

# Identifikacija plijesni roda *Aspergillus* iz uzoraka zraka nakon poplave

---

Durbek, Jelena

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:094420>

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

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



*Repository / Repozitorij:*

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



**Jelena Durbek**

**Identifikacija plijesni roda *Aspergillus* iz uzoraka  
zraka nakon poplave**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019. godina

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Mikrobiologija s parazitologijom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za mikrobiologiju pod stručnim vodstvom dr. sc. Daniele Jakšić, više asistentice-poslijedoktorandice.

Rezultati ovog rada su dio znanstveno-istraživačkog projekta (Štetni učinci pojedinačnih i kombiniranih mikotoksina *Aspergillus* vrsta – MycotoxA; IP-09-2014-5982) kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost (HRZZ).

Zahvaljujem se svojoj mentorici dr. sc. Danieli Jakšić na stručnom vodstvu, iznimnoj susretljivosti i potpori te ostalim zaposlenicima Zavoda za mikrobiologiju koji su mi olakšali boravak i rad na Zavodu. Također zahvaljujem svojoj obitelji, prijateljima i kolegama iz CPSA-e na potpori i razumijevanju bez kojih ovaj rad ne bi ugledao svjetlo dana.

# SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
1.1.	POPLAVA U GUNJI 2014. GODINE .....	1
1.2.	PLIJESNI RODA <i>ASPERGILLUS</i> I UTJECAJ NA LJUDSKO ZDRAVLJE .....	1
1.2.1.	<i>ASPERGILLUS</i> VRSTE IZ SEKCIJE <i>NIGRI</i> .....	3
1.2.2.	<i>ASPERGILLUS</i> VRSTE IZ SEKCIJE <i>CIRCUMDATI</i> .....	4
1.2.3.	<i>ASPERGILLUS</i> VRSTE IZ SEKCIJE <i>FLAVI</i> .....	6
2.	OBRAZLOŽENJE TEME .....	8
3.	MATERIJALI I METODE .....	9
3.1.	PRIPREMA IZOLATA PLIJESNI RODA <i>ASPERGILLUS</i> IZ UZORAKA ZA ANALIZU .....	9
3.2.	IZOLACIJA GENOMSKE DNA IZ FILAMENTOZNIH GLJIVICA.....	10
3.3.	DETEKCIJA DNA GEL ELEKTROFOREZOM .....	11
3.4.	LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE, PCR.....	13
3.5.	MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA <i>ASPERGILLUS</i> VRSTA ANALIZOM GENSKIH SLJEDOVA .....	15
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	16
4.1.	BIOLOŠKA RAZNOLIKOST VRSTA RODA <i>ASPERGILLUS</i> U UZORCIMA ZRAKA NA POJEDINIM LOKACIJAMA .....	16
4.2.	ASPERGILI IZ SEKCIJE <i>NIGRI</i> .....	18
4.3.	ASPERGILI IZ SEKCIJE <i>CIRCUMDATI</i> .....	19
4.4.	ASPERGILI IZ SEKCIJE <i>FLAVI</i> .....	20
5.	ZAKLJUČCI.....	22
6.	LITERATURA.....	23
7.	SAŽETAK.....	30
8.	SUMMARY .....	31

# 1. UVOD

## 1.1. POPLAVA U GUNJI 2014. GODINE

Godina 2014. zabilježena je kao godina s rekordnim brojem poplava u Republici Hrvatskoj (Marušić, 2014). Intenzivne oborine uzrokovane su višednevnim zadržavanjem jake i duboke ciklone iznad jugoistočne Europe; na područje Bosne i Hercegovine, Srbije te istočne Hrvatske pale su velike količine kiše, više od 200 litara u nekoliko dana, što je na tim područjima rezultiralo katastrofalnim poplavama, najvećim u do sada zabilježenoj povijesti (Kuspilić i sur., 2014), a vodni val sredinom svibnja 2014. godine zabilježen je kao 1000-godišnji računsko-hidrološki na donjem toku Save. Veći dio maksimalnih vodnih količina i vodostaja na Savi je posljedica iznimno velike količine oborina u Bosni i Hercegovini, nastao i radi ekstremnih dotoka vode iz njenih pritoka: Une, Ukrine, a poglavito rijeke Bosne i Vrbasa (Marušić, 2014; klima.hr). Visoki vodostaji na postajama Slavonski Šamac, Županja i Gunja izravna su posljedica dotoka rijeke Bosne. U tom razdoblju na hidrološkim su postajama donje Save registrirani najveći vodostaji u povijesti mjerenja (Kuspilić i sur., 2014). Dosadašnji maksimalno registrirani protoci za područje donje Save bili su reda veličina od 3500 do 4000 m<sup>3</sup>/s, dok je dana 17. svibnja 2014. DHMZ kod Slavanskog Šamca izmjerio protok u iznosu od Q=6000 m<sup>3</sup>/s što premašuje dosadašnje maksimume za oko 50 posto (klima.hr). Na hidrološkoj postaji Gunja, povijesni maksimum vodostaja (H<sub>max</sub>), izmjeren 2012. godine, iznosio je 690 cm, a nepredvidive razorne posljedice poplave u Gunji se mogu pripisati gotovo dvostruko većem izmjerenom vodostaju od 1173 cm (Kuspilić i sur., 2014). S obzirom na dugotrajnu zasićenost tla i zraka vodom, kako je svih 3206 hektara površine općine Gunja završilo pod vodom, za očekivati je određene promjene u ekosustavu, između ostalog i sastav te brojnost plijesni (Kratofil, 2014).

## 1.2. PLIJESNI RODA *ASPERGILLUS* I UTJECAJ NA LJUDSKO ZDRAVLJE

Vrste roda *Aspergillus* su ubikvitarne filamentozne gljivice (plijesni) međusobno različitih morfoloških, fizioloških i filogenetičkih svojstava, čija iznimna raznolikost proizlazi iz 344 različitih vrsta do danas opisanih plijesni široko rasprostranjenih po cijelom svijetu (Samson i

sur., 2014). Veliki značaj aspergila razvidan je iz njihove uloge u biotehnološkoj, prehrambenoj i kemijskoj industriji; primjerice korištenje plijesni vrste *Aspergillus oryzae* u Aziji za proizvodnju tradicionalnih fermentiranih pića i umaka (www.huffpost.com), *Aspergillus terreus* koristio za proizvodnju hipolipemika lovastatina (Jahromi i sur., 2012), dok je *Aspergillus niger* najveći komercijalni izvor limunske kiseline te nekolicine rekombinantnih enzima (Show i sur., 2015). Zbog sveprisutnosti aspergila u tlu, vodi, zraku i prašini, neke vrste predstavljaju značajne kontaminante hrane, građevinskih materijala, tekstila te mogu negativno utjecati na ljudsko zdravlje zbog svojeg invazivnog potencijala kao uzročnici infektivnih, alergijskih bolesti te tvorbom mikotoksina i drugih sekundarnih metabolita (Pitt i Hocking, 2009; Klich, 2006). S obzirom na to da su plijesni sastavni dio bioaerosola, i kao takve iz vanjskog zraka ulaze u zatvorene prostore, nemoguće ih je potpuno ukloniti u zatvorenom prostoru (Ponce-Caballer i sur., 2010). Rast plijesni u unutrašnjim prostorima u kojima ljudi borave ponajviše ovisi o dostupnosti vode, uzevši u obzir da samo slobodna voda može sudjelovati u reakcijama metabolizma (Adams i Moss, 2008). Fizikalni parametar koji kvantificira odnos između vlage u hrani i količinu vode s kojom mikroorganizam raspolaže u reakcijama metabolizma, tzv. slobodne vode jest aktivitet vode u supstratu,  $a_w$  (Pitt i Hocking, 1997). Faktor aktiviteta vode je glavni čimbenik koji predviđa kontaminaciju plijesnima te ovisi o vrsti supstrata i temperaturi (Nielsen i sur., 2004). Što je duže aktivitet vode materijala iznad 0,75, veća je šansa pojave plijesni (Viitanen i sur., 2010). Minimalni aktivitet vode potreban za rast plijesni varira od manje od 0,80 do iznad 0,98 (WHO, 2009), dok se kserofilne plijesni mogu pojaviti pri aktivitetu vode materijala i od 0,45 (Park, 1982). Vrste roda *Aspergillus* spadaju u primarne i sekundarne kolonizatore te se kao takve mogu prilagoditi  $a_w$  vrijednosti ispod 0,80, što im omogućava rast u vlažnim unutrašnjim prostorima u većem postotku u odnosu na druge plijesni (Jakšić Despot i Šegvić Klarić, 2014). Plijesni se razmnožavaju otpuštajući spore u okolni zrak, koje dolaskom na površine pod odgovarajućim uvjetima kličaju i razvijaju nove kolonije. Za rast im je potreban izvor organskog materijala poput prirodnih vlakana (pamuk, vuna), papira, kože, drva, ili površinskih slojeva hrane, masnoće te zemlje i vlaga, što im omogućava veliku rasprostranjenost (Bode i Munson, 1995). Do povećanog rasta brojnih mikroorganizama, uključujući i plijesni, u unutarnjim prostorima može dovesti neadekvatna ventilacija, izolacija, sustav grijanja i klimatiziranja, kao i curenje cijevi i kondenzacija, ali i prirodne katastrofe poput poplava (WHO, 2009). S obzirom na to da je za sporulaciju plijesni potreban veći aktivitet vode nego za klijanje istih spora (Abellana i sur., 1999), elementarne nepogode poput poplave idealno su plodno tlo za razmnožavanje plijesni. Iako ne postoje usuglašene

smjernice sigurnih koncentracija plijesni u zraku za zatvorene prostore te se općenito ujednačenost sastava bioaerosola u zatvorenom prostoru i vanjskom okolišu smatra sigurnom za zdravlje ljudi (WHO, 2009), u izvještaju Europske agencije za okoliš (*engl. European Environment Agency, EEA*) o kvaliteti zraka u Europi iz 2017, lebdeće čestice veličine do 10 µm su svrstane u najvažnije polutante s obzirom na učinak na ljudsko zdravlje (EEA, 2017). Kako se veličina spora plijesni obično kreće između 1 i 10 µm, a dijelovi micelija koji se otpuštaju u zrak mogu čak biti i manji (Krishnan i sur., 2009), inhalacija ovih čestica predstavlja prijatnu ljudskom zdravlju uzorkovana mogućim odlaganjem u donji respiratorni trakt i interakcijom s tkivom pluća (Jakšić Despot i Šegvić Klarić, 2014).

