2. 1 %-tna otopina agaroze pripremljena je u TAE puferu (1X) zagrijavanjem do vrenja te izlijevanjem u kadu za elektroforezu otprilike do visine sredine češljica. Hlađenjem polimerizirani gel prebačen je u kadu za elektroforezu napunjenu puferom malo iznad jažica gela.
3. Jažice su upunjene smjesom DNA/boja, a elektroforeza provedena pri 80 mV, oko 15 min ili do 2/3 duljine gela.
4. DNA se detektira u transiluminatoru osvjetljavanjem gela UV svjetlom (254 nm) na temelju zelene fluorescencije malo ispred jažice.

### 3.2.7. PCR

Upotrebom izoliranih genomskih DNA svakoga od izolata *Aspergila* iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* umnožen je *CaM* upotrebom početnica cmd-5 i cmd-6 u 20  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese (tablica 1). Reakcijski koraci PCR prikazani su u tablici 2.

Tablica 1. Kvantitativni sastav PCR smjese.

Komponente smjese	$\mu\text{L}$ po reakciji
F-primer(cmd-5) 1 $\mu\text{M}$	4
R-primer(cmd-6) 1 $\mu\text{M}$	4
Taq pufer 10 X	2
dNTP mix (1 $\mu\text{M}$ )	4
H <sub>2</sub> O (mol.biol.grade)	4,8
Polimeraza 250 U	0,2
Ukupni volumen	19

Smjesa za PCR nije pripremljena pojedinačno za svaki uzorak, već je unaprijed pripremljen veći volumen ovisno o broju uzoraka. U slučaju uvođenja poboljšivača PCR (npr. BSA, MgCl<sub>2</sub>) potrebno je korigirati volumen vode. U 19  $\mu\text{L}$  PCR smjese dodano je se 1  $\mu\text{L}$  otopine genomske

DNA. Cijeli postupak proveden je u komori za aseptički rad. Reakcija je provedena u termostatiranom uređaju za PCR. Uspješnost PCR reakcije provjerena je gel-elektroforezom na temelju zelene fluorescencije PCR produkata u 2 %-tnoj otopini agaroze miješanjem 2 µl PCR produkta s 3 µl radne otopine boje.

Tablica 2. Reakcijski ciklus PCR za *CaM*.

Reakcijski koraci	Temperatura/ °C	Vrijeme/s	Broj Ciklusa
1. Inicijalna denaturacija DNA	95	300	1
2. Denaturacija DNA	95	20	
3. Vežanje početnica	52	20	
4. Elongacija	72	40	5 (od koraka 2-4)
5. Denaturacija	95	20	
6. Vežanje početnica	56	20	
7. Elongacija	72	40	25 (od koraka 5-7)
8. Završna elongacija	72	300	1

### 3.2.8. Određivanje slijedova nukleotida PCR produkata i identifikacija *Aspergila* iz sekcija *Circumdati, Flavi, Nigri* i *Versicolores* do razine vrste

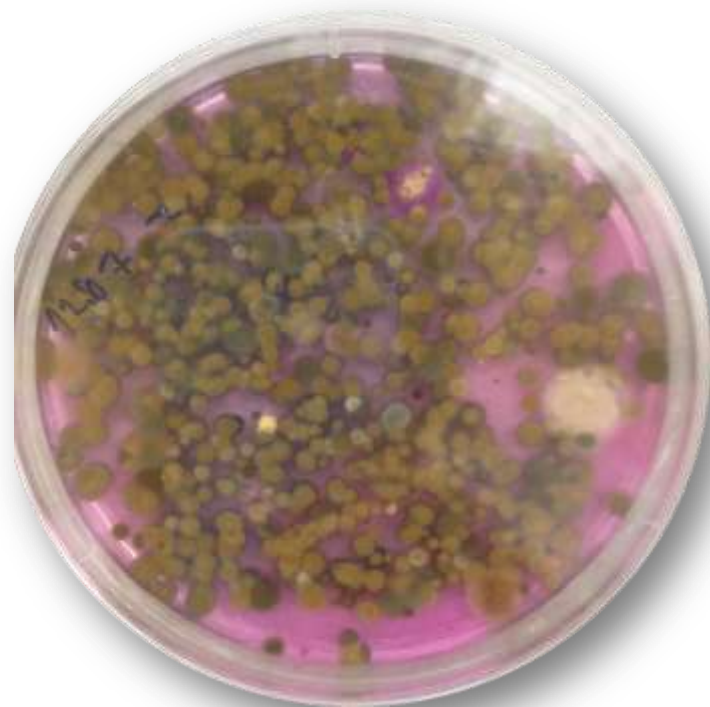
PCR produkti su pročišćeni kroz komercijalne kolone prema uputama proizvođača. Dodatkom kaotropne soli PCR produkti su se vezali za silikagel membranu kolone, dok su ostali sastojci (ostaci dNTP, početnice, dimeri početnica, BSA, i dr.) filtrirani kroz kolonu centrifugiranjem. PCR produkti zadržani na kolonijisprani su etanolom uz centrifugiranje (11000 g, 1 min).. Višak etanola je otparen u rotacijskom vakuum uparivaču, pa su se čisti PCR produkti isprali s kolone upotrebom EDTA pufera (pH 8,5). Određivanje slijedova nukleotida provedeno je u Macrogen Inc. (Amsterdam, Nizozemska). Nukleotidni slijedovi dijela gena za kalmodulin (*CaM*) određeni za izolate *Aspergila* sravnjeni su upotrebom MUSCLE analize (eng. *Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation*; Edgar, 2004) programskog paketa MEGA 7.0. (Kumar i sur., 2016) te je provedena preliminarna identifikacija do razine vrste pomoću BLAST analize (eng. *Basic Local Alignment Search Tool*) usporedbom s nukleotidnim slijedovima dijela gena *CaM* pohranjenih u bazi nukleotidnih slijedova NCBI (eng. *National Center for Biotechnology Information*) dostupnoj na mrežnoj stranici <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

## 4. REZULTATI

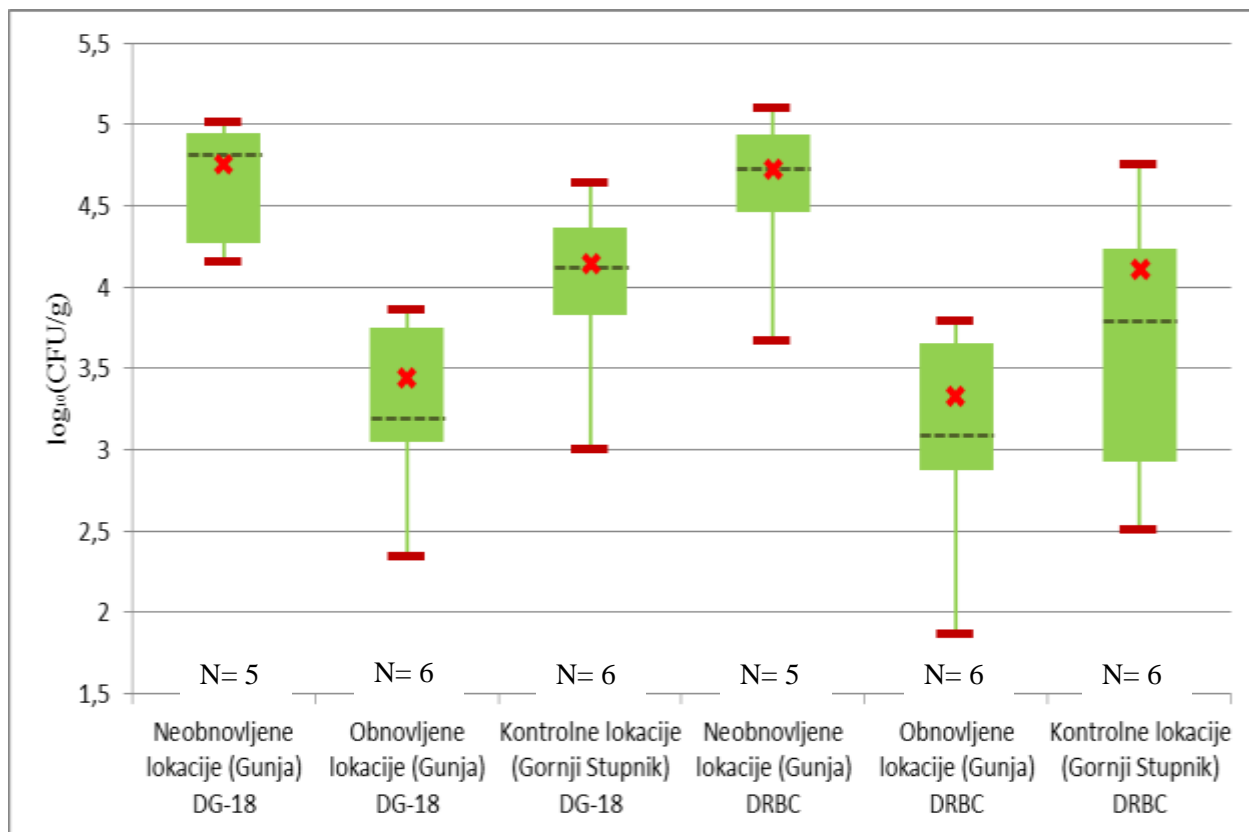
### 4.1. Analiza uzoraka prašine

#### 4.1.1. Kvantitativni sastav plijesni u uzorcima prašine

Primjer porasta plijesni iz uzorka prašine prikazan je na slici 1. Ukoliko je čitava površina DG-18 ili DRBC agaru nakon inkubacije bila prekrivena poraslim kolonijama broj kolonija se označavao kao  $> 150$ . Koncentracije plijesni u prašini prikupljenoj u Gunji i Gornjem Stupniku prikazane su na slici 2. Na DG-18 agaru ukupna koncentracija plijesni u neobnovljenim lokacijama je bila 3,59 puta veća od koncentracije u kontrolnim lokacijama, dok je koncentracija plijesni u obnovljenim lokacijama bila 5,45 puta manja od koncentracije u kontrolnim lokacijama. Na DRBC agaru ukupna koncentracija plijesni u neobnovljenim lokacijama je bila 3,79 puta veća od koncentracije u kontrolnim lokacijama, a koncentracija plijesni u obnovljenim lokacijama je bila 6,58 puta manja od koncentracije u kontrolnim lokacijama.



Slika 1. Porasle kolonije plijesni iz prašine prikupljenoj u neobnovljenoj kući u Gunji nakon inkubacije na DRBC agaru (25°C u mraku, 5–7 dana). Broj kolonija je iznad 150.

