

Ispitivanje aktivnosti elastaze u odabраниh vrsta aspergila iz sekcije Nigri

Jurinjak, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:163:893379>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-03**



Repository / Repozitorij:

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



Mia Jurinjak

**Ispitivanje aktivnosti elastaze u odabranih vrsta
aspergila iz sekcije *Nigri***

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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 doc. dr. sc. Daniele Jakšić.

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Danieli Jakšić na stručnom vodstvu, strpljenju i uloženom trudu prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima, sestri Lari te cijeloj obitelji na bezuvjetnoj potpori i ljubavi.

Hvala mom dečku Mihaelu, prijateljicama Vidi, Ivani x2, Lei, Anamariji, Mateji, Nikolini. Bez vas ništa ne bi bilo isto.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. PLIJESNI RODA <i>ASPERGILLUS</i> : NJIHOVA RAPROSTRANJENOST I ZNAČAJ ZA ČOVJEKA.....	1
1.2. UTJECAJ ASPERGILA NA ZDRAVLJE ČOVJEKA.....	2
1.3. ČIMBENICI VIRULENCIJE	5
1.4. METABOLIZAM DUŠIKA.....	6
2. OBRAZLOŽENJE TEME	7
3. MATERIJALI I METODE	8
3.1. PORIJEKLO IZOLATA.....	8
3.2. REAGENSI I HRANJIVE PODLOGE	8
3.3. VALIDACIJA METODE POMOĆU STANDARDA ELASTAZE.....	9
3.4. INOKULACIJA I ODREĐIVANJE ELASTAZNE AKTIVNOSTI ISPITIVANIH IZOLATA CRNIH ASPERGILA	9
4. REZUTATI	10
4.1. VALIDACIJA ISPITIVANJA ELASTAZNE AKTIVNOSTI NA ČVRSTOJ HRANJIVOJ PODLOZI.....	10
4.2. ELASTAZNA AKTIVNOST IZOLATA CRNIH ASPERGILA	12
5. RASPRAVA.....	21
6. ZAKLJUČCI.....	24
7. LITERATURA.....	25
8. SAŽETAK.....	30
9. SUMMARY	31
10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. PLIJESNI RODA *ASPERGILLUS*: NJIHOVA RAPROSTRANJENOST I ZNAČAJ ZA ČOVJEKA

Plijesni roda *Aspergillus* široko su rasprostranjene u okolišu, mogu se pronaći na biljkama, tlu, zraku, svježoj vodi. Također nađeni su u kućanstvima primjerice na zidovima ili kućanskim uređajima, pitkoj vodi i prašini (Paulussen i sur., 2017). Kao saprofiti rastu na vegetaciji koja truli, organskim kompostima, trulom lišću. Većina vrsta je prilagođena za razgradnju kompleksnih biljnih polimera, ali isto tako mogu rasti na drugim supstratima kao što je izmet, ljudska tkiva ili starinski pergament (Polacheck i sur., 1989). Svoju široku rasprostranjenost uvelike mogu zahvaliti prilagodljivosti različitim okolišnim čimbenicima kao što je visoka ili niska temperatura, promjenjivi aktivitet vode i pH, osmotski stres. Neke vrste čak mogu preživjeti u anoksičnim uvjetima pri čemu koriste nitrata te na taj način proizvode ATP (Paulussen i sur., 2017).

Aspergili uistinu jesu izuzetne plijesni, ne samo zato što su široko rasprostranjene već zato što imaju neizmjeran značaj za čovjeka u industriji i biotehnologiji. Još 1917. James Curie došao je do zanimljivog otkrića, da *Aspergillus niger* proizvodi visoke koncentracije limunske kiseline kada se uzgaja na mediju koji sadržava dovoljno šećera. Prije tog otkrića limunska kiselina bila je izolirana iz citrusnog voća te bila korištena u proizvodnji hrane i pića (Cairns i sur., 2018). Limunska kiselina je jedan od najčešće korištenih sastojaka prilikom proizvodnje hrane. Isto tako našla je svoj put u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, kao sredstvo za zakiseljavanje te pomaže u otapanju aktivnih supstanci (Baker i Bennett, 2008). *Aspergillus niger* je vrlo važna plijesan u industriji zbog proizvodnje glukonske kiseline koja se koristi za čišćenje aluminijskih konzervi, kao detergent prilikom pranja boca, kao aditiv u cementu, dok se soli glukonske kiseline koriste u terapiji deficijencije željeza i kalcija (Ramachandran i sur., 2006). Vrsta *Aspergillus niger* je od velikog značaja i u proizvodnji kruha. Ksilanaza koju proizvodi uvelike poboljšava kvalitetu kruha, smanjuje suhoću i krutost tijesta te povećava njegovu elastičnost (Ahmad i sur., 2011). Pored aspergila iz sekcije *Nigri* industrijski se upotrebljavaju i drugi aspergili, primjerice oni iz sekcije *Flavi*. Tako su pojedini sojevi od osobite važnosti u azijskoj kuhinji poznati pod nazivima *A. oryzae* i *A. sojae* kako bi se razlikovale od toksinogenih vrsta *A. flavus* odnosno *A. parasiticus* (Frisvad i sur., 2018). Plijesni otpuštaju amilaze koje potom kidaju α -1,4-glikozidne veze u škrobu koji se nalazi u riži, zatim dolazi do fermentacije te nastaje rižino vino koje ima bezbrojne lokalne varijacije i imena ovisno o zemlji i regiji.

Takozvane *Kōji* plijesni su također djelotvorne kod fermentacije mahunarki pri čemu nastaje miso i soja umak kao jedni od najpoznatijih (Bennett, 2009). Nekolicina sekundarnih metabolita *Aspergillus* vrsta ima veliki ekonomski značaj od kojih su statini i njihovi derivati među najpoznatijima. Statini su inhibitori 3-hidroksi-3-metil-glutaril CoA (HMG-CoA) reduktaze te su jedni od najbitnijih lijekova za snižavanje kolesterola te su među najpropisivanijim lijekovima. Prvi statin koji je odobren za ljudsku upotrebu, lovastatin, sekundarni je metabolit izoliran upravo iz vrste *Aspergillus terreus* (Tobert, 2003). Nadalje, *Aspergillus luchuensis* zbog sposobnosti proizvodnje enzima ferulične esteraze koristi se u proizvodnji poznatog japanskog pića *awamori*. Vanilin, koji daje poseban okus ovom destiliranom piću, nastaje nizom procesa iz ferulične kiseline koja se oslobađa iz staničnog zida zrnaca riže djelovanjem enzima ferulične esteraze (Maeda i sur., 2018).

1.2. UTJECAJ ASPERGILA NA ZDRAVLJE ČOVJEKA

Postoji više od 250 vrsta roda *Aspergillus*, a samo nekolicina uzrokuje bolest u čovjeka. *A.fumigatus* je najčešći ljudski patogen, no i druge vrste kao što je *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. lentulus* mogu uzrokovati bolesti. Ove plijesni proizvode konidije koje se mogu lako prenositi aerosolom (Caroll i sur., 2019). Prema različitim istraživanjima koncentracija konidija u zraku je od 0,2 do 15 konidija/m³, a u nekim područjima može sezati sve do 10⁶ konidija/m³. Jasno je da ljudi svakodnevno udišu stotine konidija. Unatoč stalnoj izloženosti konidijama očito je da većina ljudi ne razvije teži oblik bolest, isto tako ne postoje dokazi da je o protutijelima ili stanicama posredovana stečena imunost uključena u obranu (Park i Mehrad, 2009). U imunokompetentnih pojedinaca konidije su eliminirane mehanizmima urođene imunosti. Epitelne stanice dišnog sustava služe kao anatomska barijera inhaliranim konidijama. Od fagocitnih stanica prvu liniju obrane čine alveolarni magrofazi. Neutrofili i monociti iz periferne krvi su naknadno regrutirani na mjesto infekcije. Stanice prirodne ubojice (NK stanice) bivaju privučene u pluća kemokinima. NADPH oksidaza u fagocitima je esencijalna za obranu domaćina. Aktivacija NADPH oksidaza rezultira konverzijom kisika u superoksidni anion te dolazi do generacije metabolita sa antimikrobnom aktivnošću. Naročito su važni i receptori za prepoznavanje obrazaca koji prepoznaju mikrobne motive te pokreću mehanizme urođene imunosti. Za većinu pacijenata glavno mjesto ulaska jest respiratorni trakt. Iako mjesto ulaska može biti i koža, peritoneum, kosti, bubrezi, oči, gastrointestinalni trakt, nerespiratorne infekcije su rijetke (Latge, 1999; Segal, 2009).

Alergijske reakcije koje uzrokuju aspergili variraju te se očituju različitim kliničkim slikama od iritacija kao što je konjunktivitis, kašalj ili rinitis pa sve do životno ugrožavajuće opstrukcije

dišnih puteva ili anafilaksije. U pojedinaca sklonih atopiji prilikom opetovanih susreta sa antigenima sa površine konidija aspergila dolazi do brze astmatske reakcije. Pri tome ne dolazi do kolonizacije pa je sama izolacija pacijenta iz takvog okruženja dovoljna za poboljšanje kliničke slike (Latge, 1999). Kod alergijskog sinusitisa prisutni su simptomi u gornjem dišnom sustavu uz glavobolju i bolove u predjelu lica. Kod bronhopulmonalnog oblika dolazi do germinacije konidija i kolonizacije bronhalnog stabla što uzrokuje bronhitis i opstrukciju disanja (Steinbach, 2008). Klinički gledano prisutna je astma, plućni infiltrati, eozinofilija, povišene razine IgE u serumu, hipersenzitivnost tipa I i tipa III. Simptomi koji prate ovaj oblik bolesti su povišena tjelesna temperatura, kašalj i otežano disanje (Barness i Marr, 2006).

Aspergili često uzrokuju infekcije donjih dišnih puteva i paranazalnih sinusa te se može razviti opstruktivna bronhalna aspergiloza ili aspergilom. Aspergilom tzv. gljivična lopta, nastaje kada inhalirana konidija dospije u već postojeće pulmonalne šupljine koje su nastale kao posljedica kavernoznih bolesti poput tuberkuloze, sarkoidoze ili emfizema. Većina pacijenata je asimptomatska, dok neki razviju simptome poput kašlja, gubitka tjelesne mase, dispneje te pojave krvi u ispljuvku što može biti masivno i po život opasno. U tom slučaju potrebno je kirurško liječenje. Kod opstruktivne bronhalne aspergiloze ne dolazi do oštećenja tkiva, a najčešće nastaje u pacijenata koji imaju neku kroničnu plućnu bolest u podlozi poput cistične fibroze ili kroničnog bronhitisa.

Invazivna pluća aspergiloza je teška infekcija koja nastaje u imunokompromitiranih pacijenata koji boluju od leukemije, limfoma, AIDS-a, zatim kod bolesnika koji primaju kortikosteroide, kod primatelja transplantata koštane srži. Rizik je veći kod pacijenata koji primaju alogene hematopoetske matične stanice. Simptomi uključuju vrućicu, kašalj, dispneju te krv u ispljuvku. Iz pluća bolest se može proširiti na bubrege, jetru, mozak, gastrointestinalni trakt stvarajući apscese i nekrotizirajuće lezije.

Kod pacijenata u bolnicama koji su visokorizični vrlo je bitno prevenirati aspergilozu. Takvi bolesnici su smješteni u sterilne jedinice gdje je pozitivan tlak zraka, točno propisan broj izmjena zraka po satu te se zrak filtrira pomoću HEPA filtera (Carroll i sur., 2019; Kalenić i sur., 2013).

