

Bioraznolikost plijesni u vlažnom stambenom prostoru

Sviben, Lada

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:709698>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



Lada Sviben

**Bioraznolikost plijesni u vlažnom stambenom
prostoru**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

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 kroz izradu ovog diplomskog rada. Posebno hvala mami, tati i prijateljima na potpori, strpljenju i slušanju.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	3
3. MATERIJALI I METODE.....	4
3.1. Materijali.....	4
3.2. Metode.....	5
3.2.1. Presađivanje uzoraka.....	5
3.2.2. Izolacija DNA.....	5
3.2.3 Identifikacija.....	6
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	8
5. ZAKLJUČCI.....	12
6. LITERATURA.....	13
7. SAŽETAK.....	17
8. SUMMARY.....	18
9. Temeljna dokumentacijska kartica / Basic documentation card.....	19

1. UVOD

Plijesni su sveprisutne u okolišu, a njihova koncentracija u zraku se mijenja s okolišnim čimbenicima (Viegas i Brandão, 2016). Većina plijesni razmnožava se stvaranjem spora koje se prenose zrakom. Spore su tipično veličine 2-10 μm te mogu dugo opstati u zraku i taložiti se u dišnom sustavu ljudi, dok neke manje spore mogu doprijeti čak do alveola (Eduard, 2006). One mogu biti prenesene u unutrašnje prostore na površinama materijala i odjeće, također mogu ulaziti u zgrade aktivnom i pasivnom ventilacijom, pa se stoga nalaze unutar svih domova, uključujući onih koji nemaju problema sa vlagom. Unutrašnja koncentracija plijesni smatra se povišenom u vlažnim prostorijama i može imati utjecaj na zdravlje ljudi koji tamo žive. Vлага će se vjerojatnije dogoditi u građevinama koje su gušće naseljene i nemaju dobro grijanje, ventilaciju i izolaciju, a čak 20% građevina ima bar jedan znak vlage (Institute of medicine, 2004).

Glavni put izloženosti gljivičnim sporama je inhalacija, a izloženost plijesnima u domu predstavlja rizik za razvoj brojnih respiratornih simptoma, uključujući alergijski rinitis, astmu, alergijsku bronhopulmonarnu aspergilozu, sinusitis, hipersenzitivni pneumonitis, a može uzrokovati i kožne simptome kao što je atopijski dermatitis (Mota i Borrego, 2016; Viegas i Brandão, 2016). Vrste *Penicillium chrysogenum* i aspergili iz serije *Versicolores* su najčešće plijesni u vlažnim prostorima, no osim njih vrlo su često prisutne plijesni rodova *Chaetomium*, *Acremonium* i *Ulocladium* (Andersen i sur., 2011).

Razni su mehanizmi kojima plijesni utječu na ljudsko zdravlje, a većina mehanizama povezana je sa sposobnošću plijesni da proizvedu razne alergene, toksine i iritanse.

Mnoge vrste plijesni izlučuju alergene tipa I te je senzitivizacija imunoglobulinom E na učestale vanjske i unutrašnje rodove gljivica, kao što su *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* i *Cladosporium spp.* visoko povezana s alergijskim respiratornim bolestima, pogotovo astmom. Plijesni su također dobro znan izvor alergena tipa III koji induciraju IgG, a tu su uključeni rodovi *Penicillium* i *Aspergillus*, koji se mogu naći u gotovo svakom domu. U visokim koncentracijama, gljivice mogu biti uključene u kombinirane tip III i IV alergijske reakcije kao što je hipersenzitivni pneumonitis (WHO, 2009).

Mikotoksini su sekundarni gljivični metaboliti, biomolekule male relativne molekulske mase od kojih su neke toksične za ljude. Mikotoksini mogu interferirati RNA sintezu i uzrokovati oštećenje DNA. Neki mikotoksini, npr. aflatoksin kojeg izlučuju plijesni *Aspergillus flavus* i *A. parasiticus* su potentni karcinogeni grupe I (Verhoeff i sur., 1994). Rodovi *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* i *Stachybotrys* se najviše povezuju s ispuštanjem

mikotoksina, dok se u pljesnivim stambenim prostorima vrste *Aspergillus versicolor* i *Stachybotrys chartarum* smatraju najodgovornijim za spomenute respiratorne simptome (Hintikka i Nikulin, 1998; Pieckova, 2016). Bloom i sur. (2007) pokazali su da su mikotoksini koje ispuštaju *S. chartarum* i *A. versicolor*, npr. makrociklički trihoteceni, trihodermin, sterigmatocistin i satratoksin G, prisutni u većini uzoraka iz zgrada zahvaćenih vlagom (Lee i sur., 2016).