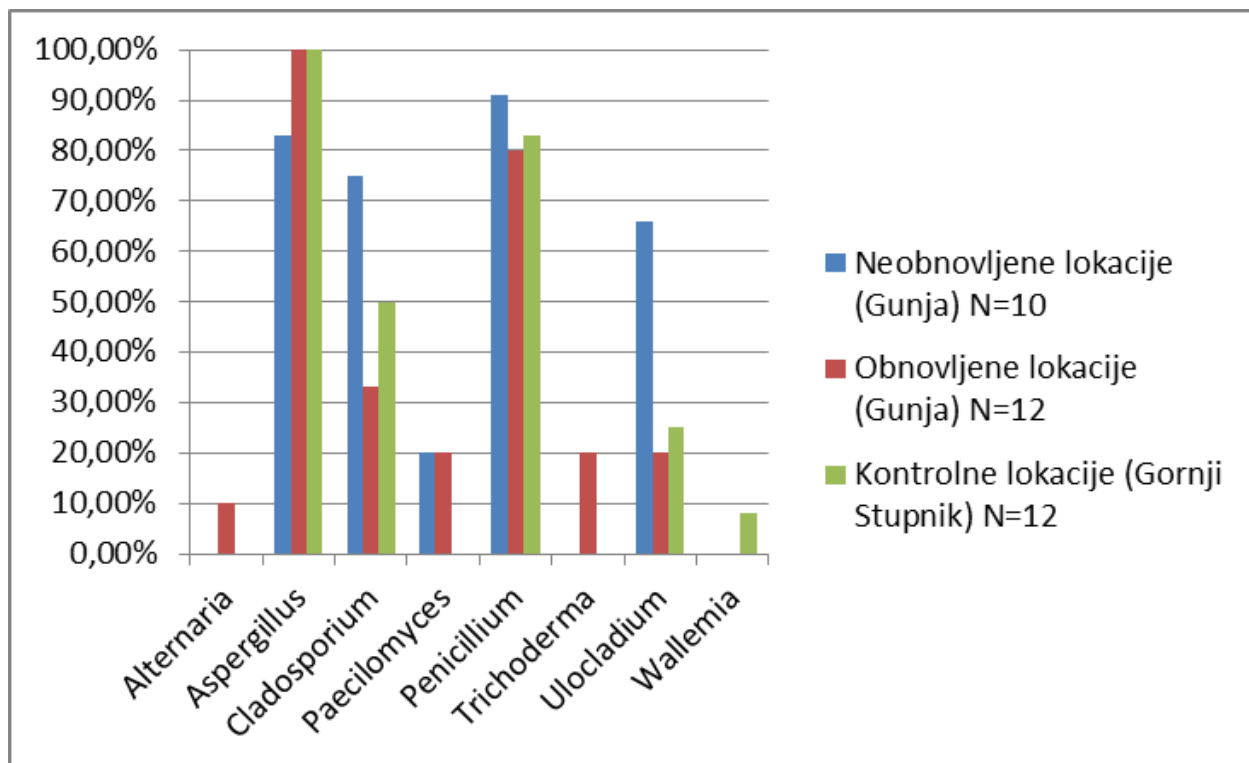


Slika 2. Prikaz logaritmiranih koncentracija plijesni u prašini s naznačenih lokacija. Koncentracije su izračunate na temelju broja kolonija poraslih na DG-18 i DRBC agaru.

(-) minimum/maksimum, (x) srednja vrijednost, (---) medijan, (■) kvartil 1-3., N – broj analiziranih uzoraka

#### 4.1.2. Kvalitativni sastav plijesni u uzorcima prašine

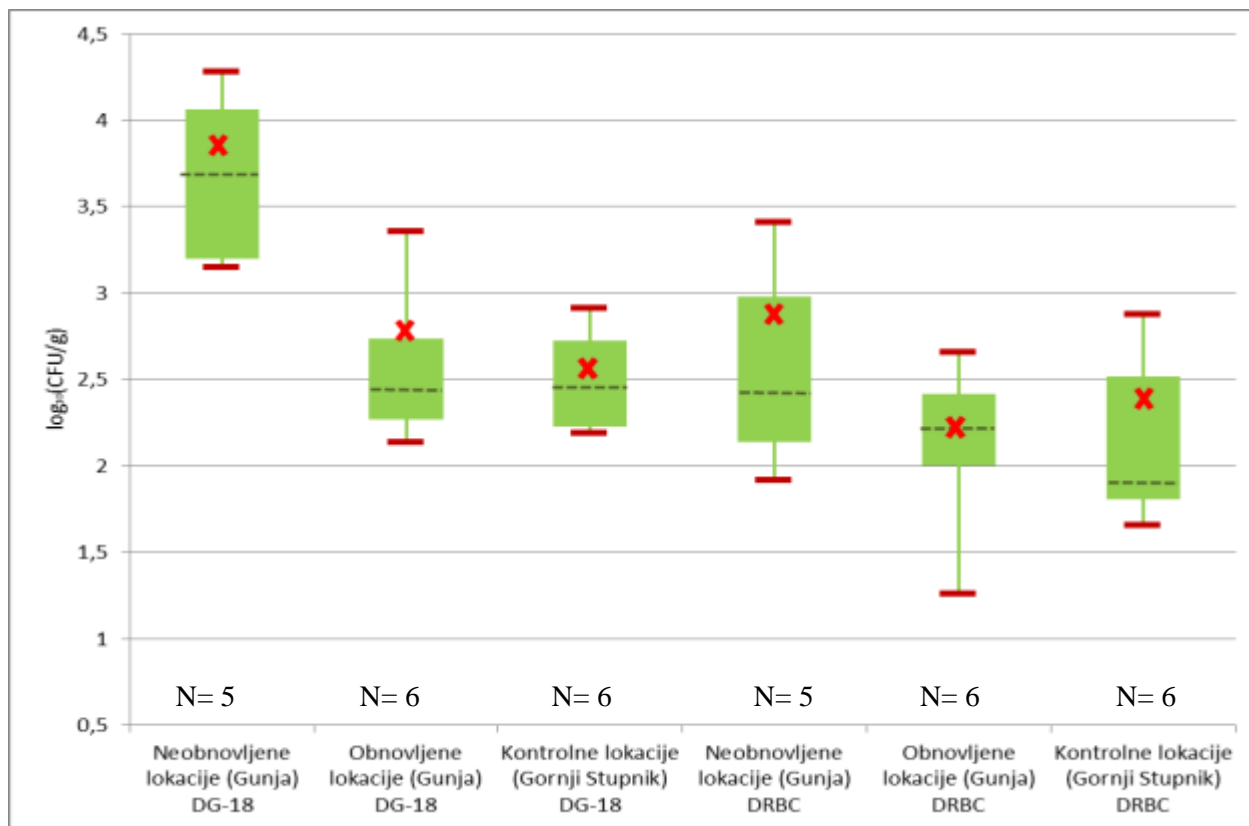
S obzirom da se radi o kvalitativnoj analizi, u postotni račun uzeti su u obzir svi uzorci bez obzira na hranjivu podlogu. U prašini su dominirale plijesni roda *Aspergillus*, *Penicillium* i *Cladosporium*, neovisno o lokaciji uzorkovanja. Plijesni roda *Ulocladium* bile su zastupljenije u prašini s neobnovljenih lokacija u Gunji (slika 3). Plijesni roda *Alternaria*, *Paecilomyces* i *Trichoderma* detektirane su samo u prašini prikupljenoj u Gunji, a pri tome su plijesni roda *Alternaria* i *Trichoderma* detektirane samo u prašini s neobnovljenih lokacija (slika 3).



Slika 3. Kvalitativni sastav plijesni u prašini na naznačenim lokacijama

#### 4.1.3. Ukupne koncentracije plijesni roda *Aspergillus* u uzorcima prašine

Rezultati koncentracije plijesni roda *Aspergillus* u prašini prikupljenoj u Gunji i Gornjem Stupniku prikazani su kao logaritmirane vrijednosti koncentracije u prašini ( $\log_{10}$  CFU/g) na slici 4. Koncentracija aspergila u prašini prikupljenoj na neobnovljenim lokacijama izračunata na temelju porasta kolonija na DG-18 agaru bila je 20,52 puta veća od koncentracije u kontrolnim lokacijama i iznosila je  $3,1 \times 10^5 \pm 10,4 \times 10^5$  CFU/g. Koncentracija aspergila u obnovljenim lokacijama je bila 1,62 puta veća od koncentracije u kontrolnim lokacijama i iznosila je  $4,1 \times 10^4 \pm 7,9 \times 10^4$  CFU/g. Koncentracije aspergila u prašini s neobnovljenih lokacija izračunate na temelju porasta kolonija na DRBC agaru bile su 3,41 puta veće od koncentracija u prašini s kontrolnih lokacija, dok su koncentracije aspergila u prašini s obnovljenih lokacija bile slične koncentracijama u prašini s kontrolnih lokacija (Tablica 6).



Slika 4. Prikaz logaritmiranih koncentracija aspergila u prašini s naznačenih lokacija. Koncentracije su izračunate na temelju broja kolonija aspergila poraslih na DG-18 i DRBC agaru. (-) minimum/maksimum, (x) srednja vrijednost, (---) medijan, ( ) kvartil 1-3, N- broj uzoraka

#### 4.1.4. Koncentracija aspergila iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* u uzorcima prašine

Rezultati kvantitativne analize prisustva aspergila iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri*, *Versicolores* u prašini prikupljenoj u Gunji i Gornjem Stupniku prikazani su u tablicama 3, 4, 5 i 6. Aspergili iz sekcije *Circumdati* u većim koncentracijama su bili prisutni u prašini prikupljenoj u Gornjem Stupniku, i to 5,32 puta većim u odnosu na koncentracije u prašini s obnovljenih lokacija odnosno 21,32 puta više u odnosu na koncentracije u prašini s obnovljenih lokacija u Gunji (tablica 3).

Aspergili iz sekcije *Flavi* dominirali su u uzorcima prašine iz Gunje. osobito u prašini prikupljenoj na obnovljenim lokacijama gdje su im koncentracije bile 4 puta veće u odnosu na kontrolnu lokaciju (tablica 4).



Koncentracije aspergila iz sekcije *Nigri* bile su veće u prašini prikupljenoj u Gornjem Stupniku te su im koncentracije bile 9,14 puta veće u odnosu na one u prašini s neobnovljenih lokacija, odnosno 2,19 puta veće u odnosu na koncentracije u prašini s obnovljenih lokacija (tablica 5).

Koncentracije aspergila iz sekcije *Versicolores* bile su 100 do 1000 puta veće u odnosu na aspergile iz ostalih sekcija, a dominirali su u uzorcima prašine iz Gunje. Koncentracije u prašini s neobnovljenih lokacija bile su 17,87, a s obnovljenih 2,92 puta veće u odnosu na koncentracije u prašini s kontrolnih lokacija (tablica 6).

Tablica 3. Ukupan broj aspergila iz sekcije *Circumdati* u uzorcima prikupljene prašine na naznačenim lokacijama.

Sekcija <i>Circumdati</i>						
Lokacija	DG-18 (CFU/g)			DRBC (CFU/g)		
	n/N	$\bar{x}$	SD	n/N	$\bar{x}$	SD
Gunja, neobnovljene lokacije	0/5	-	-	1/5	5,45x10	-
Gunja, obnovljene lokacije	0/6	-	-	2/6	1,36x10	6,4
Kontrolne lokacije	3/6	2,45x10 <sup>2</sup>	2,18x10 <sup>2</sup>	3/6	2,90x10 <sup>2</sup>	2,38x10 <sup>2</sup>

n/N- broj uzoraka prašine u kojima su detektirani aspergili/ ukupan broj uzoraka prašine;

$\bar{x}$ - srednja vrijednost; SD- standardna devijacija

Tablica 4. Ukupan broj aspergila iz sekcije *Flavi* u uzorcima prikupljene prašine na naznačenim lokacijama.

Sekcija <i>Flavi</i>						
Lokacija	DG-18 (CFU/g)			DRBC (CFU/g)		
	n/N	$\bar{x}$	SD	n/N	$\bar{x}$	SD
Gunja, neobnovljene lokacije	1/5	1,81x10	-	0/5	-	-
Gunja, obnovljene lokacije	0/6	-	-	1/6	5,45x10	-
Kontrolne lokacije	2/6	1,36x10	6,4	2/6	1,36x10	6,42

(n/N) udio analiziranih uzoraka, ( $\bar{x}$ ) srednja vrijednost, (SD) standardna devijacija

Tablica 5. Ukupan broj aspergila iz sekcije *Nigri* u uzorcima prikupljene prašine na naznačenim lokacijama.