### **1.2.1. ASPERGILLUS VRSTE IZ SEKCIJE NIGRI**

Sekcija *Nigri* roda *Aspergillus* obuhvaća 26 vrsta (Varga i sur., 2011), koje još nazivamo crnim aspergilima obzirom na karakteristične crne kolonije. Precizna identifikacija vrsta unutar sekcije *Nigri* predstavlja možda najzahtjevniju skupinu aspergila zbog sličnosti u morfologiji pojedinih izolata, značajnih razlika na razini gena te kemijski profil sekundarnih metabolita (Silva i sur., 2011). Aspergili iz sekcije *Nigri* su široko rasprostranjeni u okolišu te su prisutni na vrlo raznolikim supstratima uključujući tlo, žitarice, mliječne proizvode, stočnu hranu, razno voće, povrće, tekstilni materijal i mesne proizvode, a izolirani su i iz zraka unutrašnjih prostora, uključujući stanove, urede i industrijske pogone (Jakšić Despot i Šegvić Klarić, 2014; Jurjević i sur., 2012; Samson i sur., 2010; Varga i sur., 2011; Pitt i Hocking, 2009). Iako su zbog svoje sveprisutnosti jedan od najčešćih posrednika u kvarenju hrane (Pitt i Hocking, 1997), vrlo su značajni u biotehnologiji, medicinskoj mikologiji te mikologiji hrane. Zbog sposobnosti biosinteze hidrolitičkih enzima poput amilaze i lipaze kao i organskih kiselina (Varga i sur., 2011), koriste se u industrijskoj proizvodnji fermentiranih prehrambenih proizvoda, osobito vrsta *Aspergillus luchuensis* (Hong i sur., 2013); proizvodnji organskih kiselina poput limunske i glukonske kiseline (Adams i Moss, 2008); dok se u biotehnologiji primjenjuju sojevi *A. niger* s tzv. GRAS statusom (*engl. Generally Regarded As Safe*). Značajni su sa zdravstvenog stajališta kao uzročnici infekcija, posebno otomikoza (Szigeti i sur., 2012) i invazivnih aspergiloza, česti su uzročnici alergijskih reakcija, posebno tipa III i IV (Clemons i Richardson, 2016) te zbog proizvodnje dvije glavne skupine mikotoksina: okratoksina A (OTA) i fumonizina (Varga i sur., 2014; Jakšić Despot i Šegvić Klarić, 2014), čiji je glavni put unosa u organizam putem kontaminirane hrane, iako je moguć i inhalacijom (Jakšić Despot i Šegvić Klarić, 2014). Posebno su značajne vrste *A. niger*, kao i

vrlo srodna vrsta *A. welwitschiae* (ex. *A. awamorii*) koje dijele mogućnost biosinteze sličnih sekundarnih metabolita, među kojima se izdvajaju okratoksin A (OTA), piranonigrin A, tenzidol B, funalenon, malformini, nafto- $\gamma$ -pironi i fumonizini, od kojih poglavito fumonizin B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) (Jakšić Despot, 2016). Fumonizini, od kojih je najbolje istražen fumonizin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), su strukturno slični sfingozinu i sfinganinu, zbog čega su potentni inhibitori ceramid sintaze, koji imaju hepatotoksično, nefrotoksično i neurotoksično djelovanje koje se razlikuje ovisno o životinjskoj vrsti (Adams i Moss, 2008). Dosadašnja istraživanja upućuju na povezanost fumonizina s ezofagealnim karcinomom, pulmonalnim edemom kod svinja, leukoencefalomalacijama kod konja, s karcinomom i defektom neuralne cijevi kod eksperimentalnih glodavaca, s jetrenom i bubrežnom toksičnošću te karcinomom jetre (Varga i sur., 2010; Šegvić Klarić i sur., 2007), dok je OTA najpoznatiji kao nefrotoksin, iako su poznata i njegova imunosupresivna, oksidativna, teratogena i karcinogena svojstva te sposobnost interferencije s metabolizmom glukoze i procesima koagulacije krvi. Kukuruz se smatra glavnim izvorom fumonizina, dok se posebno visoke koncentracije povezuju s obilnim padalinama kojima prethode vruće i sušne vremenske prilike (Šegvić Klarić i sur., 2009; Šegvić i Pepeljnjak, 2001), zbog čega je posebno relevantno ispitivanje prisutnosti crnih aspergila u uzorcima zraka obrađenim u ovom istraživanju.

### **1.2.2. ASPERGILLUS VRSTE IZ SEKCIJE CIRCUMDATI**

Sekcija *Circumdati* roda *Aspergillus* uključuje 27 vrsta (Visagie i sur., 2014) koje proizvode različite sekundarne metabolite, npr. mikotoksine OTA, penicilinsku kiselinu, ksantomegnin, viomelein i vioksantin. Mnoge vrste plijesni te sekcije pokazuju važan ekonomski značaj; primjerice *A. ochraceus* i *A. sclerotiorum* se koriste za biokemijsku transformaciju steroida, alkaloida i fenazina (Chen i sur., 1994), dok su *A. sclerotiorum* i *A. melleus* važan izvor proteolitičkih enzima s antifungalnim svojstvima (Matsukuma i sur., 1991). Široko su rasprostranjene po cijelom svijetu, iako su češće prisutne u toplijim krajevima te ih nalazimo u tlu, na poljoprivrednim dobrima i uskladištenoj hrani. Uobičajeno kontaminiraju grah, začine, biljne droge i žitarice (Samson i sur., 2010), koje se osobito za vrste proizvođače OTA ističu kao najpogodniji supstrati (osobito riža, rjeđe pšenica i kukuruz), uz kavu i druge napitke poput vina, piva, soka od grožđa i mlijeka (Visagie i sur., 2014; Frisvad i sur., 2004; Abarca i sur., 2001). Aspergili iz sekcije *Circumdati* učestali su i u stambenim i radnim sredinama; iz uzoraka kućne prašine mogu se izolirati vrste *A. occultus*, *A. subramanianii*, *A. westerdijkiae* (Visagie i sur., 2014), dok se vrsta *A. sclerotiorum* izolirala iz zraka



prikupljenog u mlinu žitarica (Šegvić Klarić i sur., 2015). Neke vrste sekcije *Circumdati* su također izrazito značajne sa zdravstvenog stajališta; *A. ochraceus* i *A. sclerotiorum* uzročnici su onihomikoza, alergijske bronhopulmonalne aspergiloze i otomikoze kod ljudi i životinja (Zotti i sur., 2010; Harima i sur., 2004; Novey i Wells, 1978), dok je za 13 vrsta unutar sekcije dokazana proizvodnja OTA među kojima su najznačajnije *A. ochraceus*, *A. steynii* i *A. westerdijkiae* (Visagie, Varga, i sur., 2014). Proizvođače OTA nalazimo i među aspergilima drugih sekcija (sekcija *Nigri*), kao i drugim rodovima plijesni (*Penicillium* spp., *Petromyces* spp. i sl.), dok *A. ochraceus* može proizvoditi OTA čak i u nestašici nutrijenata (Lai i sur., 1970). OTA je prvi put izoliran u Južnoafričkoj Republici kao metabolit vrste *A. ochraceus*, i dokazani je karcinogen u životinja. Svjetska agencija za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer, IARC*) svrstala ga je u skupinu 2B kao mogući humani karcinogen (Hope i Hope, 2012), čiji se mehanizam objašnjava genotoksičnim učinkom i oksidacijskim stresom (Šegvić Klarić i sur., 2010; Šegvić Klarić i sur., 2007). Osim toga, OTA je potentni nefrotoksin te ima imunosupresivni i teratogeni učinak (Siqueira i sur., 2017; Bui-Klimke i Wu, 2015). Kontaminacija ovim mikotoksinom je proučena na žitaricama i u mesu (Adams i Moss, 2008) te je posebno zabilježena akumulacija u svinjskom mesu na našim prostorima. Konzumiranje takvog mesa kroz dulji vremenski period može dovesti do endemske nefropatije (Milićević i sur., 2008), primjerice balkanske endemska nefropatije. To je jedinstvena kronična bolest nefrona dugog inkubacijskog perioda u kojoj je OTA jedan od etioloških čimbenika, a ime je dobila zbog primijećene visoke prevalencije u balkanskim zemljama (Pavlović, 2013). Međutim i inhalacija OTA može se nepovoljno odraziti na zdravlje ljudi. Vrsta plijesni *A. flavus*, izvor mikotoksina aflatoksina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), je uz *A. ochraceus* česti kontaminant žitarica, pa se posljedično u silosima žitarica i mlinovima može naći povećana koncentracija njihovih aerogenih čestica. U uvjetima preopterećenosti zraka plijesnima koje proizvode okratoksin A, kod profesionalno izloženih radnika može doći do akutnog zatajenja bubrega (Di Paolo i sur., 1994), dok je kod ljudi koji borave u vlažnim stanovima dokazana uzročno-posljedična veza između inhalacije OTA i glomeruloskleroze (Hope i Hope, 2012). Povećane koncentracije OTA su detektirane u urinu ljudi koji žive u vodom oštećenim prostorima, dok je kod kontrolne skupine koncentracija OTA bila ispod granice detekcije (Hooper i sur., 2009), radi čega je važno ispitati uzorke zraka u ovom istraživanju na prisutnost aspergila iz sekcije *Circumdati*.