Rana i ciljana sistemska antifungalna terapija jedna je od ključnih faktora za uspješan ishod kod imunokompromitiranih pacijenata. Prema posljednjim smjernicama terapiju treba započeti vorikonazolom i/ili posakonozolom, dok je liposomalni amfotericin B prva alternativna terapija. Široko spektralni triazoli sprječavaju sintezu ergosterola u membrani gljivice te uzrokuju staničnu smrt. Amfotericin B, polien, veže se na ergosterol te stvara pore u membrani i time se povećava stanična propusnost što dovodi do stanične smrti. Ehinokandini koji

inhibiraju sintezu 1,3 beta glukana u staničnom zidu, isto se tako istražuju kao potencijalni lijekovi za tretiranje invazivne aspergiloze, kako sami, tako i u kombinaciji sa amfotericinom B i vorikonazolom. U liječenju bitnu ulogu ima i imunomodulatorna terapija. Ona je dizajnirana da poveća broj fagocitnih stanica i skрати trajanje neutropenije. Prognoze za pacijente koji su pogođeni invazivnom aspergilozom su vrlo slabe, a smrtnost vrlo visoka (Jenks i Hoenigl, 2018).

Crni aspergili (*Aspergillus* sekcija *Nigri*) su jedna od grupa koju je najteže klasificirati i identificirati. Vrste *A. brasiliensis*, *A. acidus*, *A. tubingensis*, *A. wewitschiae*, *A. niger* imaju vrlo slična morfološka svojstva te ih je na osnovu morfologije nemoguće sa sigurnošću razlikovati (Frías-De-León i sur., 2018; Szigeti i sur., 2012). Od molekularnih metoda koje su razvijane od velike je važnosti sekvenciranje gena za β -tubulin ili kalmodulin te su one pogodne i dostatne za razlikovanje vrsta unutar sekcije *Nigri* (Samson i sur., 2007; Susca i sur., 2007). Crni aspergili izolirani sa pacijenata koji boluju od otomikoze najčešće su identificirani kao *A. niger* ako se koriste konvencionalne morfološke metode (Munguia i Daniel, 2008). No, zahvaljujući ranije opisanim molekularnim analizama pokazano je kako uz *A. niger* i drugi aspergili iz sekcije *Nigri* mogu biti važni potencijalni oportunistički patogeni (Szigeti i sur., 2012). Vrste *A. welwitschiae*, *A. tubingensis*, *A. luchuensis*, *A. piperis* i *A. niger* spadaju u najčešće identificirane vrste crnih aspergila izolirane u okolišu iz zraka i prašine (Varga i sur., 2014; Jakšić i sur., 2020). Primjenom polifaznog pristupa u identifikaciji aspergila, osobito primjenom više različitih molekulskih markera i naprednih bioinformatičkih alata većina sojeva unutar vrste *A. niger* izdvojila se kao zasebna vrsta *A. welwitschiae*, prvotno imenovana kao *A. awamori* (Perrone i sur., 2011). U novijim istraživanjima u kojima je se pored molekularnih identifikacijskih markera gena za ITS, β -tubulin i kalmodulin koristi i identifikacija pomoću MALDI-TOF¹ metode potvrđeno je da su vrste *A. welwitschiae* i *A. tubingensis* najzastupljenije među kliničkim izolatima crnih aspergila (deHooge i sur., 2018). Prema tome, pri tumačenju ranijih istraživanja ne treba isključiti mogućnost da se radi o nekoj drugoj vrsti iz sekcije *Nigri* umjesto o vrsti *A. niger* koja se smatrala klinički najznačajnijom uz *A. tubingensis* (Chowdhary i Singh, 2005; Alcazar-Fuoli i sur., 2009; Balajee i sur., 2009)

Crni aspergili u značajnim količinama proizvode različite toksične metabolite uključujući mikotoksine okratoksin A i fumonizine (Frisvad i sur., 2011), ali i malformine, nafto- γ -pireone i bikumarine koji isto tako pokazuju toksične učinke što ukazuje na potrebu za praćenjem u hrani, stočnoj hrani te biotehnološkim proizvodima (Nielsen i sur., 2009).

¹ MALDI-TOF: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*

1.3. ČIMBENICI VIRULENCIJE

Zahvaljujući različitim molekulama koje proizvode, bakterije, virusi, gljivice i protozoe koloniziraju stanice, organe, organske sustave ili čitav organizam domaćina i pri tome izbjegavaju različite mehanizme imunosnog odgovora domaćina. Čimbenici virulencije igraju bitnu ulogu u patogenim učincima vrsta roda *Aspergillus*, a u razvoju infekcije jako je bitan imunosti status domaćina, odnosno, infekciji će biti podložnije imunokompromitirane osobe. U imunokompetentnih pojedinaca mehanizmi urođene imunosti odgovorni su za eliminaciju konidija, no u pacijenata neposredno nakon transplatacije organa te ostalih pacijenata na imunospresivnoj terapiji bolest se pojavljuje često (Latge, 1999). Sposobnost rasta pri temperaturi od 37 °C i rasponu pH od 1,5 do 9,8 te veličina koja omogućuje alveolarnu depoziciju, isto tako doprinose patogenosti (Krijgsheld i sur., 2013; Hogan i sur., 1996). Površina konidija prekrivena je štipčastim strukturama koje omogućavaju laganu disperziju i adheriranje na površine. Prilikom ulaska kroz dišni put maskiraju beta-1,3 glukane u staničnom zidu što ometa prepoznavanje od strane imunosnog sustava. Dihidroksinaftalen (DHN) melanin je glavni melaninski pigment koji omogućava preživljavanje konidije nakon fagocitoze od strane makrofaga tako što blokira acidifikaciju fagolizosoma te na taj način omogućava germinaciju i izlazak iz fagocitne stanice (Slesiona i sur., 2012). Za različite vrste aspergila identificirani su mnogobrojni čimbenici virulencije: adhezini, hidrolitički enzimi kao što su proteaze, fosfolipaze, ribonukleaze, restrikcijski enzimi, potom katalaze, superoksid dismutaze, α amilaze, mikotoksini i neproteinski metaboliti niske molekulske mase. Različiti faktori virulencije uzrokuju degradaciju tkivnih ugljikohidrata (α amilaza), proteina (proteaze), fosfolipida (fosfolipaze), pektina (pektinaze) i lipida (lipaze) (Raksha i sur., 2017). Formacija biofilma pomaže spriječiti fagocitozu i dozvoljava eksponencijalni rast (Loussert i sur., 2010). Hemolizin uzrokuje lizu crvenih krvnih stanica.

Vrste roda *Aspergillus* proizvode proteaze (metaloproteinaze, serinske proteaze, aspartil proteaze) koje su uključene u razgradnju strukturnih barijera domaćina te na taj način omogućavaju invaziju, a posebno su važne proteaze sa elastinolitičkom aktivnošću. Oko 30% plućnog tkiva se sastoji od elastina te su Kothary i suradnici prvi došli do otkrića kako je elastaza uključena u patogenost aspergila (Kothary i sur., 1984). Kasnije je pokazano da izolati uzeti od pacijenata sa invazivnom aspergilozom pokazuju elastinolitičku aktivnost *in vitro* (Rhodes i sur., 1988).

1.4. METABOLIZAM DUŠIKA

Dušik je esencijalan spoj koji je nužan za izgradnju bioloških struktura kao što su proteini ili nukleinske kiseline. Isto tako jedan je od glavnih nutrijenata koje aspergili trebaju da bi preživjeli. Kao primarni izvori dušika služe amonijak i glutamin, oni se najlakše asimiliraju uz najmanji utrošak energije. Jednom kada se amonijak nađe unutar citosola, glutamin sintetaza katalizira reakciju amonijaka i glutamata kako bi nastao glutamin, uz glutamat sintetazu dolazi zatim dolazi do transformacije sa 2-oksoglutaratom te nastaju dvije molekule glutamata (Perez-Cuesta i sur., 2021). Sekundarnim izvorima dušika smatraju se nitrat, amidi, purini, amino kiseline i kompleksni supstrati kao što je elastin i kolagen (Krappmann i Braus, 2005). Posebno valja spomenuti nitrat čija je asimilacija dio globalnog ciklusa dušika. Kada primarni izvori dušika nisu dostupni, ali je prisutan nitrat, koji se najčešće nalazi u tlu, klaster gena uključen u asimilaciju/utilizaciju nitrata eksprimiran je kroz aktivnost transkripcijskih aktivatora koji reagiraju na dušik (AreA i NirA), što posljedično omogućuje da se nitrat intracelularno konvertira (Hayer i sur., 2014). Metabolički put nitrata započinje ulaskom u stanicu pomoću nitrat-specifičnog transportera CrnA. Jednom kada se nađe unutar stanice nitrat reduktaza (NiaD) reducira nitrat u nitrit te posljedično nitrit reduktaza, NiiA, reducira nitrit u amonijak. Konačno, amonijak se inkorporira u strukturu glutamina ili glutamata kao što je opisano ranije (Perez-Cuesta i sur., 2021). Navedeni enzimi proučavani su kod vrste *A. nidulans*, genetski karakterizirani u vrsti *A. fumigatus* (Amaar i Moore, 1998). Također, geni za NiaD i NiiA su sekvencirani za vrstu *A. niger* (Unkles i sur., 1992).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Aspergili iz sekcije *Nigri* široko su rasprostranjene u prirodi i unutarnjim zatvorenim prostorima. Inhalacijom aerogenih čestica kod ljudi može doći do razvoja alergija ili infekcija, ovisno o imunosnom statusu pojedinca te ovisno o vrsti i količini udahnutih konidija i dijelova micelija. Budući da je elastaza važan čimbenik virulencije plućnih patogenih mikroorganizama, u ovome radu ispitana je elastazna aktivnost crnih aspergila *A. luchuensis*, *A. niger*, *A. piperis*, *A. tubingensis* i *A. welwitschiae* koji se najčešće pojavljuju u unutarnjim zatvorenim prostorima. Kako bi se ispitala mogućnost rasta spomenutih vrsta crnih aspergila u fiziološkim uvjetima, ispitane su karakteristike rasta spomenutih vrsta crnih aspergila na hranjivoj podlozi koja simulira fiziološke uvjete (podloga Brain heart infusion agar, BHI) 5, 7 ili 14 dana na 37 °C. Na hranjivoj podlozi Czapek Dox Agar (CDA) sa i bez nitrata ispitana je uloga dušika u rastu aspergila. Elastazna aktivnost ispitana je CDA bez nitrata uz dodatak 0,05-0,1 % supstrata elastin - kongo crvenog (ECR), a procijenjena je na temelju uočljive zone razgradnje ECR u podlozi. Indeks elastazne aktivnosti izračunat je kao omjer promjera zone obezbojenja koja odgovara razgradnji elastina uklopljenog u podlogu i promjera porasle kolonije nakon inkubacije 5, 7 ili 14 dana na 37 °C. Primjenjivost odabrane podloge za ispitivanje elastazne aktivnosti provedena je pomoću standarda enzima elastaze dodanog hranjivoj podlozi CDA sa supstratom ECR.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. PORIJEKLO IZOLATA

Izolati koji su korišteni u ovom ispitivanju (Tablica 1) uzeti su iz zbirke mikrobnih kultura Zavoda za mikrobiologiju, Farmaceutskog-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Svi izolati aspergila izolirani su iz zraka.

Tablica 1. Oznake zračnih izolata aspergila vrsta *Aspergillus luchuensis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus piperis*, *Aspergillus tubingensis* i *Aspergillus welwitschiae*.