Sekcija <i>Nigri</i>						
Lokacija	DG-18 (CFU/g)			DRBC (CFU/g)		
	n/N	$\bar{x}$	SD	n/N	$\bar{x}$	SD
Gunja, neobnovljene lokacije	1/5	9,09	-	1/5	1,18x10	-
Gunja, obnovljene lokacije	3/6	5,15x10	7,34x10	1/5	1,09x10	-
Kontrolne lokacije	4/6	1,13x10 <sup>2</sup>	4,78x10	5/6	7,81x10	6,21x10

(n/N) udio analiziranih uzoraka, ( $\bar{x}$ ) srednja vrijednost, (SD) standardna devijacija

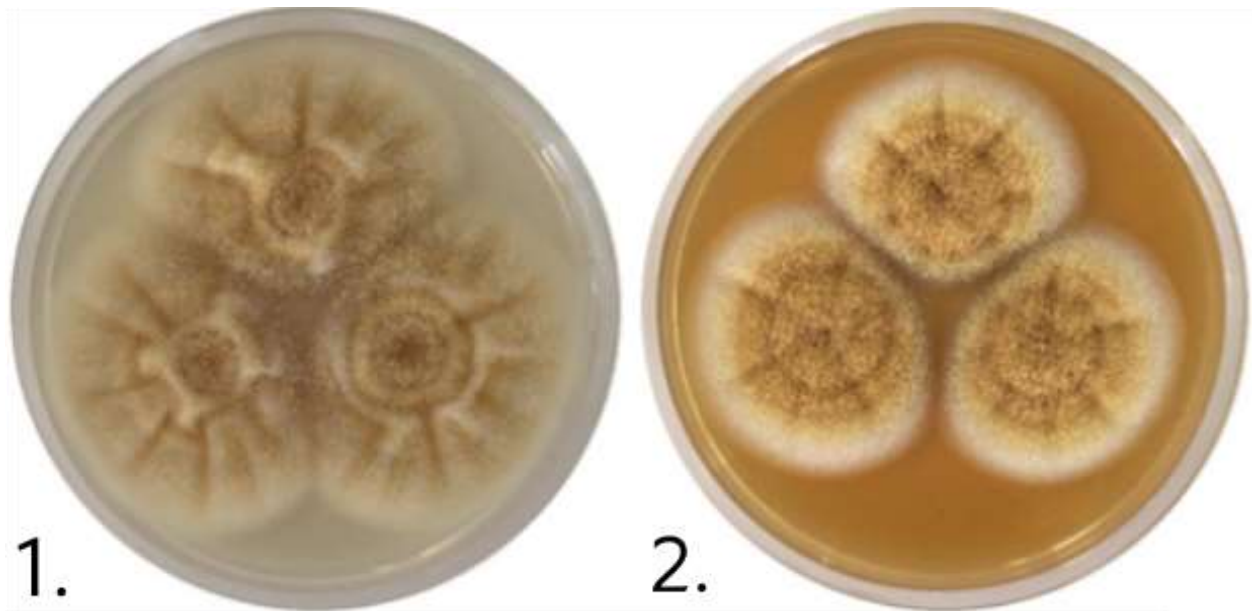
Tablica 6. Ukupan broj aspergila iz sekcije *Versicolores* u uzorcima prikupljene prašine na naznačenim lokacijama.

Sekcija <i>Versicolores</i>						
Lokacija	DG-18 (CFU/g)			DRBC (CFU/g)		
	n/N	$\bar{x}$	SD	n/N	$\bar{x}$	SD
Gunja, neobnovljene lokacije	3/5	1,21x10 <sup>2</sup>	1,09x10 <sup>2</sup>	2/5	2,27x10 <sup>3</sup>	2,44x10 <sup>3</sup>
Gunja, obnovljene lokacije	4/6	4,09x10 <sup>2</sup>	3,97x10 <sup>2</sup>	3/6	3,72x10 <sup>2</sup>	2,25x10 <sup>2</sup>
Gunja, neobnovljene lokacije	0/6	-	-	3/6	1,27x10 <sup>2</sup>	1,31x10 <sup>2</sup>

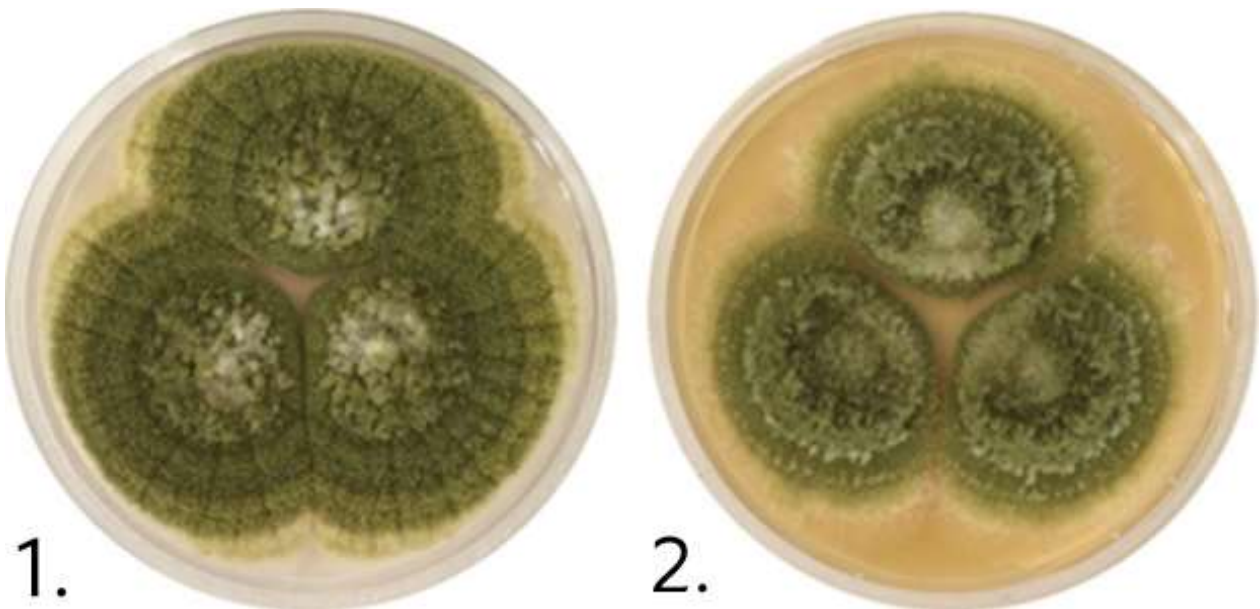
(n/N) udio analiziranih uzoraka, ( $\bar{x}$ ) srednja vrijednost, (SD) standardna devijacija

#### 4.1.5. Identifikacija aspergila iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* do razine vrste

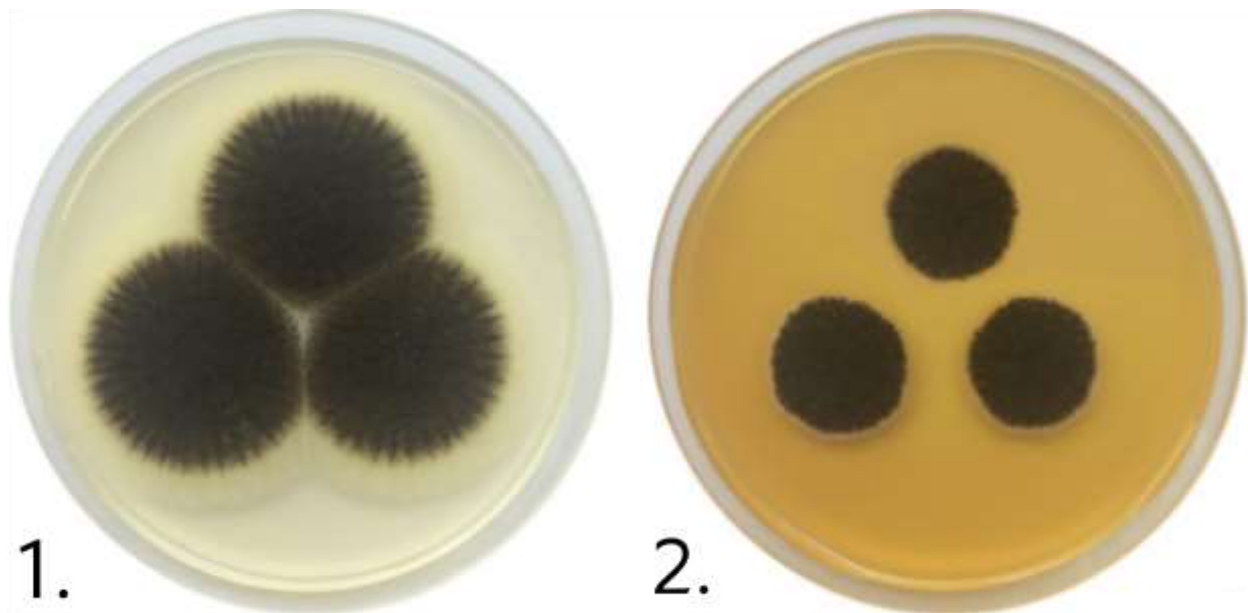
Karakteristični izgled kolonija aspergila iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* poraslih na CYA i MEA agaru prikazan je na slikama 5–8. Na temelju slijedova nukleotida dijela gena za kalmodulin prikupljeni izolati aspergila (N=31) identificirani su do razine vrste. Rezultati su prikazani u tablici 7. Izolati iz sekcije *Circumdati* (4/31) identificirani su kao vrste *A. ochraceus* i *A. ostianus*, dok su svi izolati iz sekcije *Flavi* (7/31) identificirani kao vrsta *A. flavus*. Najviše je prikupljeno izolata unutar sekcije *Nigri* (14/31), a identificirani su kao vrste *A. tubingensis* i *A. welwitschiae*. Unutar izolata iz sekcije *Versicolores* (8/31) identificirane su 4 različite vrste *A. amoenus*, *A. jensenii*, *A. protuberus* i *A. sydowii*.



Slika 5. Primjer kolonije aspergila iz sekcije *Circumdati* nakon inkubacije (7 dana, 25°C) na CYA (1) i MEA (2) agaru.



Slika 6. Primjer kolonije aspergila iz sekcije *Flavi* nakon inkubacije (7 dana, 25°C) na CYA (1) i MEA (2) agaru.



Slika 7. Primjer kolonije aspergila iz sekcije *Nigri* nakon inkubacije (7 dana, 25°C) na CYA (1) i MEA (2) agaru.



Slika 8. Primjer kolonije aspergila iz sekcije *Versicolores* nakon inkubacije (7 dana, 25°C) na CYA (1) i MEA (2) agaru.

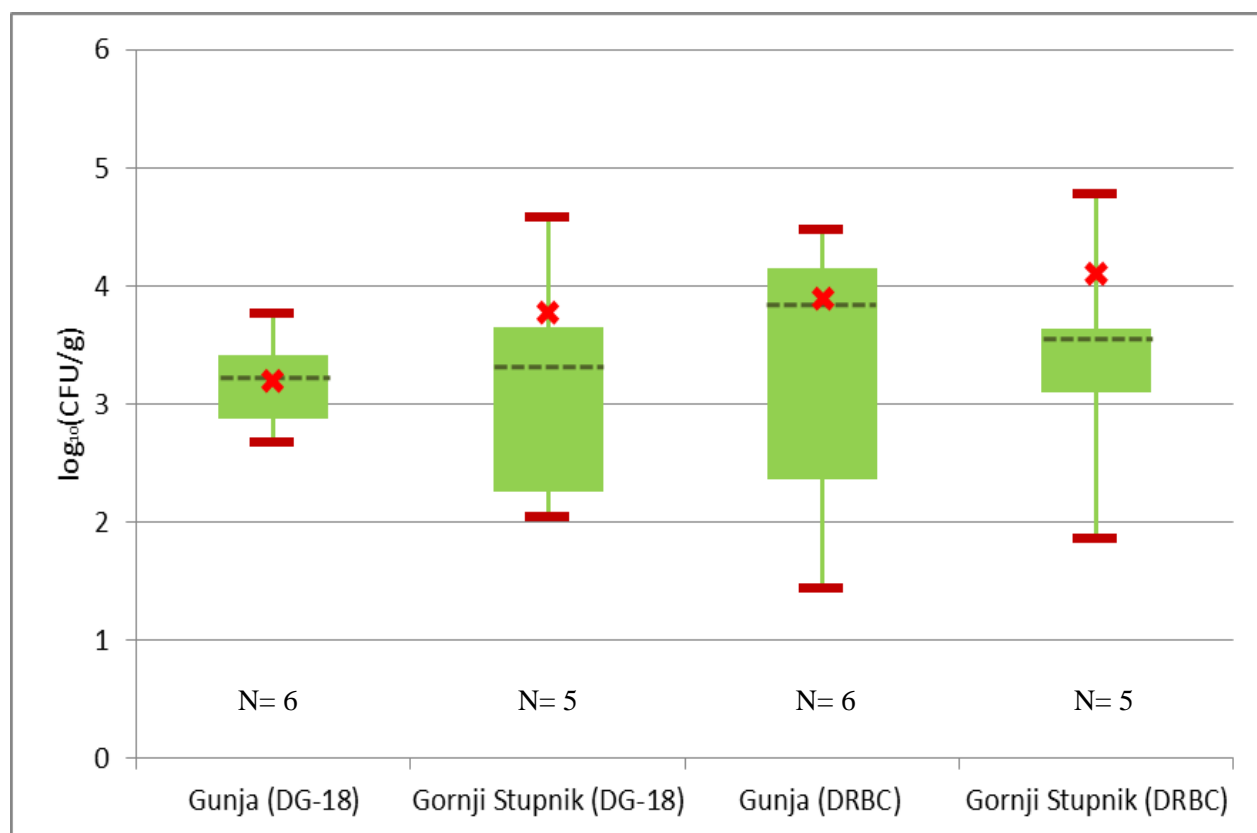
Tablica 7. Popis identificiranih izolata aspergila iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* na naznačenim lokacijama