### 1.2.3. ASPERGILLUS VRSTE IZ SEKCIJE FLAVI

Sekcija *Flavi* roda *Aspergillus* je od velikog značaja u biotehnologiji hrane i zdravstvenoj industriji (Varga i sur., 2011); izolati vrsta poput *A. oryzae*, *A. sojae* i *A. tamarii* se koriste prilikom fermentacije orijentalne hrane te kao vektori genske ekspresije (Campbell-Platt i Cook, 1989). Biotehnološki značajni su genetski modificirani sojevi vrste *A. oryzae*, koji se koriste za proizvodnju enzima uključujući laktaze, pektin esteraze, lipaze, proteaze i ksilanaze (Pariza i Johnson, 2001). Različite plijesni iz sekcije *Flavi* su prisutne u tlu, zraku, prašini, vodi i na brojnim prehrambenim namirnicama poput plodova kikirikija, oraha, badema, lješnjaka, kakaovca, na žitaricama poput kukuruza, zobi i pšenice, na sjemenkama pamuka i suhog voća (Frisvad i Larsen, 2015; Varga i sur., 2011). Velik broj vrsta sekcije *Flavi* proizvodi mikotoksine poput nitropropionske, tenuazoične i ciklopiazonske kiseline te aflatoksine od kojih je najznačajniji AFB<sub>1</sub> (Varga i sur., 2011). Aflatoksini su poznati hepatotoksični mikotoksini s kancerogenim, genotoksičnim i teratogenim učincima u ljudi i životinja (Bennett i Klich, 2003), a oko 7% aerogenih izolata *A. flavus* proizvodi AFB<sub>1</sub> čija koncentracija u aeromikočesticama može iznositi čak 600 µg/g (Krishnan i sur., 2009; Vujanović i sur., 2001). AFB<sub>1</sub> smatra se najpotentnijim prirodnim karcinogenom te spada u skupinu 1A prema klasifikaciji Svjetske agencije za istraživanje raka (IARC, 1993), pokazuje izrazitu fizikalno-kemijsku stabilnost, apsorbira se putem probavnog, dišnog sustava, kože i sluznica, a najznačajnijim proizvođačima smatraju se *A. flavus* i *A. parasiticus* koji uspijevaju na gotovo svim usjevima (Frisvad i Larsen, 2015; Varga i sur., 2011). Osim karcinogenog djelovanja, aflatoksini su također mutageni, teratogeni, hepatotoksični, nefrotoksični, djeluju imunosupresivno te dovode do krvarenja u gastrointestinalnom traktu i bubrezima (Klich, 2009; Krishnan i sur., 2009). Karcinogena svojstva AFB<sub>1</sub> dominantno proizlaze iz metaboličke aktivacije oksidativnim djelovanjem citokrom P450 enzimskog sustava domaćina u izrazito reaktivni epoksidni oblik (AFB<sub>1</sub>-egzo-8,9-epoksid). On se može vezati na proteine i DNA (Bennett i Klich, 2003), poglavito na kodonu 249 p53 tumor supresorskog gena (Shirabe i sur., 2011; Deng i Ma, 1998; McConnell i Garner, 1994; Puisieux i sur., 1991), čija je mutacija jedna od najčešćih kod ljudi s hepatocelularnim karcinomom povezanim s visokom razinom AFB<sub>1</sub> u hrani (Wang i Groopman, 1999), što podupire hipotezu o njegovoj značajnoj ulozi u inicijaciji hepatokancerogeneze. Osim ingestije hranom, inhalacija predstavlja značajan put izloženosti aflatoksinima (Krishnan i sur., 2009; Brera i sur., 2002; Selim i sur., 1998). Mutantne varijante p53 i protoonkogeni ras utvrđene u uzorcima ljudskih karcinoma pluća (Lehman i sur., 1991) te je uzročno-posljedična veza kontaminacije aflatoksikogenim vrstama i

karcinoma pluća utvrđena kod radnika zaposlenih u obradi kikirikija i sjemenki lana (Hayes i sur., 1984) i kod radnika u obradi proizvoda na bazi kukuruza (Wang i Liu, 2007; Liao i Chen, 2005). S obzirom na prisutnost AFB<sub>1</sub> u inhalabilnoj prašini (Ghosh i sur., 1997) i istraživanja njegove toksičnosti nakon inhalacije aerogenih mikročestica plijesni koje iz proizvode, značajno je ispitivanje prisutnosti aspergila iz sekcije *Flavi* u uzorcima zraka.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Plijesni roda *Aspergillus* unutar sekcija *Nigri*, *Circumdati* i *Flavi* predstavljaju potencijalnu opasnost po ljudsko zdravlje kao uzročnici infektivnih i alergijskih bolesti te zbog toksičnog djelovanja njihovih sekundarnih metabolita, mikotoksina. S obzirom na povećanu dostupnost vode u unutrašnjim i vanjskim prostorima nakon poplave te činjenicu da se aspergili mogu prilagoditi nižoj  $a_w$  vrijednosti u odnosu na neke druge plijesni, omogućen im je rast u većoj zastupljenosti u vlažnim unutrašnjim prostorima u kojima ljudi borave i rade. Veličina spora plijesni i dijelova micelija koji se otpuštaju u zrak im omogućava odlaganje u respiratorni trakt nakon inhalacije, a njihova povećana koncentracija u vlažnim prostorima predstavlja direktnu opasnost po zdravlje. Kako bi se procijenio zdravstveni rizik za stanovnike Gunje nakon poplave, ciljevi ovog rada su:

- na temelju analize genskih sljedova dijela gena za kalmodulin (*CaM*) provesti identifikaciju do razine vrste aspergila izoliranih iz uzoraka zraka
- istražiti bioraznolikost plijesni roda *Aspergillus* izoliranih iz uzoraka zraka prikupljenih u Gunji tijekom 2016. godine te usporediti s izolatima iz zraka s kontrolnih lokacija u Gornjem Stupniku
- procijeniti rizik za zdravlje ljudi koji borave u prostorima povećane vlažnosti s obzirom na kvalitativni sastav plijesni

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. PRIPREMA IZOLATA PLIJESNI RODA *ASPERGILLUS* IZ UZORAKA ZA ANALIZU

#### **Kemikalije i hranjive podloge:**

- Medij za trajno čuvanje kultura plijesni (glicerol:voda, 1:1 v/v)
- Czapek-agar s 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 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

Krute supstance su otopljene u 1 L destilirane vode, a priređena otopina je sterilizirana autoklaviranjem (121 °C, 15 min).

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

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

#### **Uredaji:**

- Autoklav (φ 300 x 500, Sutjeska, Beograd, Srbija)

Nakon odmrzavanja uzoraka (N=23) pohranjenih u mediju za trajno čuvanje kultura plijesni, provedena je inokulacija 10 μL svakog uzorka na CYA čvrste hranjive podloge u komori za izolaciju plijesni, nakon čega su uzorci inkubirani na 25 °C u mraku kroz tri dana. Svaki od tako dobivenih izolata iz čiste kulture na CYA hranjivim podlogama je reinokuliran u komori za izolaciju plijesni u 1 mL tekućeg medija za izolaciju DNA te inkubiran u mraku kroz tri dana na 25 °C. Inokulacije su provedene u komori steriliziranoj UVC germicidnom lampom uz plamenik uz upotrebu zaštitnih sredstava (kuta, rukavice). Iz micelija poraslih u tekućem mediju je proveden postupak izolacije genomske DNA.

Uzorci obrađeni u ovom radu dio su znanstveno-istraživačkog projekta (Štetni učinci pojedinačnih i kombiniranih mikotoksina *Aspergillus* vrsta – MycotoxA IP-09-2014-5982) kojega financira Hrvatska zaklada za znanost (HRZZ) te su izolati *Aspergillus* vrsta od interesa pohranjeni u zbirku mikrobnih kultura Zavoda za mikrobiologiju, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta (MFBF).

### **3.2. IZOLACIJA GENOMSKE DNA IZ FILAMENTOZNIH GLJIVICA**

#### **Kemikalije:**

- Sterilni pijesak
- Otopina za ispiranje DNA: etanol 96% v/v (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Otopina za lizu: natrijev N-lauril sarkozinat 20% w/v u vodi (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Otopina za taloženje proteina i lipida: natrijev acetat (Kemig, Zagreb, Hrvatska) 5 mol/L, pH = 5±0,02
- Otopina za taloženje DNA: izopropanol (Kefo d.o.o., Sisak, Hrvatska)
- Otopina za otapanje DNA: Tris-EDTA pufer pH = 8,5 ± 0,02 (Macherey-Nagel GmbH & Co., Njemačka)

#### **Uredaji:**

- Liofilizator (Freeze-dryer ALPHA 1-2 LDplus, Christ, Njemačka)
- Centrifuga (Table top Centrifuge Z 326 K, Hermle, LaborTechnik, Njemačka)
- Vortex (IKA® VORTEX 3, Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Termoblok (Eppendorf ThermoMixer® C, Eppendorf, Njemačka)
- Termo-vakuuum uparivač (Concentrator Plus, Eppendorf, Njemačka)

Postupak izolacije genomske DNA je proveden iz uzoraka micelija poraslih u 1 mL tekućeg medija za izolaciju DNA u mikrotubicama:

1. Micelij je izoliran od tekućeg medija centrifugiranjem (25 °C, 10 min, 16 000 g) i uklanjanjem medija mikropipetom, nakon čega je višak medija ispran dodatkom 1 mL sterilne vode koja je uklonjena nakon centrifugiranja (25 °C, 10 min, 16 000 g). Čisti micelij je zamrznut (-20 °C, 30 min), a potom liofiliziran u liofilizatoru kroz 24 h.