Sposobnost roda *Aspergillus* da tolerira širok spektar aktiviteta vode, pH i ionske snage čine ga čestom plijesni zatvorenih prostora (Samson, 2011). Osim što su česti u vlažnim domovima, aspergili su bitni humani patogeni. Čimbenici virulencije koji omogućuju aspergilima uspješnost kolonizacije pluća uključuju rast na 37°C, veličina (2-3 µm) te ekstracelularne hidrolaze elastaze, proteinaze, fosfolipaze (Ghorbel i sur., 2019). Toksični potencijal plijesni povezan je i s njihovom sposobnošću da ispuštaju brojne metabolite u koje su uključeni mikotoksini kao što su aflatoksin B1, fumonizin B2 i sterigmatocistin (Frisvad, 2015). *Aspergillus flavus*, koji može kolonizirati respiratorni trakt i uzrokovati gljivični rinosinusitis ili bronhopulmonarnu aspergilozu, ispušta aflatoksine koji smanjuju funkciju cilijarnog epitelnog sloja (Lee i sur., 2016). Na pokretljivost cilija utječe i kancerogeni mikotoksin sterigmatocistin kojeg izlučuju aspergili iz serije *Versicolores* (Ráduly i sur., 2020).

Vrsta *Stachybotrys chartarum* poznata je po svojim toksičnim metabolitima i povezana je s raznim ozbiljnim zdravstvenim problemima, uključujući mikotoksikoze, prisutne kod stanara pogođenih stambenih objekata (Johanning i sur., 1996; Croft i sur., 1986; WHO 2009). Dokazani su mnogi sekundarni metaboliti *S. chartaruma*, primjerice satratoksin G i H, izosatratoksin F, roridin A, E, H i L-2, verukarin A i J te atranon A i B, a najveća pažnja se posvećuje makrocikličkim trihotecenima, koji se smatraju jednim od najcitotoksičnijih trenutno poznatih spojeva (Nielsen, 2002; Došen i sur., 2016).

Rod *Penicillium* također ispušta razne mikotoksine, npr. ohratoksin A i patulin (Perrone i Susca, 2017).

Treba naglasiti i da interakcije metabolita iste ili različite vrste plijesni mogu imati različit, ponekad i toksičniji učinak od učinka samo jednog metabolita (Jakšić i sur., 2023). Zato je bitno imati na umu kompleksni sastav mikrobiote u stambenim prostorima i njegov utjecaj na stanare.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U ovom radu identificirati će se vrste plijesni izolirane iz uzoraka zraka (N=9) prikupljenog pomoću uređaja za uzorkovanje zraka (airsampler) i odgovarajućih hranjivih podloga (MEA, DG- 18¹) u stanu u kojem je uočen izražen problem s vlažnim zidovima i porastom plijesni u Zagrebu 2022. godine te u kontrolnim uzorcima prikupljenim u vanjskom zraku u neposrednoj blizini odabranog stana (N=2). Plijesni u uzorcima identificirati će se usporedbom nukleotidnih slijedova dijela regije ITS kod pojedinog izolata sa nukleotidnim slijedovima ITS referentnih i tipnih sojeva iz baza podataka *National Centre for Biotechnology Information Basic Local Alignment Tool* (NCBI-BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) te bazom ITS nukleotidnih slijedova pohranjenih u bazi *International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) Barcoding Database* (<https://its.mycologylab.org/>).

Pojavnost identificiranih plijesni usporedit će se s podacima dostupnim u literaturi te će se raspraviti o mogućim rizicima koje identificirane plijesni mogu imati na ljudsko zdravlje.

¹ MEA- Malt Extract Agar; DG-18- Dikloran-18% glicerolni agar

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Hranjive podloge

- Dikloran 18% glicerolni agar (DG-18; Oxoid, UK): glukoza 10 g, pepton 5 g, monokalijev fosfat (KH_2PO_4) 1 g, magnezijev sulfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) 0,5 g, agar 15 g, glicerol 220 g, dikloran (0,2% w/v u etanolu, 1 ml) 2 mg i kloramfenikol 100 mg.

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

- Malt – ekstrakt agar (MEA; Oxoid, UK): Malt ekstrakt (Oxoid CM0059) 50 g, cinkov sulfat heptahidrat ($\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) 0,01 g, bakrov sulfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) 0,005 g.

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

- Czapek-agar s kvašćevim ekstraktom (CYA, Difco, SAD): Czapek koncentrat [natrijev nitrat (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 (KH_2PO_4) 1 g, kvašćev ekstrakt 5 g, saharoza 30 g i agar 15 g.