Sekcija	Vrsta	Oznaka izolata (MFBF)	Lokacija
<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	12564	Kontrolna lokacija
		12566	
12568			
	<i>A. ostianus</i>	12567	Kontrolna lokacije
<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	12510	Obnovljena lokacija
		12513-A 12513-B	
		12565 12566	Kontrolna lokacija
<i>Nigri</i>	<i>A. tubingensis</i>	12506	Neobnovljena lokacija
		12512 12513-A	Obnovljena lokacija
		12563	Kontrolna lokacije
	<i>A. welwitschiae</i>	12505	Neobnovljena lokacija
		12511 12513-B 12513-D	Obnovljena lokacija
		12564 12565-A 12565-B 12566 12567 12567-B	Kontrolna lokacija
<i>Versicolores</i>	<i>A. amoenus</i>	12565	Kontrolna lokacija
	<i>A. jensenii</i>	12503-B 12504	Neobnovljena lokacija
		12511-A 12512 12512-B	Obnovljena lokacija
	<i>A. protuberus</i>	12509	Obnovljena lokacija
	<i>A. sydowii</i>	12505	Neobnovljena lokacija

## 4.2 Analiza uzoraka žitarica

### 4.2.1. Kvantitativni sastav plijesni u žitaricama

Rezultati kvantitativne analize prisustva plijesni u žitaricama prikupljenima u Gunji i Gornjem Stupniku prikazani su kao logaritmirane vrijednosti koncentracija u žitaricama ( $\log_{10}$  CFU/g) na slici 9. Uzimajući u obzir porast kolonija na DG-18 agaru ukupna koncentracija plijesni u žitaricama iz Gunje je bila je 4,35 puta manja od koncentracija u žitaricama iz Gornjeg Stupnika koje su iznosile  $8,89 \times 10^3 \pm 1,64 \times 10^4$  CFU/g. Na temelju porasta kolonija na DRBC agaru koncentracija plijesni u žitaricama iz Gunje bila je slična koncentracijama u žitaricama prikupljenim u Gornjem Stupniku ( $1,39 \times 10^4 \pm 3,90 \times 10^3$  CFU/g).

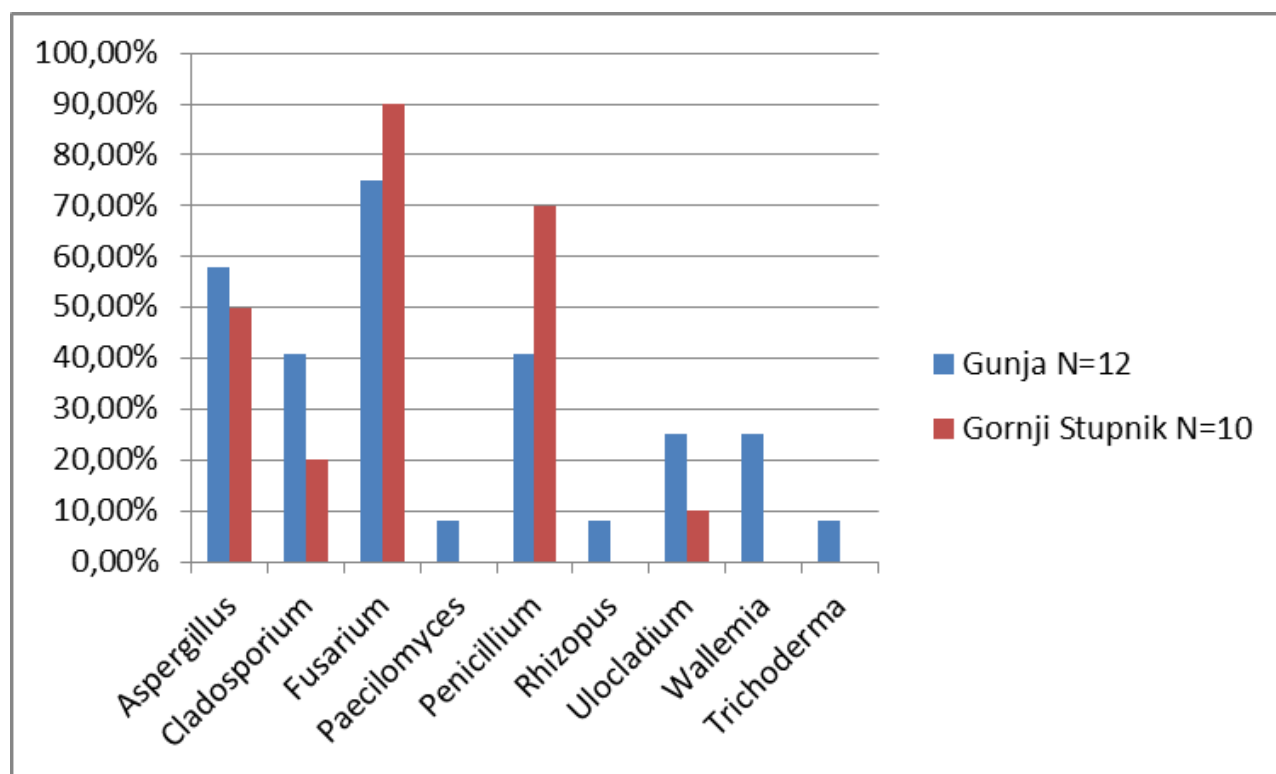


Slika 9. Prikaz logaritmiranih koncentracija plijesni u žitaricama s naznačenih lokacija. Koncentracije su izračunate na temelju broja kolonija poraslih na DG-18 i DRBC agaru.

(-) minimum/maksimum, (x) srednja vrijednost, (---) medijan, (■) kvartil 1-3, N- broj uzoraka

#### 4.2.2. Kvalitativni sastav plijesni u uzorcima žitarica

S obzirom da se radi o kvalitativnoj analizi, u postotni račun uzeti su u obzir svi uzorci bez obzira na hranjivu podlogu. Na slici 10 vidljive su razlike u zastupljenosti pojedinih rodova plijesni obzirom na lokaciju uzorkovanja, a pri tome su uzorci žitarica iz Gunje pokazali veću bioraznolikost. Najučestalije su bile plijesni roda *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* i *Cladosporium* koje su detektirane u žitaricama s obe lokacije. Dok su plijesni roda *Aspergillus* i *Cladosporium* bile učestalije u žitaricama iz Gunje, plijesni roda *Fusarium* i *Penicillium* bile su učestalije u Gornjem Stupniku (slika 10). Plijesni roda *Paecilomyces*, *Wallemia*, *Trichoderma* i *Rhizopus* detektirane su samo u žitaricama iz Gunje (slika 10).



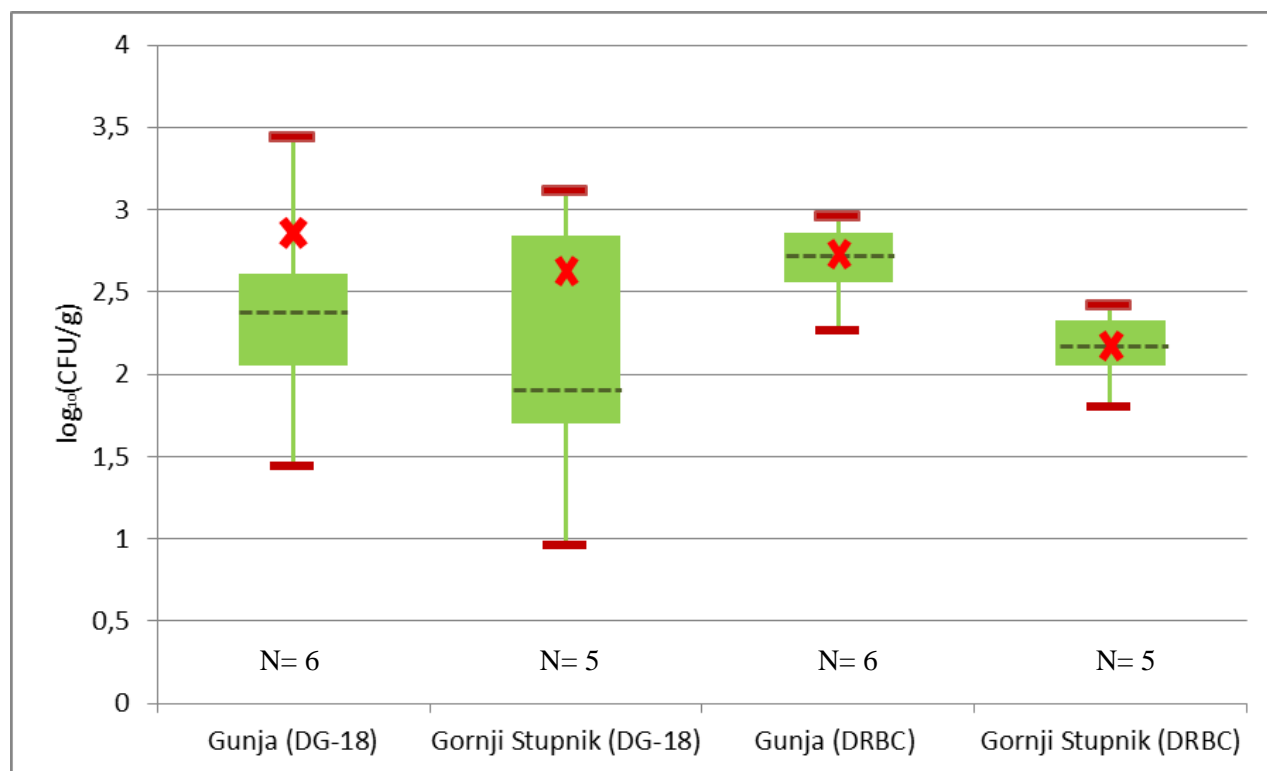
Slika 10. Kvalitativni sastav plijesni u žitaricama na naznačenim lokacijama

#### 4.2.3. Koncentracije aspergila u žitaricama

Rezultati koncentracije plijesni roda *Aspergillus* u žitaricama prikupljenim u Gunji i u Gornjem Stupniku prikazani su kao logaritmirane vrijednosti koncentracija ( $\log_{10}$  CFU/g) na slici 11. Pri tome se mogu uočiti razlike u koncentracijama obzirom na izbor hranjive podloge. Koncentracije aspergila izračunate na temelju porasta kolonija na DG-18 agaru bile su slične u žitaricama



prikupljenim na obe lokacije te su iznosile  $6,25 \times 10^2 \pm 1,04 \times 10^3$  CFU/g u žitaricama iz Gunje, odnosno  $4,69 \times 10^2 \pm 7,28 \times 10^2$  CFU/g u žitaricama iz Gornjeg Stupnika (slika 11). Koncentracije aspergila u žitaricama iz Gunje bile su do tri puta veće u odnosu na one u žitaricama iz Gornjeg Stupnika te su iznosile  $6,25 \times 10^2 \pm 1,04 \times 10^3$  CFU/g (DG-18) odnosno  $5,45 \times 10^2 \pm 5,14 \times 10^2$  CFU/g.