2. Liza stanične strukture micelija provedena je na tri načina: mehanički (mljevenjem micelija mikropistolom uz sterilni pijesak), kemijski (dodatkom 300 µL otopine za lizu) te termički nakon homogenizacije u vorteksu (suspenzija staničnog lizata inkubirana je u termobloku pri uvjetima 70 °C, 15 min, 500 o/min).

3. Proteini i ostaci staničnog lizata istaloženi su dodatkom 150 µL natrijevog acetata, vorteksiranjem te centrifugiranjem (25 °C, 10 min, 16 000 g). U čiste mikrotubice je mikropipetom prenesen supernatant u kojem je ostala otopljena DNA.

4. Iz izdvojenog supernatanta je istaložena DNA dodavanjem hladnog izopropanola (-20 °C) u omjeru 1:1 uz pažljivo okretanje mikrotubica. Supernatant je uklonjen nakon centrifugiranja (25 °C, 10 min, 16 000 g).

5. Istaložena DNA isprana je dodatkom koncentriranog etanola koji je uklonjen nakon centrifugiranja (25 °C, 10 min, 16 000 g).

6. Ostaci etanola u talogu DNA uklonjeni su sušenjem u termo-vakuum uparivaču (30 °C, 15 min, 1400 o/min).

7. Izolirana genomska DNA je resuspendirana u sterilnoj vodi.

Uspješnost izolacije DNA prije umnažanja procesom lančane reakcije polimeraze (PCR) provjerena je gel elektroforezom.

### **3.3. DETEKCIJA DNA GEL ELEKTROFOREZOM**

#### **Kemikalije:**

- Agaroza (SeaKem® LE Agarose, Lonza, SAD)

- TAE pufer 50X: tris baza (40 mM), octena kiselina (20 mM) i EDTA (1 mM) u destiliranoj vodi, pH 8,3 (AccuGENE 50X; Lonza, Belgija)

Radna otopina pufera (1X) priredi se razrjeđivanjem destiliranom vodom.

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

Radna otopina boje priredi se miješanjem fluorescentne boje s pomoćnom bojom u omjeru 1:1000. U vodenoj otopini za gel-elektroforezu ukupno razrjeđenje fluorescentne boje je 10000.

#### **Uredaji:**

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

Uspješnost izolacije DNA provjerena je gel elektroforezom na agarozu (0,8 %) u TAE puferu (1X):

1. 0,8 %-tna otopina agaroze pripremljena je otapanjem u TAE puferu (1X) zagrijavanjem do vrenja, nakon čega se izlivanjem u kadicu priprema gel debljine oko 4 mm. Gel polimeriziran hlađenjem prebačen je u sustav za elektroforezu napunjen puferom malo iznad jažica gela.
2. U čiste mikropruvete je pomiješano 10 µL otopine uzorka DNA te 3 µL radne otopine boje (omjeri su promijenjeni po potrebi).
3. U jažice su nanesene smjese DNA i boje te provedena elektroforeza pri 400 mA i 80 V oko 15 minuta.
4. Detekcija DNA se vrši u UV transiluminatoru, temeljeno na zelenoj fluorescenciji pod UV svjetlom valne duljine 254 nm.



### 3.4. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE, PCR

#### Reagensi za PCR:

- Taq reakcijski pufer: 10X, 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Takara Bio SAD)
- Smjesa polinukleotida: dNTP; 2,5 mM (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*): 32,3 nmol (Metabion, Njemačka)
- R-primer (cmd-6) za umnažanje gena za kalmodulin (*CaM*): 28,7 nmol (Metabion, Njemačka)
- DNA kalup: genomska DNA izolirana iz filamentoznih gljivica
- Vodena otopina serumskog albumina goveda [*engl. bovine serum albumin*, BSA (Sigma-Aldrich, Njemačka)] konc. 20 mg/mL po potrebi je korištena u svrhu optimizacije uvjeta PCR reakcije

#### Uredaji:

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

Upotrebom otopina svake od izoliranih genomskih DNA u sterilnoj vodi, umnoženi su dijelovi gena za kalmodulin (*CaM*) pomoću početnica cmd-5 i cmd-6 u 25 µL reakcijske smjese, čiji je sastav prikazan u tablici 1.

Tablica 1. Koncentracije sastavnica PCR reakcijske smjese

<i>Sastavnica</i>	<i>Koncentracija/25 <math>\mu</math>L</i>
Taq reakcijski pufer	1X
dNTP	200 $\mu$ M
cmd5	0,2 $\mu$ M
cmd6	0,2 $\mu$ M
BSA	0-1,2 $\mu$ g/ $\mu$ L
Taq DNA polimeraza	1 U
Genomska DNA	varijabilno $\approx$ 40 pg/ $\mu$ L
Voda za PCR (do 25 $\mu$ L)	

Cijeli postupak pripreve reakcijskih smjesa proveden je u komori za aseptički rad. Reakcija je provedena u termostatiranom uređaju za PCR. Tijek reakcijskog ciklusa PCR-a opisan je u tablici 2.

Tablica 2. Reakcijski ciklus PCR za *CaM*

<i>Reakcijski koraci</i>	<i>Temperatura/°C</i>	<i>Vrijeme</i>	<i>Broj ciklusa</i>
1. Inicijalna denaturacija DNA	95	5 min	1
2. Denaturacija DNA	95	20 s	10 (koraci 2-4)
3. Vezanje početnica	52	20 s	
4. Elongacija	72	40 s	
5. Denaturacija	95	20 s	25 (koraci 5-7)
6. Vezanje početnica	56	20 s	
7. Elongacija	72	40 s	
8. Završna elongacija	72	5 min	1

Uspješnost PCR reakcije provjerena je gel-elektroforezom opisanom u potpoglavlju 3.3. na temelju zelene fluorescencije PCR produkata (DNA fragment duljine oko 500 parova baza).

### 3.5. MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA *ASPERGILLUS* VRSTA ANALIZOM GENSKIH SLJEDOVA

#### **Kemikalije:**

- Komercijalni set za pročišćavanje izolirane DNA i PCR produkata (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel GmbH & Co., Njemačka)

PCR produkti su prije sekvenciranja pročišćeni kroz komercijalne kolone prema uputama proizvođača: dodatkom otopine kaotropne soli, PCR produkt ostaje vezan za silikagel membranu kolone, dok ostali sastojci (ostaci dNTP, početnica, dimera početnica, BSA i dr.) prolaze kroz membranu. Silikagel membrana ispire se etanolom, provodi se centrifugiranje (1 min, 11 000 g) i sušenje u termo-vakuum uparivaču (30 °C, 10 min, 1400 o/min), nakon čega se pročišćeni PCR produkt ispire s membrane dodatkom Tris-EDTA pufera (pH 8,5) na sobnoj temperaturi. Sekvenciranje je provedeno Sangerovom dideoksi metodom u tvrtki MacroGen Inc. (Amsterdam, Nizozemska).

Sekvenciranjem određeni nukleotidni sljedovi dijela *CaM* gena za izolate *Aspergillus* vrsta sravnjeni su korištenjem MUSCLE analize (*engl. Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*) (Edgar, 2004) programskog paketa MEGA 7.0 (Kumar i sur., 2016). Homologija genskih sljedova ispitana je usporedbom s nukleotidnim sljedovima dijela *CaM* gena pohranjenih u *National Center for Biotechnology Information* bazi dostupnoj na mrežnoj stranici <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, čime je provedena identifikacija vrste unutar sekcija.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. BIOLOŠKA RAZNOLIKOST VRSTA RODA *ASPERGILLUS* U UZORCIMA ZRAKA NA POJEDINIM LOKACIJAMA

U ovom radu se za identifikaciju plijesni roda *Aspergillus* na razini vrste unutar sekcija koristila molekularna metoda analize slijeda dijela gena za kalmodulin (*CaM*). Prikupljeni izolati aspergila (N=23) iz zraka su pridruženi odgovarajućoj sekciji, vrsti, periodu uzorkovanja zraka [veljača (II-16) te rujan (IX-16) 2016. godine] te lokaciji uzorkovanja (obnovljene i neobnovljene lokacije u Gunji kao mjesto pogođenom poplavom te kontrolne lokacije u Gornjem Stupniku), a rezultati su prikazani u tablici 3.

Prikupljeni izolati iz uzoraka zraka su identificirani kao 10 različitih vrsta: unutar sekcije *Nigri* je pokazana najveća bioraznolikost identifikacijom 5 vrsta (*A. niger*, *A. piperis*, *A. tubingensis*, *A. uvarum* i *A. welwitschiaie*), unutar sekcije *Circumdati* su identificirane 3 vrste (*A. ochraceus*, *A. sclerotium* i *A. westerdijkaie*), unutar sekcije *Flavi* 1 vrsta (*A. flavus*), dok je *A. dimorphicus* morfološki pokazivao sličnosti s aspergilima iz sekcije *Circumdati*, molekularna analiza je potvrdila da je ipak riječ o vrsti iz sekcije *Cremeri*. Ukupno 5/23 izolata je prikupljeno na neobnovljenim lokacijama (kućama) u Gunji, 11/23 izolata na obnovljenim lokacijama u Gunji (kuće i škola) i njih 7/23 na kontrolnim lokacijama u Gornjem Stupniku (kuće i škola). Uzorci su u Gunji prikupljeni u obnovljenim kućama i školi, na neobnovljenim lokacijama se uzorkovao zrak u neobnovljenim kućama, dok su kontrolne lokacije u Gornjem Stupniku bile kuće i škola. Ukupno 16/23 izolata je prikupljeno tijekom veljače 2016. godine, dok je manji broj izolata, 7/23, prikupljen u rujnu iste godine.