Vrsta	Oznaka izolata
<i>A. luchuensis</i>	MFBF AN11054A
<i>A. niger</i>	MFBF AN11066B
<i>A. piperis</i>	MFBF AN11119B
<i>A. tubingensis</i>	MFBF AN10927B
<i>A. welwitschiae</i>	MFBF AN10924B

3.2. REAGENSI I HRANJIVE PODLOGE

- Kao izvor supstrata elastina u ispitivanju se koristio reagens elastin kongo crveno, ECR,(Sigma Aldrich, Njemačka) u koncentracijama 0,05-0,1 % ugrađenim u hranjivu podlogu uvijek nakon autoklaviranja.
- Standard enzima elastaze koji je sadržavao 4 U elastaze/ mg proteina (Sigma Aldrich, Njemačka) u aseptičkim uvjetima pripremljen je kao 5 jednostruko serijalno razrijeđenih otopina u sterilnoj otopini Tris pufera (5 mM Tris /HCl, pH=8,5).
- Za pripremu Czapek Dox agara, sa i bez ECR, korištena je gotova smjesa Czapek-Dox Broth (BD Difco™, SAD) uz dodatak agar-agara 15 g/l (Sigma Aldrich, Njemačka). Na ovaj način pripremljena otopina sterilizira se autoklaviranjem na 121°C tijekom 15 minuta.
- Za pripremu Czapek Dox agara bez natrijeva nitrata, sa i bez ECR u jednoj litri destilirane vode otopi se 30 g/l saharoze (C₁₂H₂₂O₁₁, Kemig, Zagreb, Hrvatska), 1 g/l dikalij fosfata (K₂HPO₄, Kemig, Zagreb, Hrvatska) , 0,5 g/l magnezij sulfata (MgSO₄, Kemig, Zagreb, Hrvatska), 0,5 g/l kalijeva klorida (KCl, Kemig, Zagreb, Hrvatska) te 0,01 g/l željezo sulfata (FeSO₄, Kemig, Zagreb, Hrvatska) uz dodatak 15 g/l agara (Sigma Aldrich, Njemačka). Na ovaj način pripremljena otopina se sterilizira autoklaviranjem na 121°C tijekom 15 minuta.

- Za pripremu Brain heart infusion agara (BHI) sa i bez ECR korišten je Brain Heart Infusion Broth (Sigma Aldrich, Njemačka) te je prema uputi proizvođača otopljeno 37 g/l destilirane vode uz dodatak 15 g/l agara. Na ovaj način pripremljena otopina sterilizira se autoklaviranjem na 121 °C tijekom 15 minuta.

3.3. ISPITIVANJE PRIMJENJIVOSTI PODLOGE CDA SA SUPSTRATOM ECR ZA ISPITIVANJE ELASTAZNE AKTIVNOSTI

Kako bi se utvrdilo da elastaza dovodi do razgradnje elastina iz ECR, po 30 µl otopine elastaze (0,0728 do 1,164 U) inokulirano je na papirnati disk na CDA agaru uz dodatak 0,05% ECR. Mjerenje prozirne zone razgradnje elastina (mm) provedeno je nakon 48 h inkubacije na 37 °C.

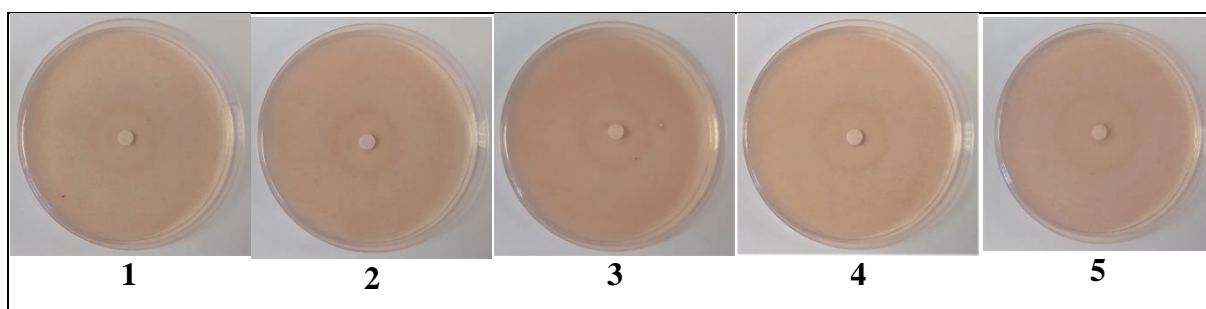
3.4. INOKULACIJA I ODREĐIVANJE ELASTAZNE AKTIVNOSTI ISPITIVANIH IZOLATA CRNIH ASPERGILA

Nakon što su pripremljene podloge mikropipetom je u aseptičkim uvjetima inokulirano po 2 µl suspenzije kondija plijesni ($\geq 10^7$ /ml), u otopini sastava glicerol:voda 1:1 V/V. Kulture su inkubirane 5, 7 i 14 dana na $37 \pm 0,2$ °C. Po isteku inkubacije, mjereni su promjer porasle kolonije (mm) te promjer zone razgradnje elastina (mm). Indeks aktivnost elastaze izračunat je prema modificiranoj metodi (Blanco i sur., 2002) prema formuli: $EAI = d(\text{elastaza})/d(\text{porasle kolonije})$ pri čemu je EAI - indeks aktivnosti elastaze; d (elastaza) - promjer zone razgradnje elastin –kongo crveno, a d (porasle kolonije) promjer porasle kolonije.

4. REZUTATI

4.1. ISPITIVANJE PRIMJENJIVOSTI PODLOGE CDA SA SUPSTRATOM ECR ZA ISPITIVANJE ELASTAZNE AKTIVNOSTI

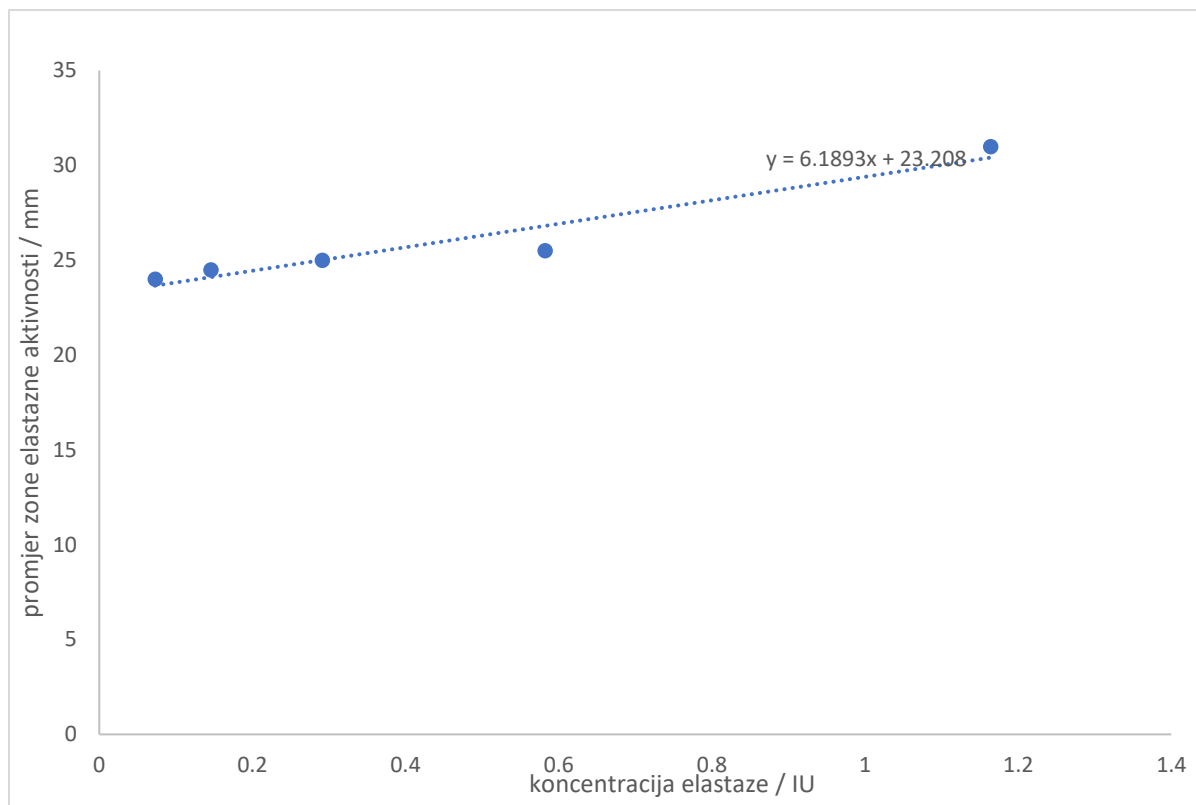
Ispitivanja koja su provedena s razrijeđenim otopinama standardne otopine elastaze jasno pokazuju da enzim razgrađuje elastin koji se nalazio u podlozi ugrađen kao ECR što je vidljivo kao zona obezbojenja (slika 1). Naime, ECR se ne otapa u hranjivoj podlozi već biva jednoliko raspršen u njoj u obliku crvenih granulica. Razgradnjom elastina boja kongo crveno iz ECR se otapa u hranjivoj podlozi što izgleda kao kružna zona oštro ograničena od ostatka podloge, a zbog niske lokalne koncentracije kongo crvenog vidi se kao zona obezbojenja. Promjer zone razgradnje elastina linearno povećava s porastom koncentracije enzima elastaze (slika 2). Izmjereni promjeri prikazani su u tablici 2.



Slika 1. Prikaz razgradnje elastina sa rastućim koncentracijama standardne otopine enzima elastaze (1-0,0728 U, 2-0,146 U, 3-0,291 U, 4-0,582 U, 5-1,164U) na CDA agaru uz dodatak supstrata 0,05% ECR nakon 48 h inkubacije na 37 °C.

Tablica 2. Izmjereni promjer zone razgradnje elastina pridružen koncentracijama standardne otopine enzima elastaze na CDA agaru sa dodatkom 0,05% ECR. Sva mjerenja su provedena u duplikatu, a promjer je prikazan kao raspon (od-do).

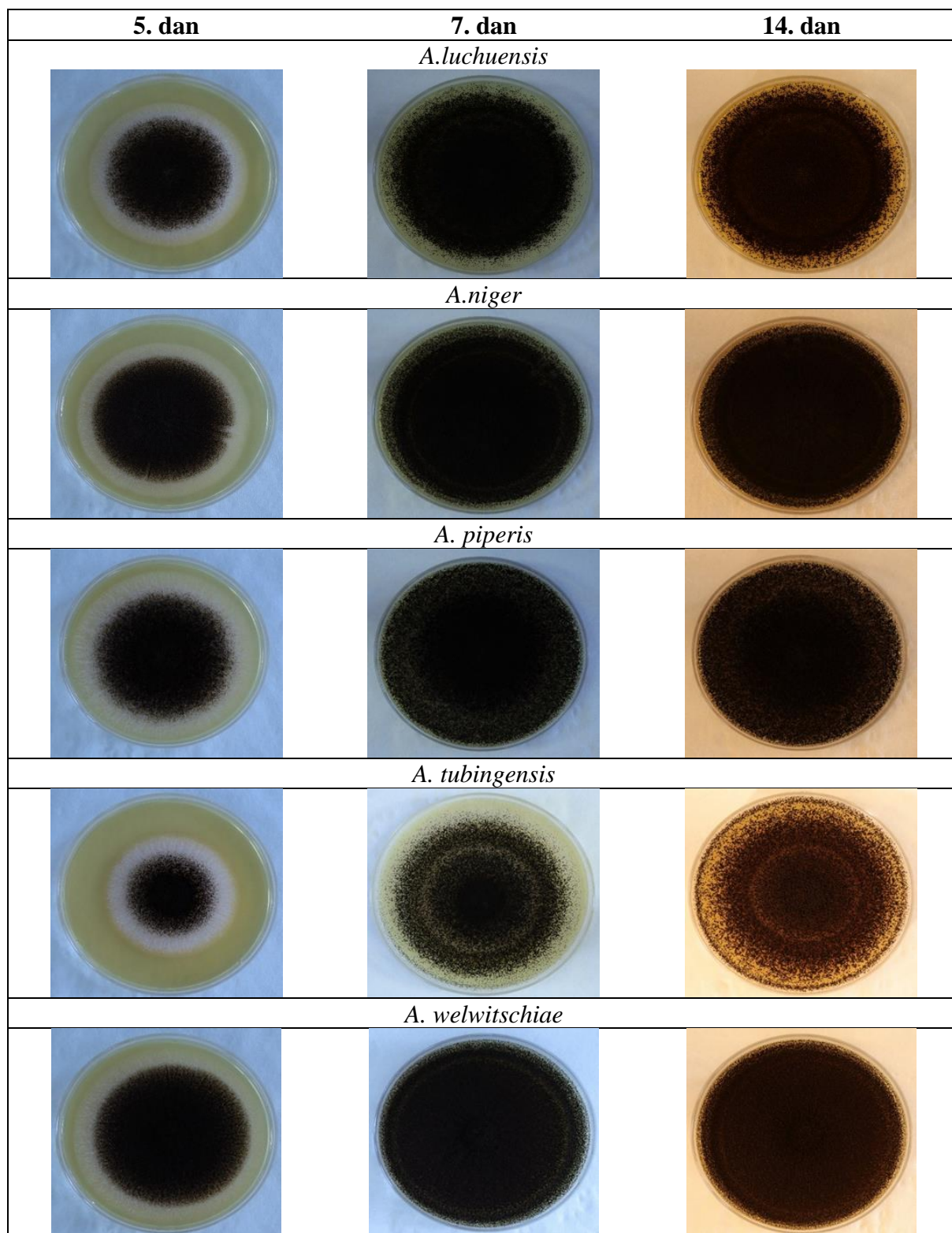
elastaza (U)	0,0728	0,146	0,291	0,582	1,164
r (mm)	24-24	24-25	24-26	25-26	30-32



Slika 2. Linearna ovisnost promjera zone elastazne aktivnosti o koncentraciji elastaze.