Slika 11. Prikaz logaritmiranih koncentracija aspergila u žitaricama s naznačenih lokacija. Koncentracije su izračunate na temelju broja kolonija poraslih na DG-18 i DRBC agaru.

(-) minimum/maksimum, (x) srednja vrijednost, (---) medijan, (■) kvartil 1-3, N- broj uzoraka

#### 4.2.4. Aspergili iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* u žitaricama

Na temelju porasta kolonija na DG-18 agaru izolirano je dva izolata iz sekcije *Flavi* te jedan izolat iz sekcije *Nigri*. Oba izolata aspergila iz sekcije *Flavi* identificirana su kao *A. flavus* i izolirani su iz kukuruza iz Gornjeg Stupnika. Izolat aspergila iz sekcije *Nigri* identificiran je kao *A. welwitschiae*, a bio je prisutan u pšenici iz Gunje.



## 5. RASPRAVA

### 5.1. Plijesni u prašini

Rezultati ovog istraživanja pokazali su razlike u kvantitativnom i kvalitativnom sastavu prašine obzirom na lokacije uzorkovanja te ovisno o odabranoj hranjivoj podlozi budući da je DG-18 agar podloga nižeg  $a_w$ , u odnosu na DRBC. Iako DG-18 i DRBC podjednako podržavaju rast aspergila iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* (Samson i sur., 2010) u rezultatima prikazanima u tablicama 3–6 vidljive su razlike u njihovim koncentracijama obzirom na hranjivu podlogu. One se mogu objasniti time što postoje suptilne razlike u  $a_w$  optimalnim za rast pojedine vrste iz iste sekcije. Prilikom pregledavanja poraslih kolonija, pored aspergila od interesa uočen je i porast aspergila iz nekih drugih sekcija. Pri tome brzorastući kserofilni aspergili iz sekcije *Aspergillus* (prijašnjeg naziva *Eurotium* spp.) na DG-18 agaru često dominiraju i prerastu aspergile iz većine ostalih sekcija što onemogućava njihovu izolaciju, a odražava se i na njihove koncentracije.

Na temelju kvantitativne meta analize, vlažnost u zatvorenim prostorima je dovedena u izravnu korelaciju s respiratornim problemima. Prema ovoj studiji plijesni u zatvorenim prostorima povećavaju iritaciju gornjih dišnih putova, učestalost kašlja i hripanja, a utječu i na povećanje incidencije astme te pogoršanje simptoma astme (Fisk i sur., 2007).

Plijesan dospijeva u prašinu kumulativnim taloženjem konidija i dijelova micelija iz zraka te okolnih supstrata. Zato je prašina idealni indikator dugotrajne izloženosti plijesnima. Cilj studije provedene u Njemačkoj na 272 djece školske dobi bio je ispitati utjecaj koncentracije plijesni u prašini na incidenciju alergijske senzitivacije. Iznad koncentracije  $4,87 \times 10^4$  CFU/g, incidencija alergijske senzitivacije je bila 79 % (Jacob i sur., 2002). U neobnovljenim lokacijama u Gunji koncentracija plijesni u prašini (DG-18) je bila  $6,07 \times 10^4$  CFU/g što upućuje na važnost obnove kako bi se prevenirali potencijalno štetni učinci. Izloženost plijesnima u zatvorenim stambenim prostorima može dovesti do „sindroma bolesne zgrade“. Epidemiološka studija u Danskoj na 1053 djece (Meyer i sur., 2004) te u Americi kod odraslih (Park i sur., 2006) pratila je simptome kao što su iritacija očiju i grla, glavobolja, manjak koncentracije, vrtoglavica koji se pojavljuju pri koncentraciji od  $3,81 \times 10^4$  CFU/g odnosno  $5,7 \times 10^4$  CFU/g što je niže od koncentracije  $6,07 \times 10^4$  CFU/g koja je izmjerena u neobnovljenim lokacijama u Gunji. Iako su koncentracije plijesni u prašini prikupljenoj na obnovljenim lokacijama bile niže ( $3,10 \times 10^3$  CFU/g) ne mogu se

isključiti potencijalno štetni učinci za zdravlje izloženih ljudi, osobito nakon dužeg vremenskog perioda.

Plijesni roda *Cladosporium* i *Ulocladium* kao tercijarni kolonizatori karakteristične su za neobnovljene lokacije u Gunji, dok primarne i sekundarne kolonizatore *Aspergillus* spp. i *Penicillium* spp. nalazimo na sve tri lokacije. Manji broj aspergila u prašini sa neobnovljenih lokacija proizlazi iz toga što se u ovoj prašini očekuje pojavnost plijesni karakterističnih za vanjski zrak u kojemu je općenito manje aspergila u odnosu na zatvorene prostore. Istraživanjem poplavljenog područja, primjerice onog pogođenog uraganom Katrina i Rita (Bloom i sur., 2009) u neobnovljenim lokacijama ustanovljeno je kako je mikrobiom poplavom zahvaćenih kuća drugačiji nego neoštećenih kuća te kako je nakon sanacije kuća smanjena količina plijesni. Prije same sanacije plijesni prioritet bi trebao biti prevencija njenog razvoja. U roku od 24 do 48 sati potrebno je osušiti oštećeno područje te trajno eliminirati izvor vode. Neporozne materijale (metal, staklo, plastika) dovoljno je samo prebrisati fungicidnim sredstvom ([www1.nyc.gov](http://www1.nyc.gov)). Problem pri sanaciji su porozni materijali kao beton, drvo, tapete i gips koji čine 80% izvora kontaminacije (Andersen i sur., 2011). Njihovo čišćenje je moguće samo ako su strukturno nepromijenjeni. Sredstvo izbora su sapuni i detergentsi. Cilj je izabrati što blažu metodu da ne bi došlo do širenja plijesni zbog stvaranja kontaminirane prašine. Zato se taj način čišćenja često kombinira s usisivačima opremljenim s HEPA filtrima ([www1.nyc.gov](http://www1.nyc.gov)). Na hrvatskom tržištu postoje specijalizirani detergentsi visokog prodiranja s antifungalnim svojstvima („Impregnacija protiv plijesni i vlage“, „DUFA odstranjivač plijesni u spreju“, „Caparol Fungizid“). Dezinficijensi se rjeđe preporučuju prvenstveno zbog visoke uspješnosti detergenata i sapuna, te njihove agresivnosti. Najčešća situacija gdje se dezinficijensi preporučuju je zagađenje prostora kanalizacijskim vodama ([www1.nyc.gov](http://www1.nyc.gov)). Od dezinficijensa treba izdvojiti varikinu kao jedno od najčešće korištenih kućanskih sredstava protiv plijesni ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)). Fumigacija prostora kao metoda se uopće ne preporučuje jer pri svakoj većoj kontaminaciji najsigurnija metoda je potpuna zamjena materijala ([www.epa.gov](http://www.epa.gov)).

Nakon uragana Harvey koji je pogodio Texas 2017. godine utvrđeno je da je veliki broj imunokompromitiranih osoba bio izložen plijesnima, uključujući i volontere, liječnike, vatrogasce i druge osobe na terapiji imunosupresivima ili s nekim oblikom imunodeficijencije (Chow i sur., 2019). Imunokompromitirane osobe su rizična skupina za aspergilozu, a stopa smrtnosti od 50% pridonosi ozbiljnosti problema (Maschmeyer i sur., 2009).

Mnoge vrste aspergila iz pojedinih sekcija ne mogu se razlikovati na temelju mikromorfologije i makroskopskih obilježja kolonija poraslih na različitim hranjivim podlogama. Iako je *ITS* tzv. *barcode* za aspergile, tek primjenom sekundarnih genskih markera kao što je *CaM* moguće je razlikovati vrste unutar pojedinih sekcija (Samson i sur., 2014).

Vrsta *A. flavus* je rasprostranjena po čitavom svijetu. Uzrok tome su aerodinamične konidije koje raznosi vjetar i kukci. Sastav atmosfere ima veliki utjecaj na rast vrste, s vlagom kao najvažnijim faktorom (Gibson i sur., 1994). *A. flavus* najbolje raste pri  $a_w$  između 0,86-0,96. Optimalna temperatura za rast vrste je 37°C, no rast kolonija je primijećen je u širokom temperaturnom rasponu od 12°C – 48°C. *A. flavus* ujedno je i jedan od glavnih proizvođača aflatoksina, osobito AFB<sub>1</sub> (Frisvad i sur., 2019). Iako se ova vrsta uglavnom razmatrala kao kontaminant hrane za ljude i životinje, može se izolirati u zraku stambenih i radne sredine te pridonijeti nepovoljnim učincima na zdravlje ljudi uslijed inhalacije. U ispitivanjima *in vitro* pokazano je da ekstrakt vrste *A. flavus* smanjuje vijabilnost A549 i THP-1 stanica induciranih u makrofage, dok je u slučaju prisustva AFB<sub>1</sub> u ekstraktu zabilježen povećani toksični učinak za THP-1 makrofage uz povećano izlučivanje proupalnih citokina IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IL-17 (Jakšić i sur., 2019). Ova vrsta aspergila često se povezuje sa lokaliziranim mikozama, ponekad i sistemskim, osobito kod imunokompromitiranih osoba. Za aspergilozu uzrokovanu s *A. flavus* je genska specifičnost što znači da samo neki sojevi mogu uzrokovati infekciju pa se može locirati izvor zaraze (Myoken, 2003). Općenito se lokalne aspergiloze koje zahvaćaju kožu, sluznicu te potkožno tkivo povezuju s vrstom *A. flavus*. Od svih slučajeva keratitisa uzrokovanih aspergilima, njih 80% uzrokovano je vrstom *A. flavus* (Khairallah i sur., 1992). Nadalje, 41% aspergiloza rana može se povezati s vrstom *A. flavus* (Pasqualotto i Denning, 2006), kao i većina kožnih aspergiloza (van Burik i sur., 1998).

*A. tubingensis* je tamno pigmentirana vrsta aspergila iz sekcije *Nigri*. Često se pogrešno identificira kao *A. niger* zbog slične morfologije i staništa. *A. tubingensis* je uključen u kvarenje voća i žitarica, te u industrijsku fermentaciju. Za razliku od vrsta *A. niger* i *A. welwitschiae* nije proizvođač mikotoksina OTA i FB<sub>2</sub>, ali se može povezati s infekcijama. Izolirana je iz kliničkih uzoraka trideset pacijenata oboljelih od cistički fibroze, kronične opstruktivske plućne bolesti te drugih bolesti dišnog sustava povezanih s akutnim egzacerbacijama (Gautier, 2016). Zabilježen je i slučaj infekcije gornje čeljusti nakon zubarskog zahvata (Bathoorn, 2013). Nalaz ove vrste u prašini zatvorenih prostora zabrinjava i obzirom na činjenicu da se u ispitivanju na staničnim

kulturama A549 i THP-1 stanicama induciranim u makrofage ekstrakt *A. tubingensis* pokazao citotoksičnim i genotoksičnim (Jakšić i sur., 2018).