Najveću bioraznolikost pokazuju izolati iz obnovljenih lokacija u Gunji, obzirom da je identificirano 7 različitih vrsta iz tri sekcije: *A. ochraceus*, *A. sclerotium*, *A. westerdijkaie* (*Circumdati*), *A. flavus* (*Flavi*), *A. tubingensis*, *A. uvarum* i *A. welwitschiaie* (*Nigri*). Sljedeći su izolati s kontrolnih lokacija u Gornjem Stupniku, iz kojih je identificirano 6 vrsta iz dvije sekcije: *A. ochraceus*, *A. westerdijkaie* (*Circumdati*), *A. niger*, *A. piperis*, *A. tubingensis* i *A. welwitschiaie* (*Nigri*). Najmanja bioraznolikost utvrđena je među izolatima prikupljenima na neobnovljenim lokacijama u Gunji, gdje su identificirane 3 vrste iz tri različite sekcije: *A. flavus* (*Flavi*), *A. tubingensis* (*Nigri*) i *A. dimorphicus* (*Cremeri*).

Tablica 3. Identificirani izolati vrsta roda *Aspergillus* iz zraka na naznačenim lokacijama

Sekcija	Vrsta	Oznaka (MFBF)	Period uzorkovanja	Lokacija
Circumdati	<i>A. ochraceus</i>	AC 12122	II-16	Gunja, obnovljena lokacija
		AC 12382	IX-16	Gornji Stupnik, kontrolna lokacija
	<i>A. sclerotiorum</i>	AC 12079	II-16	Gunja, obnovljena lokacija
		AC 12077	II-16	Gunja, obnovljena lokacija
	<i>A. westerdijkiae</i>	AC 12125	II-16	Gunja, obnovljena lokacija
		AC 12124	II-16	Gunja, obnovljena lokacija
AC 12375		IX-16	Gornji Stupnik, kontrolna lokacija	
Cremeri	<i>A. dimorphicus</i>	ACr 12339	IX-16	Gunja, neobnovljena lokacija
Flavi	<i>A. flavus</i>	AF 12119	II-16	Gunja, obnovljena lokacija
		AF 12088	II-16	Gunja, neobnovljena lokacija
Nigri	<i>A. niger</i>	AN 12371	IX-16	Gornji Stupnik, kontrolna lokacija
	<i>A. piperis</i>	AN 12183	II-16	Gornji Stupnik, kontrolna lokacija
	<i>A. tubingensis</i>	AN 12095	II-16	Gunja, neobnovljena lokacija
		AN 12064	II-16	Gunja, obnovljena lokacija
		AN 12060	II-16	Gunja, obnovljena lokacija
		AN 12069	II-16	Gunja, obnovljena lokacija
		AN 12185	II-16	Gornji Stupnik, kontrolna lokacija
		AN 12100	II-16	Gunja, neobnovljena lokacija
	AN 12340	IX-16	Gunja, neobnovljena lokacija	
	<i>A. uvarum</i>	AN 12310	IX-16	Gunja, obnovljena lokacija
	<i>A. welwitschiae</i>	AN 12070	II-16	Gunja, obnovljena lokacija
AN 12194		II-16	Gornji Stupnik, kontrolna lokacija	
AN 12384		IX-16	Gornji Stupnik, kontrolna lokacija	

Jedan od glavnih izvora plijesni u zatvorenim prostorima vlažni građevinski materijal te vrste roda *Aspergillus* se nastanjuju kao primarni kolonizatori na supstratima poput zidova pri aktivitetu vode ( $a_w$ ) manjem od 0,8. Nakon povećane dostupnosti vode kroz dulji period zbog poplave je očekivana povećana prisutnost aspergila u zatvorenim prostorima što je i potvrđeno identifikacijom izolata plijesni u ovom istraživanju (Schulz i sur., 2004; Nielsen, 2003); zabilježena je povećana bioraznolikost aspergila iz uzoraka u poplavljenoj Gunji (iz izolata je identificirano 8 različitih vrsta) u odnosu na kontrolne lokacije u Gornjem Stupniku (identificirano je 6 različitih vrsta iz izolata). Iako se danas raspravlja o toksikološkom značenju unosa mikotoksina inhalacijom u ljudi, studije na pokusnim životinjama pokazuju da

inhalacija mikotoksina uzrokuje i do 10 puta jači toksični učinak od unosa ingestijom (Jakšić Despot, 2016; Creasia i sur., 1990; Creasia i sur., 1987). Najčešće invazivne gljivične infekcije su mikoze dišnog 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). S obzirom na to da su kod imunokompromitiranih pacijenata najinvazivnije infekcije dišnih puteva uzrokovane vrstama *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, i *A. niger sensu lato* (Schmidt i Schmidt, 1999), dok infekcije plijesnima roda *Aspergillus* čine oko 90 % svih mikoza (Pagano i sur., 2006). od posebne je važnosti bilo istražiti prisutnost plijesni iz roda *Aspergillus* kojem navedene vrste pripadaju.

## 4.2. ASPERGILI IZ SEKCIJE *NIGRI*

Od ukupno 23 izolata aspergila iz uzoraka zraka, najveći broj (13/23) su identificirani kao vrste sekcije *Nigri*. Većina izolata pripada vrsti *A. tubingensis* (7/13), koja je pronađena u uzorcima zraka u obnovljenim (N=3) i neobnovljenim lokacijama (N=3) u Gunji te kontrolnim lokacijama u Gornjem Stupniku (N=1). Nakon nje brojčano slijedi vrsta *A. welwitschiae* (3/13) izolirana iz uzoraka zraka na kontrolnim lokacijama (N=2) te obnovljenim lokacijama u Gunji (N=1). Na obnovljenim lokacijama u Gunji je identificirana također još vrsta *A. uvarum* (N=1), dok su na kontrolnim lokacijama u Gornjem Stupniku identificirani još po jedan izolat vrsta *A. niger* te *A. piperis*.

S obzirom na to da su crni aspergili značajni humani i animalni patogeni te se smatraju jednim od najznačajnijih uzročnika invazivne aspergiloze, otomikoze te alergijskih reakcija, posebno tipa III i IV (Szigeti i sur., 2012), njihova povećana prisutnost u zraku uzorkovanom u poplavljenim područjima Gunje (N=8) u odnosu na kontrolna područja (N=5) može biti pokazateljem povećanog zdravstvenog rizika u poplavljenim područjima. Ovakav rezultat je konzistentan s istraživanjima u kojem su identificirane vrste roda *Aspergillus* iz uzoraka prašine u obnovljenim i neobnovljenim lokacijama u Gunji u usporedbi s kontrolnim lokacijama u Gornjem Stupniku; od 85 izolata iz prašine, 18 iz kontrolnih lokacija su identificirani kao vrste sekcije *Niger*, dok je u lokacijama u Gunji identificirano njih 24 (Šmalcelj, 2019; Geček, 2018; Kovačević, 2018).

U uzorcima zraka su identificirane vrste *A. niger* i *A. welwitschiae* koje su potentni proizvođači mikotoksina OTA i fumonizina, koji ovisno o koncentraciji i vremenu izloženosti, dovode do povećanja lipidne peroksidacije, smanjenja antioksidativnog

potencijala stanice i smanjene vijabilnosti u bubrežnim epitelnim stanicama svinje (Šegvić Klarić i sur., 2007) i predstavljaju predstavlja značajan zdravstveni rizik za izložene pojedince (Varga i sur., 2014). Također identificirana vrsta *A. tubingensis*, iako nije proizvođač mikotoksina, je dokazani oportunistički patogen koji uzrokuje teške invazivne infekcije u imunokompromitiranih osoba te je izolirana iz uzoraka pacijenata oboljelih od kroničnih bolesti dišnog sustava (Gautier i sur., 2016; Bathoorn i sur., 2013). Velik broj izolata te vrste iz uzoraka zraka je zabrinjavajuć uzevši u obzir činjenicu da se u ispitivanju na staničnim kulturama ekstrakt *A. tubingensis* pokazao citotoksičnim i genotoksičnim (Jakšić i sur., 2018).

### **4.3. ASPERGILI IZ SEKCIJE *CIRCUMDATI***

Druga sekcija po brojnosti izolata aspergila u uzorcima zraka jest sekcija *Circumdati* (7/23). Većina izolata pripada vrsti *A. westerdijkiae* (3/7), koja je pronađena u uzorcima zraka u obnovljenim lokacijama u Gunji (N=2) te kontrolnim lokacijama u Gornjem Stupniku (N=1). Identificirana su i dva izolata vrste *A. ochraceus* (2/7), u obnovljenim lokacijama u Gunji (N=1) i kontrolnim lokacijama u Gornjem Stupniku (N=1). Također su na obnovljenim lokacijama identificirani i izolati vrste *A. sclerotiorum* (N=2). Jedan izolat je identificiran kao vrsta *A. dimorphicus*, srodan vrsti *A. wentii* koja je smještena u sekciju *Cremeri* (Varga i sur., 2000; Peterson, 1995). Zbog značajne morfološke sličnosti s vrstama iz sekcije *Circumdati*, tek nakon molekularne analize je utvrđena pripadnost sekciji *Cremeri*, koja obuhvaća 14 vrsta manjeg značaja za ljude iako određene vrste proizvode mikotoksine poput sterigmatocistina, patulina i emodina. Najčešće su izolirane iz tla, dok se tek rijetko nalaze u unutrašnjim prostorima ili medicinskim materijalima (Hubka i sur., 2016).

Prisutnost kontaminacije zraka vrstama *A. ochraceus*, *A. sclerotiorum* i *A. westerdijkiae* sekcije *Circumdati* je zabrinjavajuća s obzirom na to da su značajni proizvođačima potentnog mikotoksina okratoksina A (Visagie i sur., 2014). Osim toga, ove plijesni u zrak otpuštaju velike količine konidija i aerogenih fragmenata hifa koji predstavljaju značajan izvor aeroalergena i doprinose razvoju ili pogoršanju kroničnih respiratornih bolesti, osobito alergija poput fungalnog rinitisa, hipersenzitivne pneumonije i/ili astme (Šegvić Klarić i sur., 2015).