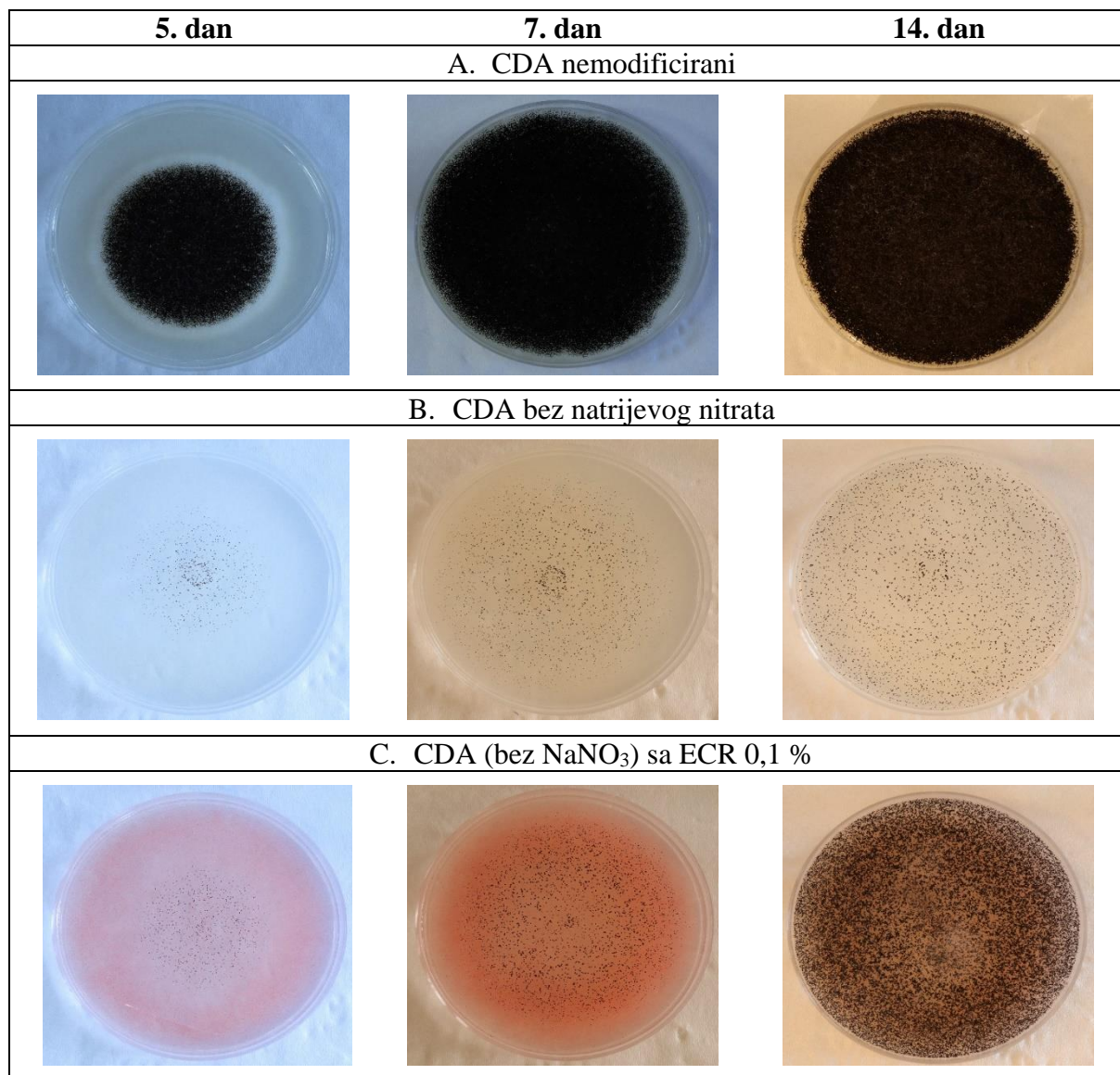
4.2. ELASTAZNA AKTIVNOST IZOLATA CRNIH ASPERGILA

Hranjiva podloga BHI zbog svojih komponenta, infuzije goveđeg srca i telećeg mozga, organskog peptona, vrlo dobro simulira fiziološke uvjete pa je korisna pri simulaciji fizioloških uvjeta *ex vivo*. Vrste *A. luchuensis*, *A. niger*, *A. piperis*, *A. tubingensis*, *A. welwitschiae* pokazuju gust rast na ovoj podlozi te se promjer povećava razmjerno periodu inkubacije (slika 3). Najveće razlike u promjeru porasle kolonije vidljive su 5. dan inkubacije. Na temelju promjera poraslih kolonija 5. dana inkubacije možemo zaključiti da najbrže raste *A. piperis*, a slijede ga izolati vrsta *A. welwitschiae*, *A. niger*, *A. luchuensis* dok *A. tubingensis* najsporije raste. Promjer porasle kolonije *A. piperis* je 1,013 puta veći od promjera *A. welwitschiae*, 1,067 puta veći od promjera *A. niger*, 1,23 puta veći od promjera *A. luchuensis*. Najmanji promjer izmjeren je za *A. tubingensis*, promjer porasle kolonije *A. piperis* je 1,43 puta veći od promjera porasle kolonije *A. tubingensis*. Obzirom da su izolati svih ispitanih vrsta crnih aspergila pokazale dobar rast na ovoj podlozi na temperaturi 37 °C možemo zaključiti da se radi o potencijalnim patogenima za čovjeka.



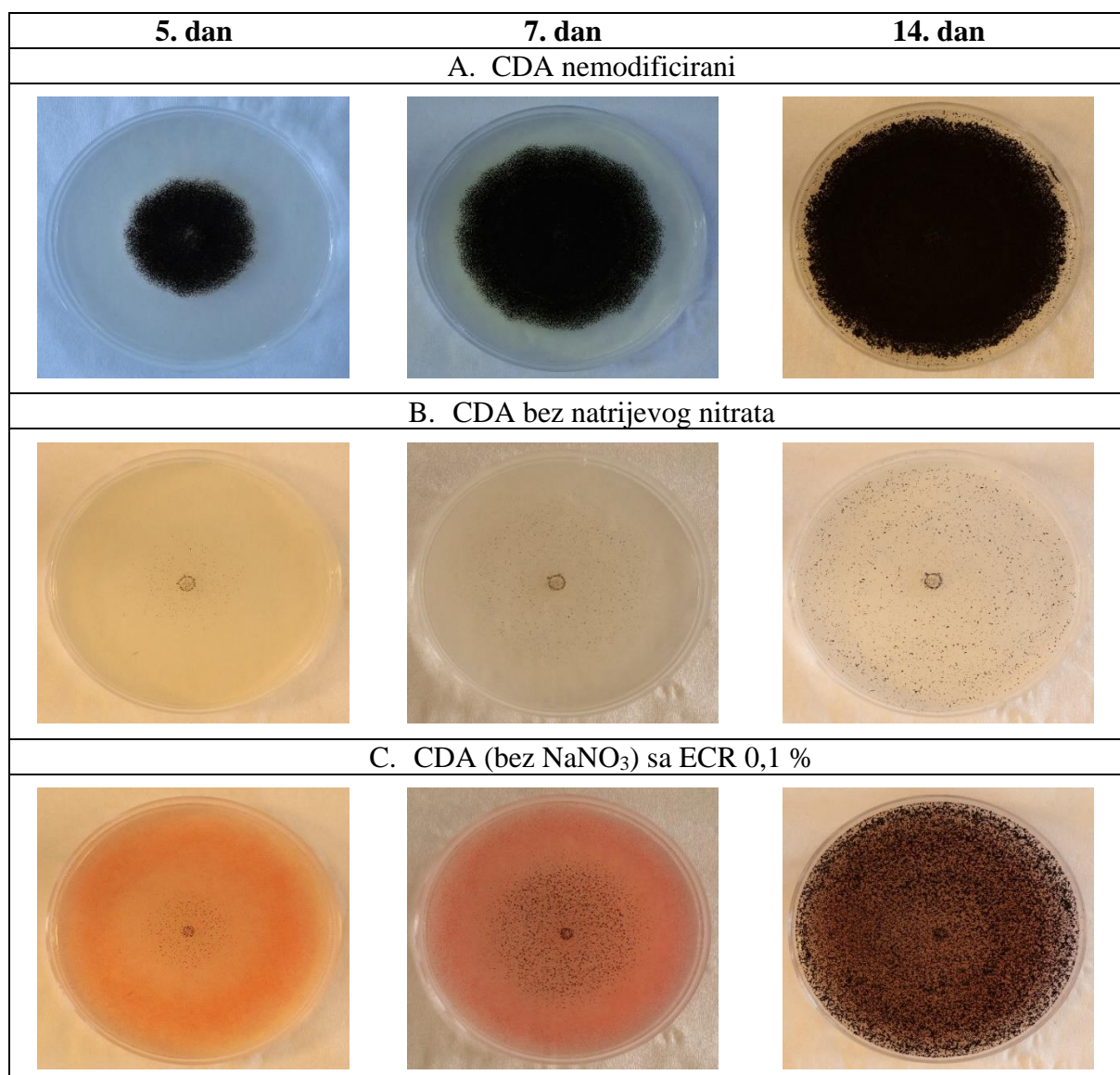
Slika 3. Prikaz rasta plijesni vrsta *A. luchuensis*, *A. niger*, *A. piperis*, *A. tubingensis*, *A. welwitschiae* nakon inkubacije 5, 7 i 14 dana na temperaturi 37 °C na hranjivoj podlozi BHI.

Porast kultura plijesni vrste *A. luchuensis* na različitim hranjivim podlogama modificiranim obzirom na udio anorganskog/organskog dušika prikazan je slici 4. Na podlozi CDA gdje je izvor dušika anorganski natrijev nitrat plijesan dobro raste, a promjer joj se povećava razmjerno periodu inkubacije (slika 4A). Kada se podlozi CDA ukloni natrijev nitrat uočava se vrlo slabi porast kojega obilježava prorijeđeni micelij i slaba sporulacija (slika 4B). Kada se u podlogu doda ECR umjesto anorganskog dušika plijesan raste proporcionalno periodu inkubacije (slika 4C), ali rast je rijedi no kada je u podlozi prisutan nitrat. Vidljivo je kako je enzim razgradio elastin koji se nalazio u podlozi ugrađen u ECR (slika 4C). Zonu razgradnje elastina bilo je moguće uočiti 5. dana pri čemu je promjer razgradnje bio veći od promjera porasta kolonije dok je 7. dana inkubacije zona razgradnje bila manja od promjera porasle kolonije.