*A. jensenii* je nedavno opisana vrsta iz sekcije *Versicolores* koja proizvodi STC (Jurjević i sur., 2013). Ujedno je ova vrsta uz *A. creber* najčešće identificirana vrsta iz sekcije *Versicolores* u zraku i prašini unutarnjih zatvorenih prostora (Jurjević i sur., 2012). Nalaz vrste *A. jensenii* u zatvorenom prostoru zabrinjavajući je obzirom da je ispitivanjima ekstrakta *A. jensenii* pokazano da smanjuje vijabilnost A549 i THP-1 stanica induciranih u makrofage (Jakšić Despot i sur., 2016). U zatvorenim prostorima često se detektiraju i vrste *A. protuberus* i *A. sydowii* koje su bile prisutne u prašini u Gunji, ali i Gornjem Stupniku. Obzirom da je i za ove vrste opisan potencijal tvorbe STC (Jakšić Despot i sur., 2016; Jurjević i sur., 2012) i njihovo prisustvo pridonosi koncentraciji toksičnog metabolita u okolišu te riziku za zdravlje izloženih ljudi. Pored toga, *A. protuberus* i *A. sydowii* pod određenim okolnostima mogu biti uzročnici lokaliziranih mikoza, primjerice mikoze vlasišta (Jia i sur., 2019) i onihomikoze (Takahata i sur., 2007).

## 5.2. Plijesni u žitaricama

Prosječna koncentracija plijesni u hrani bila je slična u uzorcima prikupljenim u poplavom pogodnom području u Gunji i u kontrolnom području Gornji Stupnik. Usklađenost koncentracija u hrani s oba područja može se objasniti time što je hrana u Gunji uzorkovana tek nakon sanacije poplave. Velike standardne devijacije unutar skupine se objašnjavaju razlikom u vrsti (kukuruz, pšenica, ječam, crna zob) uzorkovanog materijala, te različitim metodama skladištenja istih. Prema članku 71. Pravilnika o kakvoći stočne hrane (NN/26/98), najveći broj kvasaca i plijesni u 1 gramu krmiva biljnog podrijetla iznosi 200000 uz dopušteno odstupanje od 15%. Najviša koncentracija plijesni iz uzoraka hrane iz Gunje iznosila je  $5,72 \times 10^3 \pm 2,02 \times 10^3$  CFU/g (DG-18) odnosno  $3,00 \times 10^4 \pm 1,19 \times 10^4$  CFU/g (DRBC) što je unutar dopuštenog limita. Međutim, u izračunu nije uzete u obzir porast kolonija kvasaca što bi pridonijelo koncentraciji gljivica u pojedinim žitaricama. Uzimajući u obzir kvalitativni sastav plijesni u žitaricama posebno zabrinjavaju visoke koncentracije plijesni roda *Fusarium*, osobito zbog potencijala tvorbe mikotoksina FB<sub>1</sub>. Nadalje, u uzorcima pšenice iz Gunje detektirana je vrsta *A. welwitschiae* koja može biti proizvođač mikotoksina OTA i FB<sub>2</sub> pa postoji opasnost od nefrotoksičnosti i hepatotoksičnosti nakon ingestije.

## 6. ZAKLJUČCI

### 6.1. Mikološka analiza uzoraka prašine

- Ukupna koncentracija plijesni u neobnovljenim lokacijama u Gunji bila je do 3,5 puta veća od koncentracije plijesni u kontrolnim lokacijama u Gornjem Stupniku.
- Ukupna koncentracija plijesni u obnovljenim lokacijama u Gunji je do 6 puta manja od koncentracije plijesni u kontrolnim lokacijama u Gornjem Stupniku. Plijesni roda *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* i *Ulocladium* vrste dominiraju u prašini s neobnovljenih lokacija u Gunji. a *Aspergillus* i *Penicillium* u prašini iz obnovljenih lokacija
- Prema porastu na DG-18 agaru koncentracija *Aspergillus* vrsta u neobnovljenim lokacijama u Gunji je 20,52 puta veća ( $3,1 \times 10^5 \pm 10,4 \times 10^5$  CFU/g) od one u kontrolnim lokacijama u Gornjem Stupniku.
- Iako je ukupna koncentracija plijesni u prašini s obnovljenih lokacija bila niža u odnosu na kontrolne uzorke, koncentracije aspergila su bile oko 1,6 puta više ( $4,1 \times 10^4 \pm 7,9 \times 10^4$  CFU/g).
- U neobnovljenim lokacijama dominirali su aspergili iz sekcije *Versicolores* ( $2,27 \times 10^3$  CFU/g), a ukupna koncentracija bila je do dvadeset puta veći naspram kontrolnih lokacija i iznosila je  $2,27 \times 10^3$  CFU/g  $\pm$   $2,44 \times 10^3$  CFU/g.
- U prašini iz neobnovljenih kuća u Gunji identificirane su vrste *A. tubingensis*, *A. welwitschiae* iz sekcije *Nigri* te *A. jensenii* i *A. sydowii* iz sekcije *Versicolores*
- U prašini iz obnovljenih kuća u Gunji identificirane su vrste *A. flavus* iz sekcije *Flavi*, *A. tubingensis*, *A. welwitschiae* iz sekcije *Nigri* te *A. jensenii* i *A. protuberus* iz sekcije *Versicolores*
- U prašini iz Gornjeg Stupnika identificirane su vrste *A. ochraceus* i *A. ostianus* iz sekcije *Circumdati*, *A. flavus* iz sekcije *Flavi*, *A. tubingensis* i *A. welwitschiae* iz sekcije *Nigri* te *A. amoenus* iz sekcije *Versicolores*.
- Identificirani aspergili potencijalni su proizvođači mikotoksina, uključujući okratoksine, aflatoksine, fumonizine i sterigmatocistin te time pridonose štetnim učincima na zdravlje ljudi bilo uslijed inhalacije kontaminirane prašine

## 6.2. Mikološka analiza žitarica

- Koncentracija plijesni u žitaricama iz Gunje je do 3 puta manja od onih iz Gornjeg Stupnika.
- U žitaricama su najčešće detektirane vrste roda *Aspergillus*, *Penicillium*, i *Fusarium*
- Koncentracija aspergila u žitaricama iz Gunje je oko tri puta veća od koncentracije u žitaricama iz Gornjeg Stupnika.
- U jednom uzorku pšenice iz Gunje izolat aspergila iz skcije *Nigri* identificiran je kao vrsta *A. welwitschiae* dok su iz uzoraka kukuruza iz Gornjeg Stupnika dva izolata aspergila iz sekcije *Flavi* identificirani kao *A. flavus*.
- Ukupne koncentracija plijesni u uzorcima hrane u Gunji bile su unutar dozvoljenog limita, međutim u izračun koncentracija nisu uzeti u obzir kvasci
- Prisutnost potencijalno toksinogenih sojeva zabrinjava obzirom da ingestijom kontaminirane hrane može doći do ispoljavanja štetnih učinaka mikotoksina

## 7. LITERATURA

- Abdulaj R, Miković N, Oskoruš D, Vujnović T. Velike vode donjeg toka rijeke Save tijekom svibnja 2014. *Hrvatska vodoprivreda*, 2014, 207, 14-16.
- Abellana M, Benedi J, Sanchis V, Ramos AJ. Water activity and temperature effects on germination and growth of *Eurotium amstelodami*, *E. chevalieri* and *E. herbariorum* isolates from bakery products. *J Appl Microbiol*, 1999, 87, 371-380.
- Adams MR, Moss MO. Food microbiology. Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 2008.
- Andersen B, Frisvad JC, Søndergaard I, Rasmussen IS, Larsen LS. Associations between fungal species and water-damaged building materials. *Appl Environ Microb*, 2011, 77, 4180-4188.
- Bathoorn E, Escobar-Salazar N, Spehkrhouy S, Meijer M, deCock H, Haas PJ. Involvement of the opportunistic pathogen *Aspergillus tubingensis* in osteomyelitis of the maxillary bone: a case report. *BMC Infect Dis*, 2013, 13, 59-62.
- Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*, 2003, 16, 497-516.
- Blackwell BA, Edwards OE, Fruchier A, ApSimon JW, Miller JD. NMR structural studies of fumonisin B<sub>1</sub> and related compounds from *Fusarium Moniliforme*. U: Fumonisin in food. Jackson LS i sur., urednici, New York, Springer science, 1996, str. 75-76.
- Bloom E, Grimsley LF, Pehrson C, Lewis J, Larsson L. Molds and mycotoxins in dust from water-damaged homes in New Orleans after hurricane Katrina. *Indoor Air*, 2009, 19, 153-158.
- Bode M, Munson D. Controlling mold growth in the home. *The near environment*, 1995, 2, 1-8.
- Bucci TJ, Hansen DK, LaBrode JB. Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin fumonisin B<sub>1</sub>. *Nat Toxins*, 1966, 4, 51-52.
- Bui-Klimke TR, Wu F. Ochratoxin A and human health risk: A review of the evidence. *CRC Cr Rev Food Sci*, 2015, 55, 1860-1869.

- Bünger J, Westphal G, Mönnich A, Hinnendahl B, Hallier E, Müller M, Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. *Toxicology*, 2004, 202, 199- 211.
- Campbell-Platt G, Cook PE. Fungi in the production of foods and food ingredients. *J Appl Bacteriol: Symposium supplement*, 1989, 117S-131S.
- Center for Disease Control and Prevention. Mold clean-up after disasters: when to use bleach, <https://www.cdc.gov/mold/mold-cleanup-bleach.html>, pristupljeno 21. 8. 2018.
- Chandrasekar P. Invasive mold infections: recent advances in management approaches. *Leukemia Lymphoma*, 2009, 50, 703-715.
- Chen KC, Yin WS, Tiu C, Houg JY. 11a-Hydroxylation of progesterone using modified alginate-immobilized cells. *Enzyme Microb Tech*, 1994, 16, 551-555.
- Chow NA, Toda M, Pennington AF, Anassi E, Atmar RL, Cox-Ganser JM, Da Silva J, Garcia B, Kontoyiannis DP, Ostrosky-Zeichner L, Leining LM, McCarty J, Al Mohajer M, Murthy BP, Park JH, Schulte J, Shuford JA, Skrobareck KA, Solomon S, Stryzko J, Chiller TM, Jackson BR, Chew GL, Beer KD. Hurricane-associated mold exposures among patients at risk for invasive mold infections after hurricane Harvey-Houston, Texas, 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2019, 68, 669-473.
- Christian JHB. Drying and reduction of water activity. U: The Microbiological safety and quality of food. Lund BM, Baird-Parker TC, Gould GW, urednici, Gaithersburg, Aspen Publishers, 2000, str. 146-174.
- Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, Meletiadis J, Antachopoulos C, Knudsen T, Buchanan W, Milanovich J, Sutton DA, Fothergill A, Rinaldi MG, Shea YR, Zaoutis T, Kottlilil S, Walsh TJ. Infections caused by *Scedosporium spp.* *Clin Microbiol Rev*, 2008, 21, , 157-197.
- Fisk WJ, Lei-Gomez Q, Mendell MJ. Meta-analyses of the associations of respiratory health effects with dampness and mold in homes. *Indoor Air*, 2007, 17, 284-296.



- Frisvad JC, Smedsgaard J, Samson RA, Larsen TO, Thrane U. Fumonisin B<sub>2</sub> production by *Aspergillus niger*. *J Agric Food Chem*, 2007, 55, 9727–9732.
- Frisvad JC, Hubka V, Ezekiel CN, Hong SB, Novakova A, Chen AJ, Arzanlou M, Larsen TO, Sklenar F, Mahakarnchanakul 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.
- Gao W, Jiang L, Ge L, Chen M, Geng C, Yang G, Li Q, Ji F, Yan Q, Zou Y, Zhong L, Liu X. Sterigmatocystin-induced oxidative DNA damage in human liver-derived cell line through lysosomal damage. *Toxicol in Vitro*, 2015, 29, 1–7.
- Gautier M, Normand AC, L'Ollivier C, Cassagne C, Reynaud-Gaubert M, Dubus JC, Piarroux R. *Aspergillus tubingensis*: a major filamentous fungus found in the airways of patients with lung disease. *Med Mycol*, 2016, 54, 459–470.
- Genzen JR, Kenney B. Central nervous system *Aspergillus* infection after epidural analgesia: diagnosis, therapeutic challenges, and literature review. *Diagn Microb Infect Dis*, 2009, 65, 312-318.
- Gibson AM, Baranyi J, Pitt JJ, Eyles MJ, Roberts TA. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *Int J Food Microbiol*, 1994, 23, 419-431.
- Harrison LR, Colvin BM, Greene JT, Newman LE, Cole JR. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1 a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J Vet Diagn Invest*, 1990, 2, 217-221.
- Hong SB, Lee Mina, Kim DH, Varga J, Frisvad JC, Perrone G, Gomi K, Yamada O, Machida M, Houbraken J, Samson RA. *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in east Asia. *Plos One*, 2013, 8, e63769.
- Husain AN, Kumar V. The lung. U: Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Philadelphia, Elsevier. 2005, str. 711-722.