Njihova povećana prisutnost u zraku uzorkovanom u poplavljenim područjima Gunje (N=5) u odnosu na kontrolna područja (N=2) može biti pokazateljem povećanog zdravstvenog rizika u poplavljenim područjima. Iako se ovakva distribucija ne poklapa s istraživanjima u kojem su

identificirane vrste roda *Aspergillus* iz uzoraka prašine, gdje je u Gunji na kontrolnim lokacijama pronađeno 8 izolata te na kontrolnim lokacijama u Gornjem Stupniku 5 (od ukupno 85 izolata iz prašine), ipak je pokazana značajna izloženost plijesnima sekcije *Circumdati* u zatvorenim prostorima u kojima ljudi borave (Šmalcelj, 2019; Geček, 2018; Kovačević, 2018). Iako je ingestija glavni put izloženosti mikotoksinu OTA, njegova inhalacija je također vrlo opasna zbog učinkovite apsorpcije kroz pluća te visoke bioraspoloživosti neposredno nakon inhalacije (Hope i Hope, 2012). Izolirane vrste iz uzoraka zraka *A. ochraceus* i *A. westerdijkiae* osim OTA proizvode i asperloksine te aspergamide, čija je interakcija potencijalno opasna za zdravlje ljudi (Frisvad i sur., 2004).

#### **4.4. ASPERGILI IZ SEKCIJE FLAVI**

Od ukupno 23 izolata aspergila, 2 su identificirana kao pripadnici sekcije *Flavi* te oba pripadaju vrsti *A. flavus*. Ove plijesni su pronađene u uzorcima zraka na neobnovljenim (N=1) i obnovljenim lokacijama u Gunji (N=1). Ovi rezultati su konzistentni s rezultatima istraživanja uzoraka prašine u obnovljenim i neobnovljenim lokacijama u Gunji u usporedbi s kontrolnim lokacijama u Gornjem Stupniku; od 85 izolata iz prašine, 3 iz kontrolnih lokacija su identificirani kao pripadnici sekcije *Flavi*, dok je u lokacijama u Gunji identificirano njih 12 te svi izolati pripadaju vrsti *A. flavus* (Šmalcelj, 2019; Geček, 2018; Kovačević, 2018). Navedeno je u skladu s dosadašnjim istraživanjima prema kojima je upravo *A. flavus* najzastupljenija vrsta iz sekcije *Flavi*.

Aspergili iz sekcije *Flavi* se često povezuju s lokaliziranim mikozama kod ljudi, poput keratitisa, kutanih aspergiloza, sinusitisa i otomikoza (Manikandan i sur., 2010; Klich, 2009), a njihov alergogeni potencijal je ispitan kod brojnih vrsta (poput *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* i dr.) te je utvrđena križna reaktivnost između određenih alergenijskih proteina različitih vrsta roda *Aspergillus* (Vermani i sur., 2011). Vrsta *A. flavus* je jedna od najznačajnijih proizvođača mikotoksina aflatoksina (AFB<sub>1</sub>) koji uzrokuje teško oštećenje jetre, dokazano je genotoksičan, karcinogen i teratogen za ljude i životinje (Perrone i sur., 2014). S njom se općenito povezuju lokalne aspergiloze koje zahvaćaju kožu, sluznicu te potkožno tkivo; uzrokuju 80% aspergiloznih keratitisa (Khairallah i sur., 1992), 41% aspergiloza rana (Pasqualotto i Denning, 2006), kao i većina kožnih aspergiloza (van Burik i sur., 1998). U *in vitro* i *in vivo* studijama pokazano je da i površinski vezani i egzoantigeni vrste *A. flavus* imaju sposobnost indukcije specifičnih monoklonskih protutijela i stanične imunosti



(Krishnan i sur., 2009). S obzirom na toksična djelovanja povezana s ingestijom hrane kontaminirane aflatoksinom AFB1, ali i inhalacijom aerogenih čestica koje ga proizvode, spomenuta vrsta predstavlja značajan rizik za zdravlje ljudi i životinja (Varga i sur., 2011).

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata iz ovog istraživanja možemo izvući sljedeće zaključke:

- Izolati iz uzoraka zraka prikupljenih tijekom 2016. godine su identificirani kao 10 različitih vrsta koje pripadaju sekcijama *Nigri*, *Circumdati*, *Flavi* te *Cremeri*, među kojima je najzastupljenija vrsta *Aspergillus tubingensis* iz sekcije *Nigri* (13/23 izolata)
- U zraku iz neobnovljenih lokacija u Gunji identificirane su vrste *A. tubingensis* iz sekcije *Nigri*; *A. flavus* iz sekcije *Flavi* te *A. dimorphicus* iz sekcije *Cremeri*
- U zraku iz obnovljenih lokacija u Gunji identificirane su vrste *A. tubingensis*, *A. uvarum* i *A. welwitschiae* iz sekcije *Nigri*; *A. westerdijkiae*, *A. sclerotiorum* i *A. ochraceus* iz sekcije *Circumdati* te *A. flavus* iz sekcije *Flavi*
- U zraku iz kontrolnih lokacija u Gornjem Stupniku identificirane su vrste *A. welwitschiae*, *A. tubingensis*, *A. piperis* i *A. niger* iz sekcije *Nigri* te *A. westerdijkiae* i *A. ochraceus* iz sekcije *Circumdati*
- Najveća bioraznolikost je uočena na obnovljenim lokacijama u Gunji, gdje je identificirano 7 različitih vrsta iz 3 sekcije: *A. ochraceus*, *A. sclerotium*, *A. westerdijkiae* (*Circumdati*), *A. flavus* (*Flavi*), *A. tubingensis*, *A. uvarum* i *A. welwitschiae* (*Nigri*)
- Na obnovljenim te neobnovljenim lokacijama u Gunji o odnosu na kontrolne lokacije u Gornjem Stupniku su zastupljenije vrste sekcije *Circumdati*, vrsta *A. tubingensis* iz sekcije *Nigri* te vrsta *A. flavus* iz sekcije *Flavi*
- Identificirane plijesni roda *Aspergillus* potencijalni su proizvođači mikotoksina, uključujući okratoksine, aflatoksine i fumonizine, čime pridonose štetnim učincima na zdravlje ljudi uslijed inhalacije kontaminiranog zraka
- Ovi rezultati upućuju na važnost temeljite sanacije građevinskih objekata nakon poplave, s ciljem dugoročne prevencije zdravstvenih rizika

## 6. LITERATURA

- Abarca ML, Accensi F, Bragulat MR, Cabañes FJ. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp.. *J Food Protect*, 2001, 64, 903–906.
- 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.
- 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.
- Bode M, Munson D. Controlling mold growth in the home. *The near environment*, 1995, 2, 1-8.
- Brera C, Caputi R, Miraglia M, Iavicoli I, Salerno A, Carelli G. Exposure assessment to mycotoxins in workplaces: aflatoxins and ochratoxin A occurrence in airborne dusts and human sera. *Microchem J*, 2002, 73, 167–173.
- 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.
- Campbell-Platt G, Cook PE. Fungi in the production of foods and food ingredients. *J Appl Bacteriol: Symposium supplement*, 1989, 117S-131S.
- Chen KC, Yin WS, Tiu C, Houg JY. 11a-Hydroxylation of progesterone using modified alginate-immobilized cells. *Enzyme Microb Tech*, 1994, 16, 551-555.
- Clemons KV, Richardson MD. Pathways and routes of natural exposure to fungal infection. *Fungi and Mycotoxins: Risk Assessment and Management*. U: Environmental Mycology in Public Health. Amsterdam, Elsevier BV, 2016, 65-76.
- Creasia DA, Thurman JD, Jones LJ, Nealley ML, York CG, Wannemacher RW, Bunner DL. Acute inhalation toxicity of T-2 mycotoxin in mice. *Fundam Appl Toxicol*, 1987, 8, 230–235.
- Creasia DA, Thurman JD, Wannemacher RW, Bunner DL. Acute inhalation toxicity of T-2 mycotoxin in the rat and guinea pig. *Fundam Appl Toxicol*, 1990, 14, 54–59.

- Deng ZL, Ma Y. Aflatoxin sufferer and p53 gene mutation in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroentero*, 1998, 4, 28–29.
- Di Paolo N, Guarnieri A, Garosi G, Sacchi G, Mangiarotti AM, Di Paolo M. Inhaled mycotoxins lead to acute renal failure. *Nephrol Dial Transpl*, 2014, 9 Suppl 4, 116–120.
- Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32, 1792-1797.
- Frisvad JC, Frank JM, Houbraken J, Kuijpers A, Samson RA. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Stud Mycol*, 2004, 50, 23-43.
- Frisvad JC, Larsen TO. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. *Appl Microbiol Biot*, 2015, 99, 7859–7877.
- 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.
- Geček, J. Identifikacija aspergila iz sekcija *Circumdati*, *Flavi* i *Nigri* u prašini nakon poplave. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2018.
- Genzen JR, Kenney B. Central nervous system *Aspergillus* infection after epidural analgesia: diagnosis, therapeutic challenges, and literature review. *Diagn Micr Infec Dis*, 2009, 65, 312-318.
- Ghosh SK, Desai MR, Pandya GL, Venkaiah K. Airborne aflatoxin in the grain processing industries in India. *Am Ind Hyg Assoc J*, 1997, 58, 583–586.
- Harima N, Inoue T, Kubota T, Okada O, Ansai S, Manabe M, Ichinoe M, Kasai T. A case of otomycosis caused by *Aspergillus sclerotiorum*. *J Dermatol*, 2004, 31, 949–950.
- Hayes RB, van Nieuwenhuize JP, Raatgever JW, Ten Kate FJW. Aflatoxin exposures in the industrial setting: An epidemiological study of mortality. *Food Chem Toxicol*, 1984, 22, 39–43.
- Hooper D, Bolton V, Guilford F, Straus D. Mycotoxin detection in human samples from patients exposed to environmental molds. *Int J Mol Sci*, 2009, 10, 1465–1475.
- Hope JH, Hope BE. A Review of the diagnosis and treatment of ochratoxin A inhalational exposure associated with human illness and kidney disease including focal segmental glomerulosclerosis. *J Environ Public Health*, 2012, 2012, 1–10.
- Hubka V, Nováková A, Samson RA, Houbraken J, Frisvad JC, Sklenář F, Varga J, Kolařík M. *Aspergillus europaeus* sp. nov., a widely distributed soil-borne species related to *A. wentii* (section *Cremeri*). *Plant Syst Evol*, 2016, 302, 641-650.