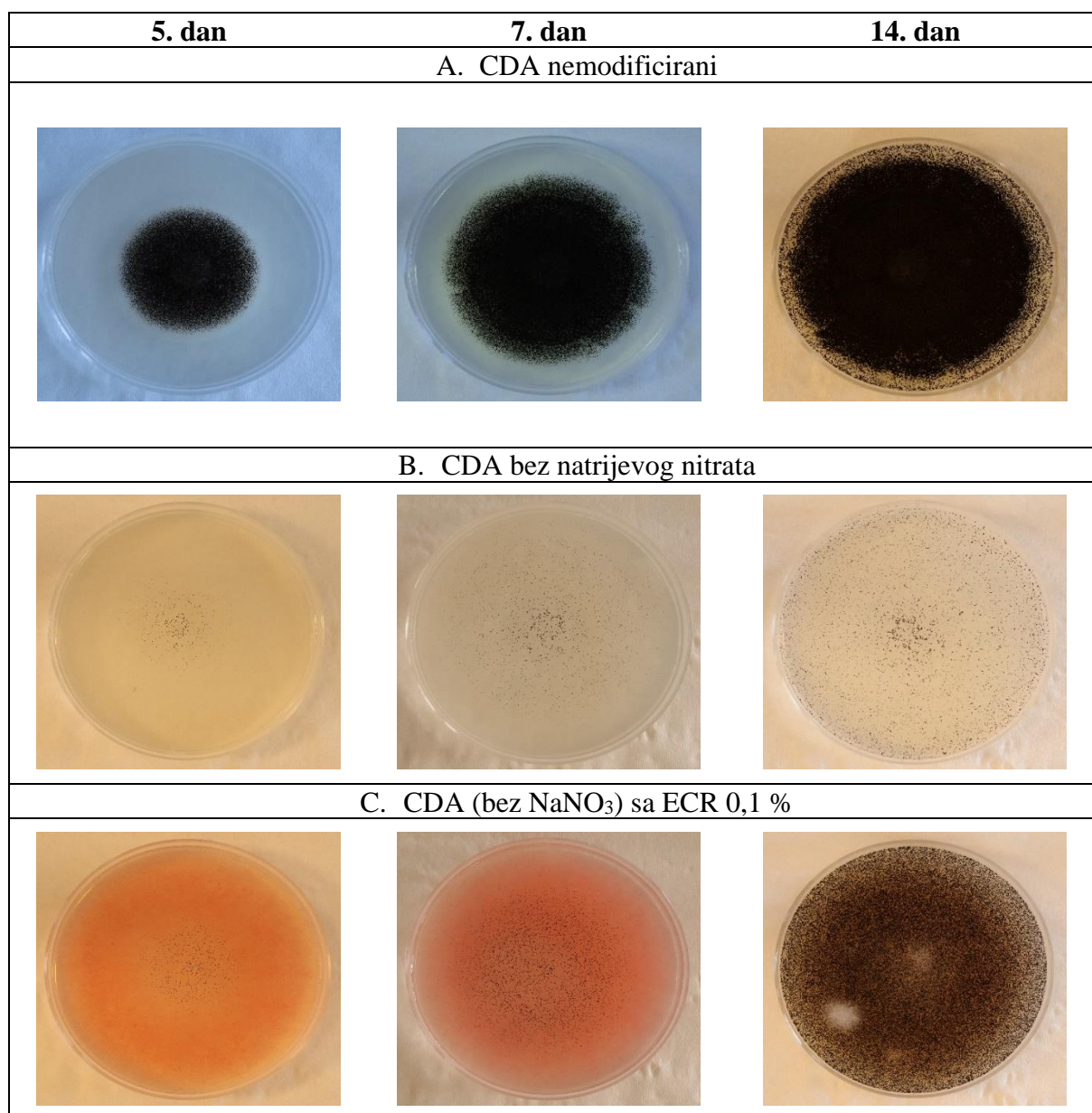
Slika 4. Prikaz rasta plijesni vrste *A. luchuensis* nakon inkubacije 5, 7 i 14 dana na 37 °C na naznačenim hranjivim podlogama modificiranim obzirom na izvor dušika.

Porast kultura plijesni vrste *A. niger* na različitim hranjivim podlogama modificiranim obzirom na udio anorganskog/organskog dušika prikazan je slici 5. Na podlozi CDA gdje je izvor dušika anorganski natrijev nitrat plijesan dobro raste, a promjer joj se povećava razmjerno periodu inkubacije (slika 5A). Kada se podlozi CDA ukloni natrijev nitrat uočava se vrlo slabi porast kojega obilježava prorijeđeni micelij i slaba sporulacija (slika 5B). Kada se u podlogu doda ECR umjesto anorganskog dušika plijesan raste proporcionalno periodu inkubacije (slika 5C), ali rast je rijedi no kada je u podlozi prisutan nitrat. Vidljivo je kako je enzim razgradio elastin koji se nalazio u podlozi ugrađen u ECR (slika 5C). Zonu razgradnje elastina moguće je odrediti 5. i 7. dana pri čemu se zona razgradnje povećava razmjerno periodu inkubacije.



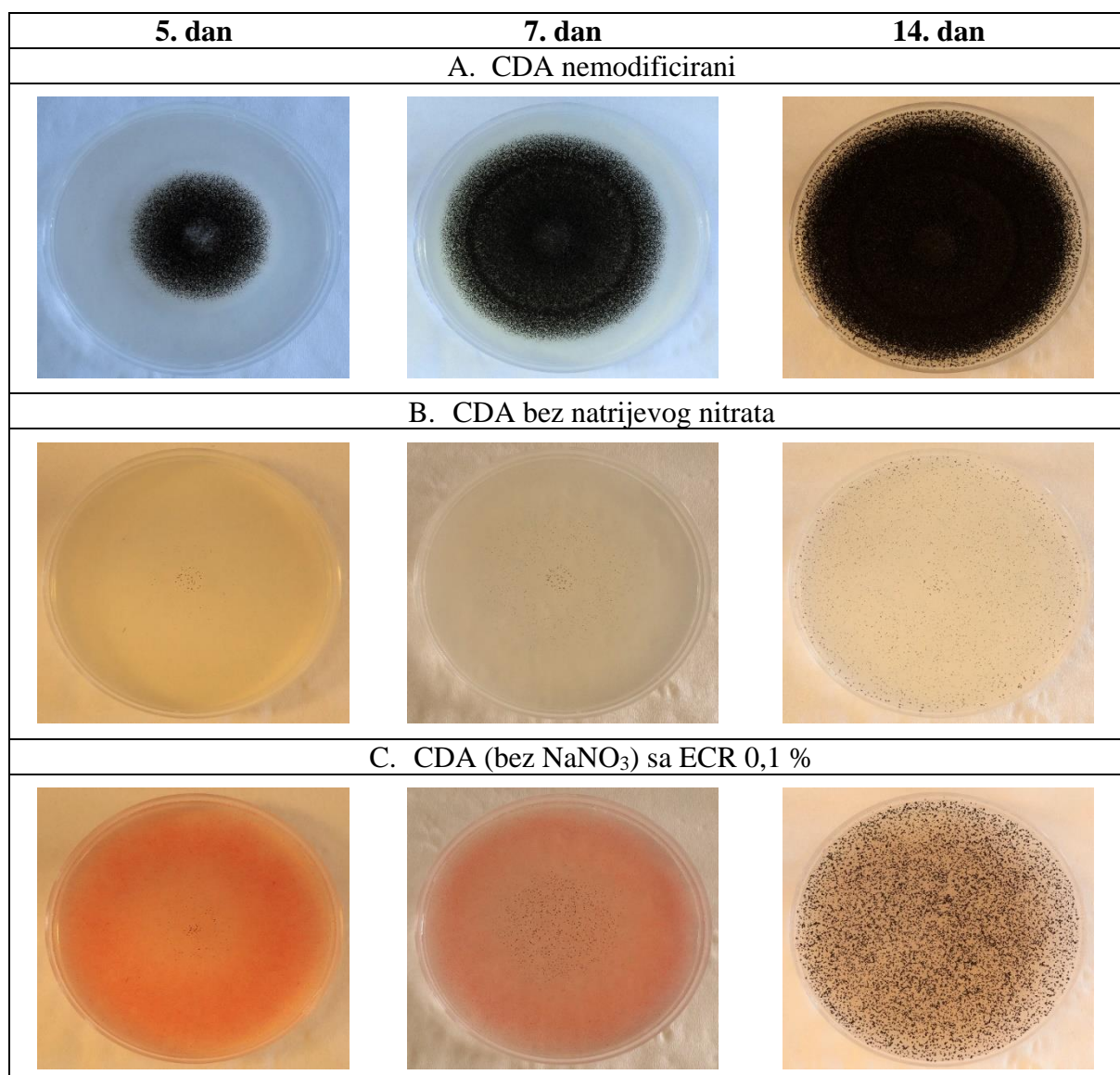
Slika 5. Prikaz rasta plijesni vrste *A. niger* nakon inkubacije 5, 7 i 14 dana na 37 °C na naznačenim hranjivim podlogama modificiranim obzirom na izvor dušika.

Porast kultura plijesni vrste *A. piperis* na različitim hranjivim podlogama modificiranim obzirom na udio anorganskog/organskog dušika prikazan je slici 6. Na podlozi CDA gdje je izvor dušika anorganski natrijev nitrat plijesan dobro raste, a promjer joj se povećava razmjerno periodu inkubacije (slika 6A). Kada se podlozi CDA ukloni natrijev nitrat uočava se vrlo slabi porast kojega obilježava prorijeđeni micelij i slaba sporulacija (slika 6B). Kada se u podlogu doda ECR umjesto anorganskog dušika plijesan raste proporcionalno periodu inkubacije (slika 6C). Zona razgradnje elastina vidljiva je 5. dan inkubacije.