- IARC. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monogr Eval Carcinog risks to Humans*, 1993, 56, 489–521.
- Jacob B, Ritz B, Gehring U, Koch A, Bischof W, Wichman HE, Heinrich J. Indoor exposure to molds and allergic sensitization. *Environ Health Perspect*, 2002, 110, 647-653.
- Jakšić Despot D, Kocsubé S, Bencsik O, Kecskeméti A, Szekeres A, Jelić D, Kopjar N, Vágvölgyi C, Varga J, Šegvić Klarić M. Fumonisin production and toxic capacity in airborne black *Aspergilli*. *Toxicol in Vitro*, 2018, 53, 160–71.
- Jakšić Despot D, Kocsubé S, Bencsik O, Kecskeméti A, Szekeres A, Jelić D, Kopjar N, Vágvölgyi 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, <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00345-z>.
- Jakšić Despot D, Kocsube S, Bencsik O, Kecskemeti A, Szekeres A, Vagvolgyi C, Varga J, Šegvić Klarić M. Species diversity and cytotoxic potency of airborne sterigmatocystin-producing *Aspergilli* from the section *Versicolores*. *Sci Tot Environ*, 2016, 562, 269-304.
- Jia J, Chen M, Mo X, Liu J, Yan F, Li Z, Xie S, Chen D. The first case report of kerion-type scalp mycosis cause by *Aspergillus protuberus*. *BMC Infect Dis*, 2019, 19, 506.
- Jurjevic Z, Peterson SW, Horn BW. *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. *IMA Fungus*, 2012, 3, 59–79.
- Karolyi D. Aktivitet vode (aw) kao čimbenik održivosti mesa. *Meso*, 2004, 6, 9-13.
- Khairallah SH, Byrne KA, Tabbara KF. Fungal keratitis in Saudi Arabia. *Doc Ophthalmol*. 1992, 79, 269-276.
- Kratofil L. Svibanjska poplava županijske posavine. *Hrvatska vodoprivreda*, 2014, 207, 17-28.
- Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. *Mycoses*, 2009, 52, 206–222.

- Kumar S, Stecher G, Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 33, 1870-1874.
- Kuskunović M, Blažić Z, Mataušić Pišl M, Horvat H. Ministarstvo će vratiti poljoprivredu i stočarstvo u poplavljenu županjsku Posavinu. *Hrvatska vodoprivreda*, 2014, 207, 61-66.
- Lai M, Semeniuk G, Hesseltine CW. Conditions for production of ochratoxin A by *Aspergillus* species in synthetic medium. *Appl Microbiol*, 1970, 19, 542-544.
- Marasas WF, Kellerman TS, Gelderblom WC, Coetzer JA, Thiel PG, van der Lugt JJ. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J Vet Res*, 1988, 55, 197-203.
- Maschmeyer G, Calandra T, Singh N, Wiley J, Perfect J. Invasive mould infections: a multi-disciplinary update. *Med Mycol*, 2009, 47, 571-583.
- Matsukuma S, Ohtsuka T, Kotaki H, Shirai H, Sano T, Watanabe K, Nakayama N, Itezono Y, Fujiu M, Shimma N, Yokose K, Okuda T. A new series of natural antifungals that inhibit P450 lanosterol C-14 demethylase. *J Antibiot*, 1991, 45, 151-159.
- Meyer HW, Wurtz H, Suadican P, Valbjorn O, Sigsgaard T, Gyntelberg F. Molds in floor dust and building-related symptoms in adolescent school children. *Indoor Air*, 2004, 14, 65-72.
- Milićević D, Jurić V, Stefanović S, Jovanović M, Janković S. Survey of slaughtered pigs for occurrence of ochratoxin A and porcine nephropathy in Serbia. *Int J Mol Sci*, 2008, 9, 2169-2183.
- Myoken Y, Sugata T, Fujita Y, Kyo T, Fujihara M, Kohara T, Katsu M, Mikami Y. Molecular epidemiology of invasive stomatitis due to *Aspergillus flavus* in patients with acute leukemia. *J Oral Pathol Med*, 2003, 32, 215-218.
- New York City Department of Health and Mental Hygiene. Guidelines on Assessment and Remediation of Fungi in Indoor Environments, November 2008,

<https://www1.nyc.gov/assets/doh/downloads/pdf/epi/epi-mold-guidelines.pdf>, pristupljeno 1. 7. 2019.

Nielsen KF, Hold G, Uttrup LP, Nielsen PA. Mould growth on building materials under low water activities. Influence of humidity and temperature on fungal growth and secondary metabolism. *Int Biodeter Biodegr*, 2004, 54, 325-336.

Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Pastore D, Picardi M, Bonini A, Chierichini A, Fanci R, Carmatti C, Invernizzi R, Mattei D, Mitra ME, Melillo L, Aversa F, van Lint MT, Falcucci P, Valentini CG, Girmenia C, Nosari A. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Hematol J*, 2006, 91, 1068-1075.

Pariza MW, Johnson EA. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: Update for a new century. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2001, 33, 173-186.

Park D. Phylloplane fungi: tolerance of hyphal tips to drying. *Trans Br Mycol Soc*, 1982, 79, 174-178.

Park JH, Cox-Ganser J, Rao C, Kreiss K. Fungal and endotoxin measurements in dust associated with respiratory symptoms in a water-damaged office building. *Indoor Air*, 2006, 16, 192-203.

Pasqualotto AC, Denning DW. Post-operative aspergillosis. *Clin Microbiol Infect*, 2006, 12(11), 1060-1076.

Paterson RRM, Lima N. Filamentous Fungal human pathogens from food emphasising *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucor*. *Microorganisms*, 2017, 5, 44.

Pavlović NM. Balkan endemic nephropathy-current status and future perspectives. *Clin Kidney J*, 2013, 6, 257-265.

Peterson SW. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia*, 2008, 100, 205–226.

- Pitt JI, Hocking AD. The ecology of fungal food spoilage. U: Fungi and food spoilage, Pitt JI, Hocking AD, urednici, London, Blackie academic and professional, 1997, str. 3-9.
- Ponce-Caballero C, Cerón-Palma IM, López-Pacheco M, Gamboa-Marrufo M, Quintal-Franco C. Indoor-outdoor fungal-aerosols ratios of domestic homes in Merida, Mexico. *Ingeniería*, 2010, 14, 169-175.
- Pozzi CR, Correa B, Xavier JG, Direito GM, Orsi RB, Matarazzo SV. Effects of prolonged oral administration of fumonisin B1 and aflatoxin B1 in rats. *Mycopathologia*, 2001, 151, 21-27.
- Pravilnik o kakvoći stočne hrane, 1998, Zagreb, Narodne novine, broj 26 (NN/26/98).
- Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B. Food and indoor fungi. 2010, CBS Laboratory manual series.
- Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol*, 2014, 78, 141–173.
- Silva DM, Batista LR, Rezende EF, Fungaro MHP, Sartori D, Alves E. Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *Nigri* using polyphasic Taxonomy. *Braz J Microbiol*, 2011, 42, 761-773.
- Singh N, Paterson DL. *Aspergillus* infections in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18, 44-69.
- Sivakumar V, Thanislass J, Niranjali S, Devaraj H. Lipid peroxidation as a possible secondary mechanism of sterigmatocystin toxicity. *Hum Exp Toxicol*, 2001, 20, 398-403.
- Sydenham EW, Shepard GS, Thiel PG, Marasa WFO, Stockenstrom S. Fumonsin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J. Agric. J Agric Food Chem*, 1991, 39, 2014-2018.
- Takahata Y, Hiruma M, Sugita T, Muto M. A case of onychomycosis due to *Aspergillus sydowii* diagnosed using DNA sequence analysis. *Mycoses*, 2007, 51, 170-173.

- U.S. Environmental protection agency. Additional measures can be taken to prevent deaths and serious injuries from residential fumigations, December 2016, <https://www.epa.gov/office-inspector-general/report-additional-measures-can-be-taken-prevent-deaths-and-serious-injuries>, pristupljeno 1. 7. 2019.
- van Burik JAH, Colven R, Spach DH. Cutaneous aspergillosis. *J Clin Microbiol*, 1998, 36, 3115-3121.
- Varga J, Frisvad JC, Samson RA. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Stud Mycol*, 2011, 69, 57-80.
- Viitanen H, Vinha J, Salminen K, Ojanen T, Peuhkuri R, Paajanen L, Lähdesmäki K. Moisture and bio-deterioration risk of building materials and structures. *J Bldg Phys*, 2010, 33, 201-224.
- Visagie CM, Varga J, Houbraken J, Meijer M, Kocsube S, Yilmaz N, Fotedar R, Seifert KA, Frisvad JC, Samson RA. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow *Aspergilli* (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Stud Mycol*, 2014, 78, 1-61.
- WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould, WHO Guidelines for Indoor Air Quality, 2009., <https://www.who.int/airpollution/guidelines/dampness-mould/en/>, pristupljeno 1. 7. 2019.

## 8. SAŽETAK

Poplava u Gunji, selu na istoku Hrvatske, uništila je mnoge domove 2014. godine te uzrokovala promjene u kvantitativnom i kvalitativnom sastavu plijesni u različitim supstratima, uključujući prašinu i hranu. Obzirom na njihov alergijski, invazivni i mikotoksinogeni potencijal od osobitog su javnozdravstvenoga značaja aspergili iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores*, koje mogu biti prisutne kako u zatvorenim prostorima tako i u hrani za ljude i životinje.

Kako bi odredili kvantitativni i kvalitativni sastav plijesni u prašini i žitaricama nakon poplave, u veljači 2017. godine prikupljena je prašina u neobnovljenim (N = 5) i obnovljenim (N = 6) lokacijama u Gunji (kuće i škola) kao i uzorci žitarica (N = 6). Također su prikupljeni i kontrolni uzorci prašine i žitarica u Gornjem Stupniku (N = 5).

Koncentracije plijesni u prašini, među kojima je najviše bilo plijesni roda *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *Cladosporium* spp., bile su oko tri puta veće na neobnovljeni lokacijama nego na kontrolnim lokacijama, a koncentracije aspergila bile su i do dvadeset puta veće u odnosu na one u kontrolnim uzorcima prašine ( $3,1 \times 10^5 \pm 10,4 \times 10^5$  CFU/g). Iako je ukupna koncentracija plijesni u prašini s obnovljenih lokacija bila niža u odnosu na kontrolne uzorke, koncentracije aspergila su bile oko 1,6 puta više ( $4,1 \times 10^4 \pm 7,9 \times 10^4$  CFU/g).

Na temelju morfoloških obilježja trideset i jedan izolat aspergila raspoređen je po sekcijama (*Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores*), a identifikacija do razine vrste provedena je na temelju analize genskih slijedova dijela gena za kalmodulin (*CaM*). Identificirane vrste aspergila bile su: *A. ochraceus* i *A. ostianus* iz sekcije *Circumdati* (4/31), *A. flavus* iz sekcije *Flavi* (7/31), *A. tubingensis* i *A. welwitschiae* iz sekcije *Nigri* (14/31) te vrste *A. amoenus*, *A. jensenii*, *A. protuberus* i *A. sydowii* iz sekcije *Versicolores* (8/31). Dominirali su aspergili iz sekcije *Versicolores*, osobito u prašini prikupljenoj na neobnovljenim lokacijama gdje su im koncentracije dosezale  $2,27 \times 10^3 \pm 2,44 \times 10^3$  CFU/g.