- IARC. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monog Eval Carc*, 1993, 56, 489–521.
- Jakšić 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. Pojedinačni i kombinirani učinci mikotoksina i ekstrakata nekih *Aspergillus* vrsta plijesni u ljudskim staničnim linijama. Doktorski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
- Jakšić Despot D, Šegvić Klarić M. A year-round investigation of indoor airborne fungi in Croatia. *Arh Hig Rada Toksiko*, 2014, 65, 209–218.
- Jurjevic Z, Peterson SW, Horn BW. *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. *IMA Fungus*, 2012, 3, 59–79.
- Khairallah SH, Byrne KA, Tabbara KF. Fungal keratitis in Saudi Arabia. *Doc Ophthalmol*, 1992, 79, 269-276.
- Klich MA. Health effects of *Aspergillus* in food and air. *Toxicol Ind Health*, 2009, 25, 657–667.
- Klich MA. Identification of clinically relevant aspergilli. *Med Mycol*, 2006, 44, 127-131.
- Kovačević, I. Bioraznolikost aspergila sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* u prašini nakon poplave. Studentski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018.
- Kratofil L. Svibanjska poplava županjske 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, and Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 2016, 33, 1870-1874.
- Lai M, Semeniuk G, Hesseltine CW. Conditions for production of ochratoxin A by *Aspergillus* species in synthetic medium. *Appl Microbiol*, 1970, 19, 542-544.
- Lehman TA, Bennett WP, Metcalf RA, Welsh JA, Ecker J, Modali R V, Ullrich S, Romano JW, Appella E, Testa JR. p53 mutations, ras mutations, and p53-heat shock 70 protein complexes in human lung carcinoma cell lines. *Cancer Res*, 1991, 51, 4090–4096.
- Liao C-M, Chen S-C. A probabilistic modeling approach to assess human inhalation exposure risks to airborne aflatoxin B1 (AFB1). *Atmos Environ*, 2005, 39, 6481–6490.

- Manikandan P, Varga J, Kocsubé S, Revathi R, Anita R, Dóczy I, Németh TM, Narendran V, Vágvölgyi C, Bhaskar M, Manoharan C, Samson RA, Kredics L. Keratitis caused by the recently described new species *Aspergillus brasiliensis*: two case reports. *J Med Case Rep*, 2010, 4, 68.
- 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.
- McConnell IR, Garner RC. DNA adducts of aflatoxins, sterigmatocystin and other mycotoxins. *IARC Sci Publ*, 1994, 49–55.
- 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.
- Nielsen KF. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genet Biol*, 2003, 39, 103-17
- 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.
- Novey HS, Wells ID. Allergic bronchopulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus ochraceus*. *Am J Clin Pathol*, 1978, 70, 840–843.
- 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.
- Pasqualotto AC, Denning DW. Post-operative aspergillosis. *Clin Microbiol Infec*, 2006, 12(11), 1060-1076.
- Pariza MW, Johnson EA. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: Update for a new century. *Regul Toxicol Pharm*, 2001, 33, 173-186.
- Park D. Phylloplane fungi: tolerance of hyphal tips to drying. *T Brit Mycol Soc*, 1982, 79, 174-178.
- Pavlović NM. Balkan endemic nephropathy-current status and future perspectives. *Clin Kidney J*, 2013, 6, 257-265.
- Perrone G, Gallo A, Logrieco AF. Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Europe in relation to the management of aflatoxin risk. *Front Microbiol*, 2014, 377, 1-5.

- Peterson SW. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* sections *Cremeri* and *Wentii*, based on ribosomal DNA sequences. *Mycol Res*, 1995, 99, 1349-1355.
- Pitt JI, Hocking AD. Fungi and food spoilage. Boston, MA, Springer US, 2009.
- Pitt JI, Hocking AD. The ecology of fungal food spoilage. London, Blackie academic and professional, 1997, 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.
- Puisieux A, Lim S, Groopman J, Ozturk M. Selective targeting of p53 gene mutational hotspots in human cancers by etiologically defined carcinogens. *Cancer Res*, 1991, 51, 6185–6189.
- Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B. Food and indoor fungi. CBS Laboratory manual series. Utrecht, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2010.
- 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, Kocsubé S, Dóczy I, Bereczki L, Vágvölgyi C, Varga J. Molecular identification and antifungal susceptibilities of black *Aspergillus* isolates from otomycosis cases in Hungary. *Mycopathologia*, 2012, 174, 143–147.
- Schmidt A, Schmidt DI. *Aspergillus fumigatus*, Contributions to Microbiology. Basel, KARGER, 1999.
- Schulz T, Senkpiel K, Ohgke H. Comparison of the toxicity of reference mycotoxins and spore extracts of common indoor moulds. *Int J Hyg Envir Heal*, 2004, 207, 267-77.
- Selim MI, Juchems AM, Popendorf W. Assessing airborne aflatoxin B1 during on-farm grain handling activities. *Am Ind Hyg Assoc J*, 1998, 59, 252–256.
- Shirabe K, Toshima T, Taketomi A, Taguchi K, Yoshizumi T, Uchiyama H, Harimoto N, Kajiyama K, Egashira A, Maehara Y. Hepatic aflatoxin B1-DNA adducts and TP53 mutations in patients with hepatocellular carcinoma despite low exposure to aflatoxin B1 in southern Japan. *Liver Int*, 2011, 31, 1366–1372.
- 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.

- Siqueira JPZ, Sutton DA, Gené J, García D, Wiederhold N, Peterson SW, Guarro J. Multilocus phylogeny and antifungal susceptibility of *Aspergillus* section *Circumdati* from clinical samples and description of *A. pseudosclerotiorum* sp. nov. *J Clin Microbiol*, 2017, 55, 947.
- Szigeti G, Kocsubé S, Dóczy I, Bereczki L, Vágvölgyi C, Varga J. Molecular Identification and antifungal susceptibilities of black *Aspergillus* isolates from otomycosis cases in Hungary. *Mycopathologia*, 2012, 174, 143–147.
- Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol*, 2014, 78, 141–173.
- Šegvić M, Pepeljnjak S. Fumonisin and their effects on animal health—a brief review. *Vet Arhiv*, 2001, 71, 299–323.
- Šegvić Klarić M, Cvetnić Z, Pepeljnjak S, Kosalec I. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, and zearalenone in cereals and feed, determined by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2009, 60, 427–434.
- Šegvić Klarić M, Daraboš D, Rozgaj R, Kašuba V, Pepeljnjak S. Beauvericin and ochratoxin A genotoxicity evaluated using the alkaline comet assay: single and combined genotoxic action. *Arch Toxicol*, 2010, 84, 641–650.
- Šegvić Klarić M, Jakšić Despot D, Kopjar N, Rašić D, Kocsubé S, Varga J, Peraica M. Cytotoxic and genotoxic potencies of single and combined spore extracts of airborne OTA-producing and OTA-non-producing *Aspergilli* in human lung A549 cells. *Ecotox Environ Safe*, 2015, 120: 206–214.
- Šegvić Klarić M, Pepeljnjak S, Domijan AM, Petrik J. Lipid peroxidation and glutathione levels in porcine kidney PK15 cells after individual and combined treatment with fumonisin B1, beauvericin and ochratoxin A. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2007, 100, 157–164.
- Šmalcelj, F. Plijesni u prašini i žitaricama nakon poplave u Gunji. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2019.
- van Burik JAH, Colven R, Spach DH. Cutaneous aspergillosis. *J Clin Microbiol*, 1998, 36, 3115-3121.
- Varga J, Frisvad JC, Kocsubé S, Brankovics B, Tóth B, Szigeti G, Samson RA. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud Mycol*, 2011, 69, 1–17.



- Varga J, Kocsubé S, Suri K, Szigeti G, Szekeres A, Varga M, Tóth B, Bartók T. Fumonisin contamination and fumonisin producing black *Aspergilli* in dried vine fruits of different origin. *Int J Food Microbiol*, 2010, 143, 143–149.
- Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Baranyi N, Vágvölgyi C, Jakšić Despot D, Magyar D, Meijer M, Samson RA, Šegvić Klarić M. Occurrence of black *Aspergilli* in indoor environments of six countries. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2014, 65, 219–223.
- Varga J, Tóth B, Rigó K, Téren J, Hoekstra RF, Kozakiewicz Z. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* section *Circumdati* based on sequences of the internal transcribed spacer regions and the 5.8 S rRNA gene. *Fungal Genet Biol*, 2000, 30, 71–80.
- Vermani M, Vijayan VK, Menon B, Kausar MA, Agarwal MK. Physico-chemical and clinico-immunologic studies on the allergenic significance of *Aspergillus tamaris*, a common airborne fungus. *Immunobiology*, 2011, 216, 393–401.
- 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 Build Phys*, 2010, 33, 201–224.
- Visagie CM, Varga J, Houbraeken J, Meijer M, Kocsubé 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.
- Vujanović V, Smoragiewicz W, Krzysztyniak K. Airborne fungal ecological niche determination as one of the possibilities for indirect mycotoxin risk assessment in indoor air. *Environ Toxicol*, 2001, 16, 1–8.
- Wang JS, Groopman JD. DNA damage by mycotoxins. *Mutat Res*, 1999, 424, 167–181.
- Wang J, Liu X-M. Contamination of aflatoxins in different kinds of foods in China. *Biomed Environ Sci*, 2007, 20, 483–487.
- World Health Organization, WHO. WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould, WHO Guidelines for Indoor Air Quality, 2009.
- Zotti M, Machetti M, Perotti M, Barabino G, Persi A. A new species, *Aspergillus persii*, as an agent of onychomycosis. *Med Mycol*, 2010, 48, 656–660.