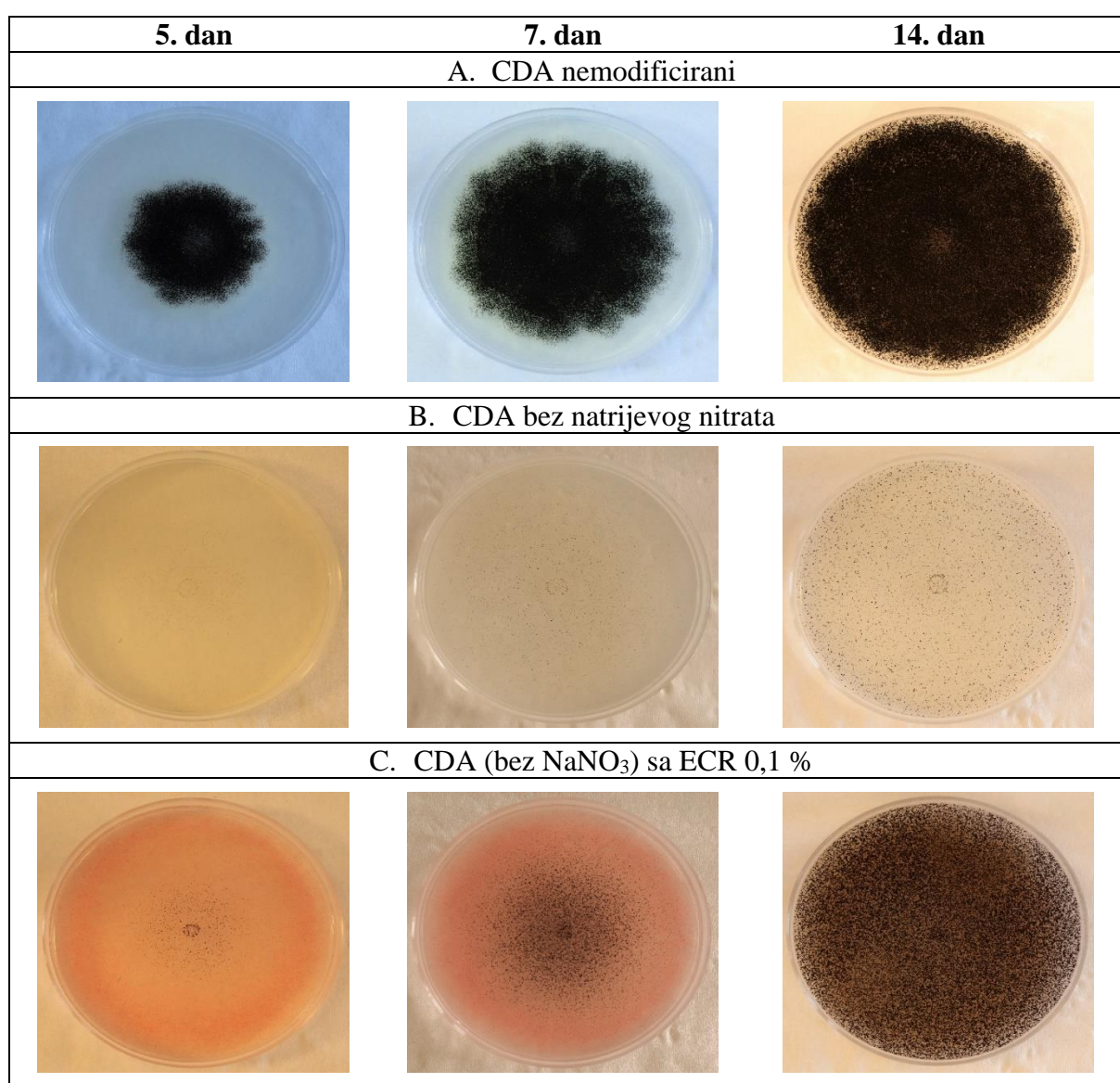
Slika 6. Prikaz rasta plijesni vrste *A. piperis* nakon inkubacije 5, 7 i 14 dana na 37 °C na naznačenim hranjivim podlogama modificiranim obzirom na izvor dušika.

Porast kultura plijesni vrste *A. tubingensis* na različitim hranjivim podlogama modificiranim obzirom na udio anorganskog/organskog dušika prikazan je slici 7. Na podlozi CDA gdje je izvor dušika anorganski natrijev nitrat plijesan dobro raste, a promjer joj se povećava razmjerno periodu inkubacije (slika 7A). Kada se podlozi CDA ukloni natrijev nitrat uočava se vrlo slabi porast kojega obilježava prorijeđeni micelij i slaba sporulacija (slika 7B). Kada se u podlogu doda ECR umjesto anorganskog dušika plijesan raste proporcionalno vremenu inkubacije, ali je micelij rijedi nego kad se u podlozi nalazi nitrat (slika 5C). Zonu razgradnje elastina bilo je moguće odrediti 7. dana inkubacije.



Slika 7. Prikaz rasta plijesni vrste *A. tubingensis* nakon inkubacije 5, 7 i 14 dana na 37 °C na naznačenim hranjivim podlogama modificiranim obzirom na izvor dušika.

Porast kultura plijesni vrste *A. welwitschiae* na različitim hranjivim podlogama modificiranim obzirom na udio anorganskog/organskog dušika prikazan je slici 8. Na podlozi CDA gdje je izvor dušika anorganski natrijev nitrat plijesan dobro raste, a promjer joj se povećava razmjerno periodu inkubacije (slika 8A). Kada se podlozi CDA ukloni natrijev nitrat uočava se vrlo slabi porast kojega obilježava prorijeđeni micelij i slaba sporulacija (slika 8B). Kada se u podlogu doda ECR umjesto anorganskog dušika plijesan raste proporcionalno periodu inkubacije (slika 8C), ali micelij je izrazito prorijeđen, gotovo nevidljiv u odnosu na podlogu sa nitratom. Vidljivo je kako je enzim razgradio elastin koji se nalazio u podlozi ugrađen u ECR (slika 8C). Zonu razgradnje elastina bilo je moguće odrediti 5. dan inkubacije.



Slika 8. Prikaz rasta plijesni vrste *A. welwitschiae* nakon inkubacije 5, 7 i 14 dana na 37 °C na naznačenim hranjivim podlogama modificiranim obzirom na izvor dušika.

Indeksi elastazne aktivnosti za ispitane vrste prikazani su u tablici 4. Najveći indeks elastazne aktivnosti bilo je moguće odrediti za vrstu *A.niger* petog dana inkubacije te se kretao u rasponu od 1,556 do 1,680. Zatim slijedi vrsta *A. tubingensis* za koju je indeks bilo moguće odrediti sedmog dana inkubacije te se kretao u rasponu od 1,5 do 1,54. Za vrstu *A. welwitschiae* indeks je bilo moguće odrediti petog dana inkubacije te se kretao u rasponu od 1,286 do 1,429. Za vrstu *A. luchuensis* indeks elastazne aktivnosti određen je 5. dana te je iznosio 1,14 dok je 7. dana inkubacije promjer zone razgradnje bio manji od porasle kolonije. Za vrstu *A. piperis* aktivnost je zabilježena 5. dan inkubacije te je indeks elastazne aktivnosti iznosio 1,07. Petog dana inkubacije zona obezbojenja bila je veća za *A. welwitschiae* 1,13 puta nego za *A. niger*. Četrnaestog dana aktivnost je zabilježena za vrste osim *A. piperis* te je indeks aktivnosti bio najveći za *A. niger*, a najmanji za *A. welwitschiae*. Zona obezbojenja je bila veća za *A. welwitschiae* 1,37 puta nego za *A. niger*, ali treba uzeti u obzir da je i promjer porasle kolonije za *A. welwitschiae* bio veći. Također u razmatranje treba uzeti kako je 14. dana sam rub Petrijeve zdjelice bio limitirajući za porast kolonije i produkciju elastaze. Istraživanje aktivnosti je provedeno i na hranjivoj podlozi BHI uz dodatak susprata elastin – kongo crveno, no zbog same pigmentacije podloge nije bilo moguće izmjeriti zonu obezbojenja.

Tablica 4. Prikaz indeksa aktivnosti elastaze za vrste *A. luchuensis*, *A. niger*, *A. piperis*, *A. tubingensis*, *A. welwitschiae* na hranjivoj podlozi CDA bez natrijeva nitrata uz dodatak supstrata elastin – kongo crveno (ECR) 0,1%.

	5.dan	7.dan	14.dan
		*EAI	
<i>A. luchuensis</i>	1,14	0,625	1,119 – 1,176
<i>A. niger</i>	1,556 – 1,680	1,139	1,192
<i>A. piperis</i>	1,07	-	-
<i>A. tubingensis</i>	-	1,5 - 1,54	1,0 – 1,092
<i>A. welwitschiae</i>	1,286 - 1,429	-	1,0

5. RASPRAVA

Dušik je esencijalan za rast i sposobnost plijesni da metaboliziraju širok spektar izvora dušika omogućava im da koloniziraju različite okolišne niše i prežive ukoliko su im nutrijenti ograničeni. Od svih okolišnih čimbenika, kvaliteta i kvantiteta izvora dušika koji je korišten u mediju ima utjecaja na rast i diferencijaciju, ali isto tako na sintezu brojnih sekundarnih metabolita u različitim *Aspergillus* vrsta (Tudzynski, 2014). U istraživanju koje su proveli Xue i suradnici (2004) dokazano je kako MAP kinaza koja je promatrana u *A. fumigatus* negativno regulira konidijalnu germinaciju, a aktivira se kao odgovor na ograničene ili uskraćene izvore dušika ili ugljika. U jednoj studiji koju su proveli Hayer i suradnici (2014) pokazano je kako različiti izvori dušika utječu na rast vrste *A. niger*. Na minimalnom mediju za rast aspergila (AMM) u kojemu je kao izvor ugljika korištena je D – galaktoza te anorganski izvori dušika kao što su pokazano je da su natrijev nitrat, natrijev nitrit i amonijev sulfat dostatni izvori dušika. Međutim, kompleksni izvori kao što je kvasčev ekstrakt, pepton, tripton i Casamino kiseline nužni su za micelijski rast, što je u skladu i sa rezultatima istraživanja ovog diplomskog rada. Naime, iako sve od ispitanih vrsta sporuliraju na hranjivoj podlozi bez nitrata, micelij je nerazvijen. Isto tako, usporedbom rasta na podlogama CDA i BHI opaženo je da u istom periodu inkubacije isti izolati aspergila brže i propulzivnije rastu na podlozi s kompleksnim organskim izvorima dušika, tj. BHI.

Uloga elastaze u patogenosti aspergila najbolje je istražena kod vrste *A. fumigatus*. Tako su Kothary i suradnici (1984) proveli istraživanje u koje je bilo uključeno 75 okolišnih izolata *A. fumigatus*, a elastazna aktivnost ispitana je u tekućem mediju i na agaru koji je sadržavao elastin. Od 71 izolata koji je pokazao aktivnost na agaru, njih 33 je produciralo elastazu u tekućem mediju. Zatim je po 6 izolata koji su producirali elastazu i po 4 onih koji nisu pokazali aktivnost testirano na imunokompromitiranim miševima. Svi miševi koji su bili izloženi izolatima koji su producirali elastazu umrli su u periodu od 48 do 96 sati. Autopsijom su u plućnom tkivu uginulih miševa bile vidljive hife te je bila prisutna nekroza aleveola (Kothary i sur., 1984). Još je jedna studija nastojala pokazati povezanost između elastazne aktivnosti i patogenosti vrste *A. fumigatus* u miša. Miševi su intravenozno inficirani konidijama. Određivala se elastazna aktivnost u serumu miševa te vrijeme preživljavanja istih pri čemu je zaključeno da postoji značajna veza između elastazne aktivnosti i vremena preživljavanja miševa s aspergilozom (Khosravi i sur., 2012). Rhodes i suradnici (1988) su svojim istraživanjem pokazali kako 38 kliničkih izolata *Aspergillus* sp. pokazuje elastaznu aktivnost

na agaru koji sadržava rose bengal-elastin. Svi izolati koji su uzrokovali invazivnu aspergilozu su producirali elastazu. Elastazna aktivnost proučavana je i na krutom mediju sastava elastina (0,05 %), bazna podloga ugljika iz kvasca (0,05%), rose bengal (0,01%) i agar (1,5%) u boratnom puferu (0,05M). Nakon 10 dana inkubacije na 37°C svi izolati vrste *A. fumigatus* osim jednog koji su izolirani iz pacijenata sa invazivnom aspergilozom pokazivali su indeks aktivnosti elastaze, $EAI \geq 1$. Naposljetku, 44 od 142 izolata koji su prikupljeni iz okoliša pokazivali su indeks aktivnosti elastaze $EAI \geq 1$ (Blanco i sur., 2002). Dostupni su i rezultati istraživanja proteazne aktivnosti kliničkih i okolišnih izolata aspergila (Raksha i sur., 2017). Sojevi kliničkih izolata pokazali su visok udio proteazne aktivnosti (87,17 %) dok je kod okolišnih izolata udio onih sa proteaznom aktivnošću bio nešto niži (41,02 %). Što se tiče crnih aspergila, proteaznu aktivnost pokazalo je 16/18 izolata vrste *A. niger*. U ranijim istraživanjima utvrđeno je da izolati vrste *A. welwitschiae* pokazuju veću elastaznu aktivnost nego izolati vrste *A. niger*, iako je kod određenih izolata vrste *A. niger* utvrđena vrlo visoka aktivnost (Varga i sur., 2011). U istraživanju kojega su proveli Denning i suradnici (1993) ni jedan od 5 ispitanih izolata vrste *A. niger* nije pokazao elastaznu aktivnost.