Koncentracije plijesni u žitaricama bile su slične na obe lokacije ( $6,25 \times 10^2 \pm 1,04 \times 10^3$  CFU/g u Gunji i  $4,69 \times 10^2 \pm 7,28 \times 10^2$  CFU/g u Gornjem Stupniku). Međutim, koncentracije aspergila su bile do tri puta više u žitaricama iz Gunje ( $6,25 \times 10^2 \pm 1,04 \times 10^3$  CFU/g). Samo je jedan izolat aspergila iz sekcije *Nigri* (*A. welwitschiae*) detektiran u pšenici iz Gunje, a u kukuruзу iz Gornjeg Stupnika dva izolata aspergila iz sekcije *Flavi* (*A. flavus*) detektirani su u kukuruзу.

Identificirani aspergili iz prašine i hrane potencijalni su proizvođači mikotoksina, uključujući okratoksine, aflatoksine, fumonizine i sterigmatocistin te time pridonose štetnim učincima na zdravlje ljudi bilo uslijed inhalacije kontaminirane prašine ili ingestije kontaminirane hrane.

KLJUČNE RIJEČI: poplava, plijesni u prašini, plijesni u hrani, *CaM*, aspergili, *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri*, *Versicolores*



## 9. SUMMARY

The flood in Gunja, a village in Eastern Croatia, destroyed many homes in 2014 and affected the change in quantitative and qualitative compositions of molds in different substrates, including dust and grains. Because of their allergic and invasive potential and the secretion of mycotoxins, the Aspergilli from the sections *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* and *Versicolores*, ubiquitous both in water damaged indoor environments and grains, are important to investigate. To assess post-flood qualitative and quantitative composition of dustborne and foodborne moulds, in February 2017 the samples of house dust were collected from unrepaired (N = 5) and repaired locations (N = 6) in Gunja (houses and a school) and from control locations (houses and schools) in Gornji Stupnik (N = 6). Additionally, the samples of grains were collected in Gunja (N = 6) and Gornji Stupnik (N = 6). The concentrations of dustborne moulds, namely *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *Cladosporium* spp., from unrepaired locations in Gunja were about three times higher while the concentrations of dustborne Aspergilli were up to twenty times higher than in control samples ( $3.1 \times 10^5 \pm 10.4 \times 10^5$  CFU/g). The concentrations of dustborne moulds were up to six times lower in the samples from repaired locations than in control samples, but the concentrations of Aspergilli were 1.6 times higher than in control samples ( $4.1 \times 10^4 \pm 7.9 \times 10^4$  CFU/g). After the morphological analysis, thirty-one Aspergilli were isolated and selected for identification based on partial calmodulin sequences (*CaM*). Aspergilli from the section *Versicolores* dominated among the Aspergilli of interest, especially in the dust from unrepaired locations where their concentrations were up to  $2.27 \times 10^3 \pm 2.44 \times 10^3$  CFU/g. Based on partial *CaM* sequences a total of 31 dustborne Aspergilli were isolated and identified to the species level: *A. ochraceus* and *A. ostianus* from the section *Circumdati* (4/31), *A. flavus* from the section *Flavi* (7/31), *A. tubingensis* and *A. welwitschiae* from the section *Nigri* (14/31) and *A. amoenus*, *A. jensenii*, *A. protuberus* and *A. sydowii* from the section *Versicolores* (8/31).

The concentrations of foodborne moulds were similar in the grains collected in Gunja and Gornji Stupnik ( $6.25 \times 10^2 \pm 1.04 \times 10^3$  CFU/g and  $4.69 \times 10^2 \pm 7.28 \times 10^2$  CFU/g, respectively). However, the concentrations of foodborne Aspergilli were up to three times higher in the grains from Gunja than in those from Gornji Stupnik ( $6.25 \times 10^2 \pm 1.04 \times 10^3$  CFU/g). Only one isolate assigned to the *Aspergillus* section *Nigri* was isolated from wheat collected in Gunja and identified to *A. welwitschiae*, while two isolates assigned to the *Aspergillus* section *Flavi* were isolated from corn collected in Gornji Stupnik and identified to *A. flavus*.

The identified dustborne and foodborne *Aspergilli* may produce mycotoxins including ochratoxins, aflatoxins, fumonisins and sterigmatocystin, and thus contribute to possible adverse health effects either upon the inhalation of contaminated dust or the ingestion of contaminated food.

**KEYWORDS:** flood, dustborne moulds, foodborne moulds, *CaM*, *Aspergilli*, *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri*, *Versicolores*

## Plijesni u prašini i žitaricama nakon poplave u Gunji

Filip Šmalcelj

### SAŽETAK

Poplava u Gunji, selu na istoku Hrvatske, uništila je mnoge domove 2014. godine te uzrokovala promjene u kvantitativnom i kvalitativnom sastavu plijesni u različitim supstratima, uključujući prašinu i hranu. Obzirom na njihov alergijski, invazivni i mikotoksinogeni potencijal od osobitog su javnozdravstvenoga značaja aspergili iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores*, koje mogu biti prisutne kako u zatvorenim prostorima tako i u hrani za ljude i životinje. Kako bi odredili kvantitativni i kvalitativni sastav plijesni u prašini i žitaricama nakon poplave, u veljači 2017. godine prikupljena je prašina u neobnovljenim (N = 5) i obnovljenim (N = 6) lokacijama u Gunji (kuće i škola) kao i uzorci žitarica (N = 6). Također su prikupljeni i kontrolni uzorci prašine i žitarica u Gornjem Stupniku (N = 5). Koncentracije plijesni u prašini, među kojima je najviše bilo plijesni roda *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *Cladosporium* spp., bile su oko tri puta veće na neobnovljeni lokacijama nego na kontrolnim lokacijama, a koncentracije aspergila bile su i do dvadeset puta veće u odnosu na one u kontrolnim uzorcima prašine ( $3,1 \times 10^5 \pm 10,4 \times 10^5$  CFU/g). Iako je ukupna koncentracija plijesni u prašini s obnovljenih lokacija bila niža u odnosu na kontrolne uzorke, koncentracije aspergila su bile oko 1,6 puta više ( $4,1 \times 10^4 \pm 7,9 \times 10^4$  CFU/g).

Na temelju morfoloških obilježja trideset i jedan izolat aspergila raspoređen je po sekcijama (*Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores*), a identifikacija do razine vrste provedena je na temelju analize genskih slijedova dijela gena za kalmodulin (*CaM*). Identificirane vrste aspergila bile su: *A. ochraceus* i *A. ostianus* iz sekcije *Circumdati* (4/31), *A. flavus* iz sekcije *Flavi* (7/31), *A. tubingensis* i *A. welwitschiae* iz sekcije *Nigri* (14/31) te vrste *A. amoenus*, *A. jensenii*, *A. protuberus* i *A. sydowii* iz sekcije *Versicolores* (8/31). Dominirali su aspergili iz sekcije *Versicolores*, osobito u prašini prikupljenoj na neobnovljenim lokacijama gdje su im koncentracije dosežale  $2,27 \times 10^3 \pm 2,44 \times 10^3$  CFU/g.

Koncentracije plijesni u žitaricama bile su slične na obe lokacije ( $6,25 \times 10^2 \pm 1,04 \times 10^3$  CFU/g u Gunji i  $4,69 \times 10^2 \pm 7,28 \times 10^2$  CFU/g u Gornjem Stupniku). Međutim, koncentracije aspergila su bile do tri puta više u žitaricama iz Gunje ( $6,25 \times 10^2 \pm 1,04 \times 10^3$  CFU/g). Samo je jedan izolat aspergila iz sekcije *Nigri* (*A. welwitschiae*) detektiran u pšenici iz Gunje, a u kukuruzu iz Gornjeg Stupnika dva izolata aspergila iz sekcije *Flavi* (*A. flavus*) detektirani su u kukuruzu.

Identificirani aspergili iz prašine i hrane potencijalni su proizvođači mikotoksina, uključujući okratoksine, aflatoksine, fumonizine i sterigmatocistin te time pridonose štetnim učincima na zdravlje ljudi bilo uslijed inhalacije kontaminirane prašine ili ingestije kontaminirane hrane.

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

Rad sadrži: 45 stranica, 11 grafičkih prikaza, 7 tablica i 75 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: poplava, plijesni u prašini, plijesni u hrani, *CaM*, aspergili, *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri*, *Versicolores*

Mentor: **Dr. sc. Daniela Jakšić**, asistentica-poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Daniela Jakšić**, asistentica-poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2019.

## POST-FLOOD DUSTBORNE AND FOODBORNE MOULDS

Filip Šmalcelj

### SUMMARY

The flood in Gunja, a village in Eastern Croatia, destroyed many homes in 2014 and affected the change in quantitative and qualitative compositions of molds in different substrates, including dust and grains. Because of their allergic and invasive potential and the secretion of mycotoxins, the Aspergilli from the sections *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* and *Versicolores*, ubiquitous both in water damaged indoor environments and grains, are important to investigate. To assess post-flood qualitative and quantitative composition of dustborne and foodborne moulds, in February 2017 the samples of house dust were collected from unrepaired (N = 5) and repaired locations (N = 6) in Gunja (houses and a school) and from control locations (houses and schools) in Gornji Stupnik (N = 6). Additionally, the samples of grains were collected in Gunja (N = 6) and Gornji Stupnik (N = 6). The concentrations of dustborne moulds, namely *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *Cladosporium* spp., from unrepaired locations in Gunja were about three times higher while the concentrations of dustborne Aspergilli were up to twenty times higher than in control samples ( $3.1 \times 10^5 \pm 10.4 \times 10^5$  CFU/g). The concentrations of dustborne moulds were up to six times lower in the samples from repaired locations than in control samples, but the concentrations of Aspergilli were 1.6 times higher than in control samples ( $4.1 \times 10^4 \pm 7.9 \times 10^4$  CFU/g). After the morphological analysis, thirty-one Aspergilli were isolated and selected for identification based on partial calmodulin sequences (*CaM*). Aspergilli from the section *Versicolores* dominated among the Aspergilli of interest, especially in the dust from unrepaired locations where their concentrations were up to  $2.27 \times 10^3 \pm 2.44 \times 10^3$  CFU/g. Based on partial *CaM* sequences a total of 31 dustborne Aspergilli were isolated and identified to the species level: *A. ochraceus* and *A. ostianus* from the section *Circumdati* (4/31), *A. flavus* from the section *Flavi* (7/31), *A. tubingensis* and *A. welwitschiae* from the section *Nigri* (14/31) and *A. amoenus*, *A. jensenii*, *A. protuberus* and *A. sydowii* from the section *Versicolores* (8/31).

The concentrations of foodborne moulds were similar in the grains collected in Gunja and Gornji Stupnik ( $6.25 \times 10^2 \pm 1.04 \times 10^3$  CFU/g and  $4.69 \times 10^2 \pm 7.28 \times 10^2$  CFU/g, respectively). However, the concentrations of foodborne Aspergilli were up to three times higher in the grains from Gunja than in those from Gornji Stupnik ( $6.25 \times 10^2 \pm 1.04 \times 10^3$  CFU/g). Only one isolate assigned to the *Aspergillus* section *Nigri* was isolated from wheat collected in Gunja and identified to *A. welwitschiae*, while two isolates assigned to the *Aspergillus* section *Flavi* were isolated from corn collected in Gornji Stupnik and identified to *A. flavus*.

The identified dustborne and foodborne Aspergilli may produce mycotoxins including ochratoxins, aflatoxins, fumonisins and sterigmatocystin, and thus contribute to possible adverse health effects either upon the inhalation of contaminated dust or the ingestion of contaminated food.

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

Thesis includes: 45 pages, 11 figures, 7 tables and 75 references. Original is in Croatian language.

Keywords: flood, dustborne moulds, foodborne moulds, *CaM*, Aspergilli, *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri*, *Versicolores*

Mentor: **Daniela Jakšić, Ph.D.** *Postdoctoral research and teaching assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Daniela Jakšić, Ph.D.** *Postdoctoral research and teaching assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**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

The thesis was accepted: July 2019.