## 7. SAŽETAK

U godini 2014. je u Hrvatskoj zabilježen rekordni broj poplava kao posljedica iznimno dugotrajnog i intenzivnog kišnog razdoblja, čije su razorne posljedice posebno zabilježene u području Gunje. Povećana dostupnost vode je stvorila povoljne uvjete za promjenu sastava plijesni u različitim supstratima te pogodovala širenju konidija i fragmenata micelija plijesni zrakom. Plijesnima roda *Aspergillus* posebno pogoduju uvjeti povećanog aktiviteta vode u supstratu, a zbog njihovog alergijskog, invazivnog i mikotoksinogenog potencijala od osobitog su javnozdravstvenoga značaja aspergili iz sekcija *Nigri*, *Circumdati* i *Flavi*. Izolati aspergila (N = 23) su prikupljeni uzorkovanjem iz zraka tijekom veljače i rujna 2016. godine na obnovljenim i neobnovljenim lokacijama u Gunji te kontrolnim lokacijama u Gornjem Stupniku. Identifikacija aspergila do razine vrste je provedena na temelju analize sljedova dijela gena za kalmodulin (*CaM*).

Identificirano je ukupno 10 različitih vrsta aspergila iz sekcije *Nigri* (*A. tubingensis*, N=7; *A. welwitschiae*, N=3; *A. niger*, N=1; *A. piperis*, N=1; *A. uvarum*, N=1), *Circumdati* (*A. westerdijkiae*, N=3; *A. ochraceus*, N=2; *A. sclerotiorum*, N=2), *Flavi* (*A. flavus*, N=2) te jedan izolat iz sekcije *Cremeri* (*A. dimorphicus*) koji je morfološkim karakteristikama bio sličan aspergilima iz sekcije *Circumdati*, no identitet je potvrđen nakon molekularne analize. Najveća bioraznolikost je uočena na obnovljenim lokacijama u Gunji, gdje je identificirano 7 različitih vrsta. Na obnovljenim te neobnovljenim lokacijama u Gunji o odnosu na kontrolne lokacije u Gornjem Stupniku su zastupljenije vrste sekcije *Circumdati*, vrsta *A. tubingensis* iz sekcije *Nigri* te vrsta *A. flavus* iz sekcije *Flavi*. Identificirane plijesni roda *Aspergillus* potencijalni su proizvođači mikotoksina, uključujući okratoksine, aflatoksine i fumonizine, čime pridonose štetnim učincima na zdravlje ljudi uslijed inhalacije kontaminiranog zraka.

KLJUČNE RIJEČI: poplava, plijesni u zraku, aspergili, *CaM*, *Nigri*, *Circumdati*, *Flavi*

## 8. SUMMARY

In 2014, a record number of floods was documented in Croatia as a result of an extremely long and intense rainy season, the devastating consequences of which were especially recorded in the Gunja area. Increased availability of water has created favorable conditions for changing the composition of molds in different substrates, and favored the spread of conidia and mycelial fragments of molds by air. Aspergilli are particularly favored by increased water activity in the substrate, and because of their allergic, invasive and mycotoxinogenic potential, aspergilli from the *Nigri*, *Circumdati* and *Flavi* sections are of particular public health importance. Aspergilli isolates (N = 23) were collected by air-sampling during February and September 2016 at repaired and unrepaired locations in Gunja and control sites in Gornji Stupnik. Identification of Aspergilli to the species level was performed based on analysis of partial calmodulin (*CaM*) gene sequences.

A total of 10 different species of Aspergilli from the section *Nigri* were identified (*A. tubingensis*, N = 7; *A. welwitschiae*, N = 3; *A. niger*, N = 1; *A. piperis*, N = 1; *A. uvarum*, N = 1), *Circumdati* (*A. westerdijkiae*, N = 3; *A. ochraceus*, N = 2; *A. sclerotiorum*, N = 2), *Flavi* (*A. flavus*, N = 2), and one isolate from the section *Cremeri* (*A. dimorphicus*) which had similar morphological characteristics to Aspergilli from the *Circumdati* section, but the identity was confirmed after molecular analysis. The highest biodiversity was observed in the repaired locations in Gunja, where 7 different species were identified. At the repaired and unrepaired locations in Gunja, relative to the control sites in Gornji Stupnik, the species of section *Circumdati*, *A. tubingensis* from section *Nigri* and *A. flavus* from section *Flavi* are more prevalent. The identified molds of the genus *Aspergillus* are potential producers of mycotoxins, including ochratoxins, aflatoxins and fumonisins, thereby contributing to adverse human health effects of contaminated air inhalation.

KEYWORDS: flood, molds in air, aspergilli, *CaM*, *Nigri*, *Circumdati*, *Flavi*

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### Identifikacija plijesni roda *Aspergillus* iz uzoraka zraka nakon poplave

Jelena Durbek

#### SAŽETAK

U godini 2014. je u Hrvatskoj zabilježen rekordni broj poplava kao posljedica iznimno dugotrajnog i intenzivnog kišnog razdoblja, čije su razorne posljedice posebno zabilježene u području Gunje. Povećana dostupnost vode je stvorila povoljne uvjete za promjenu sastava plijesni u različitim supstratima te pogodovala širenju konidija i fragmenata micelija plijesni zrakom. Plijesnima roda *Aspergillus* posebno pogoduju uvjeti povećanog aktiviteta vode u supstratu, a zbog njihovog alergijskog, invazivnog i mikotoksinogenog potencijala od osobitog su javnozdravstvenoga značaja aspergili iz sekcija *Nigri*, *Circumdati* i *Flavi*. Izolati aspergila (N = 23) su prikupljeni uzorkovanjem iz zraka tijekom veljače i rujna 2016. godine na obnovljenim i neobnovljenim lokacijama u Gunji te kontrolnim lokacijama u Gornjem Stupniku. Identifikacija aspergila do razine vrste je provedena na temelju analize sljedova dijela gena za kalmodulin (*CaM*). Identificirano je ukupno 10 različitih vrsta aspergila iz sekcije *Nigri* (*A. tubingensis*, N=7; *A. welwitschiae*, N=3; *A. niger*, N=1; *A. piperis*, N=1; *A. uvarum*, N=1), *Circumdati* (*A. westerdijkiae*, N=3; *A. ochraceus*, N=2; *A. sclerotiorum*, N=2), *Flavi* (*A. flavus*, N=2) te jedan izolat iz sekcije *Cremeri* (*A. dimorphicus*) koji je morfološkim karakteristikama bio sličan aspergilima iz sekcije *Circumdati*, no identitet je potvrđen nakon molekularne analize. Najveća bioraznolikost je uočena na obnovljenim lokacijama u Gunji, gdje je identificirano 7 različitih vrsta. Na obnovljenim te neobnovljenim lokacijama u Gunji o odnosu na kontrolne lokacije u Gornjem Stupniku su zastupljenije vrste sekcije *Circumdati*, vrsta *A. tubingensis* iz sekcije *Nigri* te vrsta *A. flavus* iz sekcije *Flavi*. Identificirane plijesni roda *Aspergillus* potencijalni su proizvođači mikotoksina, uključujući okratoksine, aflatoksine i fumonizine, čime pridonose štetnim učincima na zdravlje ljudi uslijed inhalacije kontaminiranog zraka.

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

Rad sadrži: 31 stranica, 3 tablice i 90 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: poplava, plijesni u zraku, aspergili, *CaM*, *Nigri*, *Circumdati*, *Flavi*

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Daniela Jakšić**, *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: rujan 2019.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of microbiology  
Schrottova 39/Ist floor, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Identification of molds of the genus *Aspergillus* from air samples after a flood

Jelena Durbek

#### SUMMARY

In 2014, a record number of floods was documented in Croatia as a result of an extremely long and intense rainy season, the devastating consequences of which were especially recorded in the Gunja area. Increased availability of water has created favorable conditions for changing the composition of molds in different substrates, and favored the spread of conidia and mycelial fragments of molds by air. Aspergilli are particularly favored by increased water activity in the substrate, and because of their allergic, invasive and mycotoxinogenic potential, aspergilli from the *Niger*, *Circumdati* and *Flavi* sections are of particular public health importance. Aspergilli isolates (N = 23) were collected by aer sampling during February and September 2016 at repaired and unrepaired locations in Gunja and control sites in Gornji Stupnik. Identification of Aspergilli to the species level was performed based on analysis of partial calmodulin (*CaM*) gene sequences. A total of 10 different species of Aspergilli from the section *Nigri* were identified (*A. tubingensis*, N = 7; *A. welwitschiae*, N = 3; *A. niger*, N = 1; *A. piperis*, N = 1; *A. uvarum*, N = 1), *Circumdati* (*A. westerdijkiae*, N = 3; *A. ochraceus*, N = 2; *A. sclerotiorum*, N = 2), *Flavi* (*A. flavus*, N = 2), and one isolate from the section *Cremeri* (*A. dimorphicus*) which had similar morphological characteristics to Aspergilli from the *Circumdati* section, but the identity was confirmed after molecular analysis. The highest biodiversity was observed in the repaired locations in Gunja, where 7 different species were identified. At the repaired and unrepaired locations in Gunja, relative to the control sites in Gornji Stupnik, the species of section *Circumdati*, *A. tubingensis* from section *Nigri* and *A. flavus* from section *Flavi* are more prevalent. The identified molds of the genus *Aspergillus* are potential producers of mycotoxins, including ochratoxins, aflatoxins and fumonisins, thereby contributing to adverse human health effects of contaminated air inhalation.

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

Thesis includes: 31 pages, 3 tables and 90 references. Original is in Croatian language.

Keywords: flood, molds in air, aspergilli, *CaM*, *Nigri*, *Circumdati*, *Flavi*

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: September 2019