U ovome radu pokazana je elastazna aktivnost za vrste *A. luchuensis*, *A. niger*, *A. piperis*, *A. tubingensis* i *A. welwitschiae* pri čemu je ona najveća za *A. niger* te se kretala u rasponu od 1,556 do 1,680. Iz prethodno spomenutih istraživanja jasno je kako *Aspergillus* vrste iz sekcije *Nigri* pokazuju elastaznu aktivnost što je i pokazano u ovome u radu. Također, treba uzeti u obzir da je suvremeni pristup u identifikaciji vrsta aspergila iz sekcije *Nigri* razvijen tek nakon 2007., stoga vrste koje su ranije identificirane kao *A. niger* mogu zapravo pripadati drugim vrstama iz ove sekcije. Vrste *A. tubingensis* i *A. welwitschiae* najčešći su klinički izolati crnih aspergila (deHooge i sur., 2018), u ovom radu izmjerena je elastazna aktivnost za ove vrste što ukazuje na dodatan potencijalni rizik za zdravlje. Vrsta *A. niger* također uzrokuje infekcije u ljudi (Lalgé, 1999) čemu doprinosi elastaza čija je aktivnost za ovu vrstu izmjerena u ovom istraživanju. Vrste *A. tubingensis* i *A. welwitschiae* spadaju među najučestalije vrste crnih aspergila u zraku, dok su vrste *A. luchuensis*, *A. niger* i *A. piperis* slabije zastupljene (Varga i sur., 2014; Jakšić i sur., 2020). Sve ispitane vrste crnih aspergila *A. luchuensis*, *A. niger*, *A. piperis*, *A. tubingensis* i *A. welwitschiae* dobro rastu na podlozi BHI koja simulira fiziološke uvjete, a pokazano je i da mogu razgrađivati elastin kada je ugrađen u hranjivu podlogu. Stoga i vrste *A. luchuensis* i *A. piperis* i *A. welwitschiae*, a ne samo vrste *A. niger* i *A. tubingensis* predstavljati rizik za zdravlje ljudi. Dok je elastazna aktivnost ranije utvrđena za *A. niger*, *A. tubingensis* i *A. welwitschiae* (Varga i sur., 2011; Blanco i sur., 2002;), u ovom diplomskom radu prvi puta je pokazana kod vrsta *A. luchuensis* i *A. piperis*. Kod *A. luchuensis* ova aktivnost

može biti korisna obzirom da se radi o industrijski važnoj vrsti u proizvodnji hrane, međutim treba imati na umu potencijalnu opasnost za ljude ukoliko dođe do inhalacije aerogenih čestica ove vrste aspergila, osobito kod profesionalne izloženosti. Iako je vrsta *A. piperis* prema dostupnim podacima u okolišu zastupljena mnogo manje u odnosu na vrste *A. tubingensis* i *A. welwitschiae* (Varga i sur., 2014; Jakšić i sur., 2020) uzimajući u obzir da je riječ o brzo rastućoj vrsti sa elastaznom aktivnošću i ova vrsta može biti povezana s nepovoljnim kliničkim ishodima.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata istraživanja elastazne aktivnosti različitih vrsta aspergila iz sekcije *Nigri* na krutim hranjivim podlogama modificiranim obzirom na izvor dušika uz različite koncentracije ECR doneseni su sljedeći zaključci:

- Izolati *A. luchuensis*, *A. niger*, *A. piperis*, *A. tubingensis*, *A. wewitschiae* su pokazali dobar rast na BHI hranjivoj podlozi koja dobro simulira fiziološke uvjete
- Za rast kolonije potreban je izvor dušika, bilo organski ili anorganski. Sve ispitane vrste pokazale su rast na podlozi koja je sadržavala dušik u obliku natrijeva nitrata koji je anorganski, dok na podlozi koja nije sadržavala nitrat rasta nije bilo. Isto tako i na podlozi koja je sadržavala kompleksni organski izvor dušika pokazan je izraženiji i propulzivniji rast u odnosu na medij sa anorganskim izvorom dušika.
- U ovom radu je pokazano kako je dušik osobito važan nutrijent za razvoj micelija crnih aspergila.
- Najveći indeks aktivnosti elastaze pokazao je izolat vrste *A. niger*, a indeks elastazne aktivnosti kretao se u rasponu od 1,556 do 1,680 te je zabilježen 5. dan inkubacije
- Za izolat vrste *A. wewitschiae* najveća elastazna aktivnost izmjerena je 5. dan od inkubacije indeks aktivnosti elastaze kretao u rasponu od 1,286 do 1,429.
- Izolat vrste *A. tubingensis* je 7. dan inkubacije pokazao elastaznu aktivnost, indeks aktivnosti elastaze kretao se od 1,5 do 1,54.
- Izolat vrste *A. luchuensis* je 14. dana inkubacije pokazao elastaznu aktivnost, a indeks aktivnosti elastaze kretao se u rasponu od 1,119 do 1,176.
- Izolat vrste *A. piperis* je 5. dana mjerenja pokazao elastaznu aktivnost, a indeks aktivnosti elastaze iznosio je 1,07.
- U ovome radu po prvi puta je utvrđena elastazna aktivnost kod vrsta *A. luchuensis* i *A. piperis* što i ove vrste svrstava među rizične za zdravlje ljudi.

7. LITERATURA

- Ahmad Z, Butt MS, Ahmed A, Riaz M, Sabir SM, Farooq U, Rehman FU. Effect of *Aspergillus niger* xylanase on dough characteristics and bread quality attributes. *J Food Sci Technol*. 2014, 51, 2445-2453.
- Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Species identification and antifungal susceptibility patterns of species belonging to *Aspergillus* section *Nigri*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53, 4514-4517.
- Amaar YG, Moore MM. Mapping of the nitrate-assimilation gene cluster (*crnA-niiA-niaD*) and characterization of the nitrite reductase gene (*niiA*) in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Genet*, 1998, 33, 206-215.
- Baker SE, Bennett JW. An Overview of the Genus *Aspergillus*. U: The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology and Research Methods. Osmani SA, Goldman GH, Uredneci, Boca Raton, CRC Press, 2008, str. 3-11.
- Balajee SA, Kano R, Baddley JW, Moser SA, Marr KA, Alexander BD, Andes D, Kontoyiannis DP, Perrone G, Peterson S, Brandt ME, Pappas PG, Chiller T. Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the Transplant-Associated Infection Surveillance. *J Clin Microbiol*. 2009, 47, 3138-3141.
- Barnes PD, Marr KA. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. *Infect Dis Clin North Am*, 2006, 20, 545-561.
- Bennett JW. *Aspergillus*: a primer for the novice. *Med. Mycol*, 2009, 47, 5-12.
- Blanco JL, Hontecillas R, Bouza E, Blanco I, Pelaez T, Muñoz P, Perez Molina J, Garcia ME. Correlation between the elastase activity index and invasiveness of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*, 2002, 40, 1811-1813.
- Cairns TC, Nai C, Meyer V. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. *Fungal Biol Biotechnol*, 2018, 5, 1-14.
- Carroll KC, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, Mitchell TG, McKerrow JH, Sakanari JA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 27e. McGraw Hill, 2019, str. 690-691.

- Chowdhary A, Singh K. Spectrum of fungal keratitis in North India. *Cornea*, 2005, 24, 8-15.
- Denning DW, Elliott J, Keaney M. Temperature-dependent expression of elastase in *Aspergillus* species. *J Med Vet*, 1993, 31, 455-458.
- D'hooge E, Becker P, Stubbe D, Normand AC, Piarroux R, Hendrickx M. Black aspergilli: A remaining challenge in fungal taxonomy? *Med Mycol*, 2019, 57, 773–780.
- Frías-De-León MG, Rosas-de Paz E, Arenas R, Atoche C, Duarte-Escalante E, Molina de Soschin D, Acosta-Altamirano G, Reyes-Montes MR. Identification of *Aspergillus tubingensis* in a primary skin infection. *J Mycol Med*, 2018, 28, 274-278.
- Frisvad JC, Larsen TO, Thrane U, Meijer M, Varga J, Samson RA, Nielsen KF. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. *PLoS One*, 2011, 6, e23496.
- Frisvad JC, Hubka V, Ezekiel CN, Hong SB, Nováková A, Chen A, Arzanlou M, Larsen TO, Sklenář F, Mahakarnchanakul W, Samson RA, Houbraeken J. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Stud Mycol*, 2018, 91, 37-59.
- Hayer K, Stratford M, Archer DB. Germination of *Aspergillus niger* conidia is triggered by nitrogen compounds related to L-amino acids. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80, 6046-53.
- Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev*, 1996, 9, 469-488.
- Jakšić D, Sertić M, Kocsube S, Kovačević I, Kifer D, Mornar A, Nigović B, Šegvić Klarić M. Post-flood impacts on occurrence and distribution of mycotoxin-producing *Aspergilli* from the sections *Circumdati*, *Flavi*, and *Nigri* in indoor environment. *J Fungi*, 2020, 6, 282.
- Jenks JD, Hoenigl M. Treatment of Aspergillosis. *J Fungi*, 2018, 4, 98.
- Kalenić S i suradnici. Medicinska mikrobiologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 561-563.
- Khosravi AR, Mahdavi Omran S, Shokri H, Lotfi A, Moosavi Z. Importance of elastase production in development of invasive aspergillosis. *J Mycol Med*, 2012, 22, 167-172.

- Kothary MH, Chase T Jr, Macmillan JD. Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice. *Infect Immun*. 1984, 43, 320-325.
- Krappmann S, Braus GH. Nitrogen metabolism of *Aspergillus* and its role in pathogenicity. *Med. Mycol*, 2005, 43, 31-40.
- Krijgsheld P, Bleichrodt R, van Veluw GJ, Wang F, Müller WH, Dijksterhuis J, Wösten HA. Development in *Aspergillus*. *Stud Mycol*, 2013, 74, 1-29.
- Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*, 1999, 12, 310-350.
- Loussert C, Schmitt C, Prevost MC, Balloy V, Fadel E, Philippe B, Kauffmann-Lacroix C, Latgé JP, Beauvais A. In vivo biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*. *Cell Microbiol*. 2010, 12, 405-410.
- Maeda M, Tokashiki Masashi, Tokashiki Midori, Uechi K, Ito S, Taira T. Characterization and induction of phenolic acid decarboxylase from *Aspergillus luchuensis*. *J Biosci Bioeng*, 2018, 126, 162-168.
- Munguia R, Daniel SJ. Ototopical antifungals and otomycosis: a review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2008,72, 453-459.
- Nielsen KF, Mogensen JM, Johansen M, Larsen TO, Frisvad JC. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 395, 1225-1242.
- Park SJ, Mehrad B. Innate immunity to *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Rev*, 2009, 22, 535-551.
- Paulussen C, Hallsworth JE, Álvarez-Pérez S, Nierman WC, Hamill PG, Blain D, Rediers H, Lievens B. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microb Biotechnol*, 2017, 10, 296-322.
- Perez-Cuesta U, Guruceaga X, Cendon-Sanchez S, Pelegri-Martinez E, Hernando FL, Ramirez-Garcia A, Abad-Diaz-de-Cerio A, Rementeria A. Nitrogen, iron and zinc acquisition: key nutrients to *Aspergillus fumigatus* virulence. *J Fungi*, 2021, 7, 518.
- Perrone G, Stea G, Epifani F, Varga J, Frisvad JC, Samson RA. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biol*, 2011, 115, 1138-1150.

- Polacheck I, Salkin IF, Schenhav D, Ofer L, Maggen M, Haines, JH. Damage to an ancient parchment document by *Aspergillus*. *Mycopath*, 1989, 106, 89-93.
- Raksha, Singh G, Urhekar AD. Virulence Factors Detection in *Aspergillus* isolates from clinical and environmental samples. *J Clin Diagn Res*. 2017, 11, DC13-DC18.
- Ramachandran S, Fontanille P, Pandey A, Larroche C. Gluconic acid: properties, applications and microbial production. *Food Technol. Biotechnol*, 2006, 44, 185-195.
- Rhodes JC, Bode RB, McCuan-Kirsch CM. Elastase production in clinical isolates of *Aspergillus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1988, 10, 165-70.
- Samson RA, Noonim P, Meijer M, Houbraken JAMP, Frisvad JC, Varga J. Diagnostic tools to identify black Aspergilli. *Stud Mycol*, 2007, 59, 129-145.
- Segal BH. Aspergillosis. *N Engl J Med*, 2009, 360, 1870-84.
- Slesiona S, Gressler M, Mihlan M, Zaehle C, Schaller M, Barz D, Hube B, Jacobsen ID, Brock M. Persistence versus escape: *Aspergillus terreus* and *Aspergillus fumigatus* employ different strategies during interactions with macrophages. *PLoS One*, 2012, 7, e31223.
- Steinbach WJ. Clinical Aspects of the Genus *Aspergillus*. U: The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology and Research Methods. Osmani SA, Goldman GH, urednici, Boca Raton, CRC Press, 2008, str. 359-376.
- Susca A, Stea G, Mulé G, Perrone G. Polymerase chain reaction (PCR) identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* based on the calmodulin gene. *Food Addit. Contam*, 2007, 24, 1154-1160.
- 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.
- Tobert JA. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nature reviews Drug discovery*, 2003, 2, 517-526.
- Tudzynski B. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Front Microbiol*. 2014, 5, 656.

- Unkles SE, Campbell EI, Punt PJ, Hawker KL, Contreras R, Hawkins AR, Van den Hondel CA, Kinghorn JR. The *Aspergillus niger* *niaD* gene encoding nitrate reductase: upstream nucleotide and amino acid sequence comparisons. *Gene*, 1992, 111, 149-155.
- 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, Szigeti G, Baranyi N, Vágvölgyi C, Despot DJ, 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.
- Xue T, Nguyen CK, Romans A, May GS. A mitogen-activated protein kinase that senses nitrogen regulates conidial germination and growth in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell*, 2004, 3, 557-560.

8. SAŽETAK

Plijesni roda *Aspergillus* sekcije *Nigri* široko su rasprostranjene u okolišu te su neizmjenjivo značajne čovjeku zbog široke primjene u biotehnologiji i industriji. Također, ove plijesni predstavljaju rizik za zdravlje. Ukoliko plijesni proizvode enzim elastazu koja razgrađuje elastin u plućnom tkivu, povećava se invazivnost plijesni.

Cilj ovog rada bio je ispitati uvjete rasta odabranih aspergila iz sekcije *Nigri* uključujući *Aspergillus luchuensis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus piperis*, *Aspergillus tubingensis* i *Aspergillus welwitschiae* nakon inkubacije 5, 7 i 14 dana na 37 °C na hranjivoj podlozi BHI koja sadrži ekstrakte mozga i srca te simulira fiziološke uvjete. Na podlogama CDA modificiranim s obzirom na udio anorganskog/organskog dušika ispitan je utjecaj dušika na rast plijesni (5, 7 i 14 dana na 37 °C). Elastazna aktivnost ispitana je na hranjivoj podlozi CDA bez nitrata uz dodatak supstrata elastin – kongo crveno (ECR), a procijenjena mjerenjem promjera razgradnje elastina provedeno 5., 7. i/ili 14. dan inkubacije na 37°C. Prikladnost modificirane CDA podloge sa ECR ispitana je pomoću standarda enzima elastaze nakon inkubacije 48 h na 37 °C.

Sve ispitane vrste pokazale su dobar, propulzivni rast na podlozi BHI razmjerno period inkubacije na 37 °C. Na podlozi CDA sa i bez nitrata pokazano je da je dušik neophodni nutrijent osobito važan za razvoj micelija plijesni.

Elastazna aktivnost dokazana je za izolate svih vrsta. Najveća aktivnost izmjerena je za vrstu *Aspergillus niger* te se ona kretala u rasponu od 1,556 do 1,680. Nešto niža elastazna aktivnost dokazana je kod vrsta *A. tubingensis* i *A. welwitschiae*, a po prvi puta je elastazna aktivnost pokazana kod vrsta *A. luchuensis* i *A. piperis*. Rezultati ovoga rada upućuju da i druge vrste crnih aspergila osim *A. niger*, *A. tubingensis* i *A. welwitschiae* mogu imati klinički značaj za čovjeka, posebno obzirom na utvrđenu elastaznu aktivnost ispitanih sojeva.

9. SUMMARY

The *Aspergillus* section *Nigri* are widespread in the environment and due to their application in biotechnology and industry they are immensely important to humans. Furthermore, these molds have the potential to cause health problems. If the molds produce the enzyme elastase which breaks down elastin in lung tissue, the invasiveness of the mold increases.

The aim of this paper was to examine the growth of selected *Aspergilli* from the section *Nigri* including *Aspergillus luchuensis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus piperis*, *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus welwitschiae* following five, seven and fourteen days of incubation at 37 °C on BHI agar containing brain and heart extracts and thus simulating physiological conditions. The impact of nitrogen on the fungal growth was investigated following five, seven and fourteen days of incubation at 37 °C on CDA agar modified with respect to the proportion of inorganic/organic nitrogen. Elastase activity was tested on the nitrate-free CDA with the addition of elastin - congo red (ECR) substrate. The measurement of the diameter of elastin degradation was carried out on the 5th, 7th and/or 14th day of incubation at 37°C. The suitability of the ECR-modified CDA was tested with elastase standard following 48 hrs incubation at 37°C.

All the tested isolates of the black *Aspergilli* showed good, propulsive growth on BHI medium. Growth characteristics on CDA, with or without nitrate, showed that nitrogen is essential nutrient for the growth of *Aspergilli*, especially for the mycelium development.

The elastase activity was demonstrated for all the tested isolates. The highest elastase activity was measured for *A. niger* isolate (EAI 1.556-1.680). Slightly lower levels of elastase activity were measured for *A. tubingensis* and *A. welwitschiae*, while elastase activity was demonstrated for *A. luchuensis* and *A. piperis* for the first time. The results of this paper suggest that other species of the black *Aspergilli* besides *A. niger*, *A. tubingensis*, and *A. welwitschiae* may be clinically significant for humans, especially considering the observed elastase activity.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Ispitivanje aktivnosti elastaze u odabranih vrsta aspergila iz sekcije *Nigri*

Mia Jurinjak

SAŽETAK

Plijesni roda *Aspergillus* sekcije *Nigri* široko su rasprostranjene u okolišu te su neizmjerno značajne čovjeku zbog široke primjene u biotehnologiji i industriji. Također, ove plijesni predstavljaju rizik za zdravlje. Ukoliko plijesni proizvode enzim elastazu koja razgrađuje elastin u plućnom tkivu, povećava se invazivnost plijesni. Cilj ovog rada bio je ispitati uvjete rasta odabranih aspergila iz sekcije *Nigri* uključujući *Aspergillus luchuensis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus piperis*, *Aspergillus tubingensis* i *Aspergillus welwitschiae* nakon inkubacije 5, 7 i 14 dana na 37 °C na hranjivoj podlozi BHI koja sadrži ekstrakte mozga i srca te simulira fiziološke uvjete. Na podlogama CDA modificiranim s obzirom na udio anorganskog/organskog dušika ispitan je utjecaj dušika na rast plijesni (5, 7 i 14 dana na 37 °C). Elastazna aktivnost ispitana je na hranjivoj podlozi CDA bez nitrata uz dodatak supstrata elastin – kongo crveno (ECR), a procijenjena mjerenjem promjera razgradnje elastina provedeno 5., 7. i/ili 14. dan inkubacije na 37°C. Prikladnost modificirane CDA podloge sa ECR ispitana je pomoću standarda enzima elastaze nakon inkubacije 48 h na 37 °C. Sve ispitane vrste pokazale su dobar, propulzivni rast na podlozi BHI razmjerno period inkubacije na 37 °C. Na podlozi CDA sa i bez nitrata pokazano je da je dušik neophodni nutrijent osobito važan za razvoj micelija plijesni. Elastazna aktivnost dokazana je za izolate svih vrsta. Najveća aktivnost izmjerena je za vrstu *Aspergillus niger* te se ona kretala u rasponu od 1,556 do 1,680. Nešto niža elastazna aktivnost dokazana je kod vrsta *A. tubingensis* i *A. welwitschiae*, a po prvi puta je elastazna aktivnost pokazana kod vrsta *A. luchuensis* i *A. piperis*. Rezultati ovoga rada upućuju da i druge vrste crnih aspergila osim *A. niger*, *A. tubingensis* i *A. welwitschiae* mogu imati klinički značaj za čovjeka, posebno obzirom na utvrđenu elastaznu aktivnost ispitanih sojeva.

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

Rad sadrži: 31 stranicu, 8 grafičkih prikaza, 4 tablice i 50 literaturanih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Aspergillus* sekcija *Nigri*, elastaza, dušik

Mentor: **Doc. dr. sc. Daniela Jakšić**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Doc. dr. sc. Daniela Jakšić**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Prof. dr. sc. Maja Šegvić Klarić, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Izv. prof. dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: veljača 2022.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Elastase activity in selected *Aspergillus* species from the *Nigri* section

Mia Jurinjak

SUMMARY

The *Aspergillus* section *Nigri* are widespread in the environment and due to their application in biotechnology and industry they are immensely important to humans. Furthermore, these molds have the potential to cause health problems. If the molds produce the enzyme elastase which breaks down elastin in lung tissue, the invasiveness of the mold increases. The aim of this paper was to examine the growth of selected *Aspergilli* from the section *Nigri* including *Aspergillus luchuensis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus piperis*, *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus welwitschiae* following five, seven and fourteen days of incubation at 37 °C on BHI agar containing brain and heart extracts and thus simulating physiological conditions. The impact of nitrogen on the fungal growth was investigated following five, seven and fourteen days of incubation at 37 °C on CDA agar modified with respect to the proportion of inorganic/organic nitrogen. Elastase activity was tested on the nitrate-free CDA with the addition of elastin - congo red (ECR) substrate. The measurement of the diameter of elastin degradation was carried out on the 5th, 7th and/or 14th day of incubation at 37°C. The suitability of the ECR-modified CDA was tested with elastase standard following 48 hrs incubation at 37 °C. All the tested isolates of the black *Aspergilli* showed good, propulsive growth on BHI medium. Growth characteristics on CDA, with or without nitrate, showed that nitrogen is essential nutrient for the growth of *Aspergilli*, especially for the mycelium development. The elastase activity was demonstrated for all the tested isolates. The highest elastase activity was measured for *A. niger* isolate (EI 1.556-1.680). Slightly lower levels of elastase activity were measured for *A. tubingensis* and *A. welwitschiae*, while elastase activity was demonstrated for *A. luchuensis* and *A. piperis* for the first time. The results of this paper suggest that other species of the black *Aspergilli* besides *A. niger*, *A. tubingensis*, and *A. welwitschiae* may be clinically significant for humans, especially considering the observed elastase activity.

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

Thesis includes: 31 pages, 8 figures, 4 tables and 50 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Aspergillus* section *Nigri*, elastase, nitrogen

Mentor: **Daniela Jakšić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Daniela Jakšić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

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

Gordana Maravić Vlahoviček, Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: February, 2022.