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

- Sabouraud agar (SAB; Oxoid, UK): pepton, dekstroza, agar

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

Izolacija DNA i PCR analiza uzoraka

- NukleoSpin DNA Yeast kit (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Njemačka): lysis buffer MG, wash buffer BW 6, wash buffer B5, elution buffer BE, tekuća proteinaza K
- Početnice za PCR: V9G 10µM, LS266 10µM
- Taq HS DNA polimeraza (Takara Bio, Shiga, Japan)

- Sterilna voda
- Agarozna (SeaKem® LE Agarose, Lonza, Bazel, Švicarska)
- TAE pufer 50X: tris baza (40 mM), octena kiselina (20 mM) i EDTA (1 mM) u destiliranoj vodi, pH 8,3 (AccuGENE 50X; Lonza, Bazel, Švicarska)
Otopina pufera (1X) priredi se razrjeđivanjem destiliranom vodom
- Boja za praćenje gel elektroforeze (6x loading buffer, Takara Bio, higa, Japan)
- Fluorescentna boja GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X (Lonza, Bazel, Švicarska)

Uređaji

- Autoklav (φ 300 x 500, Sutjeska, Beograd, Srbija)
- Termoblok (Eppendorf ThermoMixer® C, Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Vorteks (IKA vortex 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- PCR uređaj (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, SAD)
- Aparat za elektroforezu (PowerPac Basic, Bio-Rad, Hercules, SAD)
- UV-komora (UVP EPI CHEMI darkroom, Cambridge Manufacturing Co Ltd., Brakey Road Corby, UK)
- Centrifuga (Tabletop Centrifuge Z 326 K, Hermle, LaborTechnik, Würzburg, Njemačka)

3.2. Metode

3.2.1. Presađivanje uzoraka

Uzorci zraka (N=9) prikupljeni su u stambenom prostoru zahvaćenom vlagom 2022. godine iz tri sobe i kontrolni uzorci vanjskog zraka u neposrednoj blizini zgrade (N=2) pomoću uređaja za uzorkovanje zraka i upotrebom hranjivih podloga MEA i DG-18. Uzorci su inkubirani u mraku na 25 °C 5-7 dana. Kako bi se dobile čiste kulture morfološki različitih plijesni svaka od različitih kolonija plijesni presađena je na zasebnu hranjivu podlogu (CYA, SAB ili DG18) u komori za izolaciju plijesni te su inkubirane u mraku na 25°C 3-7 dana.

3.2.2. Izolacija DNA

Iz micelija poraslih na čvrstim hranjivim podlogama provedena je izolacija genomske DNA upotrebom komercijalnog seta za izolaciju DNA (NucleoSpin DNA Yeast, Macherey-Nagel GmbH & Co., Njemačka) prema uputama proizvođača.

U svim izolatima genomske DNA u sterilnoj vodi, regije ITS su umnoženje lančanom reakcijom polimeraze (PCR) uz početnice V9G (5'-TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3') (DeHoog i sur., 1998) i LS266 (5'-GCATTCCCAAACAACACTCGACTC-3') (Masclaux i sur., 1995) te uz Taq HS polimerazu. Reakcija je provedena u termostatiranom PCR uređaju prema uvjetima prikazanim u Tablici 1.

Uspješnost PCR reakcije provedena je gel elektroforezom na temelju fluorescencije PCR produkata.

Gel je pripremljen otapanjem agaroze u TAE puferu (1X), tako da otopina agaroze u puferu bude 1,1% te se takva smjesa zagrijavala do vrenja. Nakon kratkog hlađenja, smjesa se ulije u kadicu u tankom sloju nakon čega se umetne češljic koji se nakon hlađenja vadi, a za njime ostaju jažice.

Po 2 μ L PCR produkta se pomješa sa 3 μ L sterilne ultračiste vode te se doda fluorescentna boja razrijeđena sa bojom za praćenje elektroforeze (1:1500). Takva smjesa se pipetira u jažice na gelu nakon čega se provodi elektroforeza pri 75 V, oko 10 minuta. PCR produkti su identificirani na temelju fluorescencije PCR produkta na 366 nm. Ako PCR nije bio uspješan, metoda se optimizira ponavljanjem postupka 3.2.3. uz optimizaciju uvjeta PCR reakcije, npr. promjenom temperature vezanja početnica.

Tablica 1. Uvjeti PCR reakcije

Reakcijski koraci	Temperatura/°C	Vrijeme/s
Inicijalna denaturacija DNA	95	120
Denaturacija DNA	95	20
Vezanje početnica	52-56	20
Elongacija	72	40
Završna elongacija	72	120

3.2.3 Identifikacija

Slijedovi nukleotida u uspješnim PCR produktima određeni su Sangerovom metodom u MacroGen Inc., Nizozemska. Identifikacija plijesni do razine vrste provedena je usporedbom nukleotidnih slijedova dijela regije ITS kod pojedinog izolata sa nukleotidnim slijedovima ITS referentnih i tipnih sojeva iz baza podataka *National Centre for Biotechnology Information Basic Local Alignment Tool* (NCBI-BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) te bazom ITS nukleotidnih slijedova pohranjenih u

bazi International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) Barcoding Database
(<https://its.mycologylab.org/>).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Iz uzoraka zraka prikupljenih u poplavljenom stanu (soba 1, 2 i 3) izdvojeno je četrdeset tri izolata plijesni identificiranih kao osamnaest različitih vrsta dok je iz vanjskog zraka izdvojeno deset izolata plijesni i identificirano kao pet različitih vrsta plijesni (slika 1).

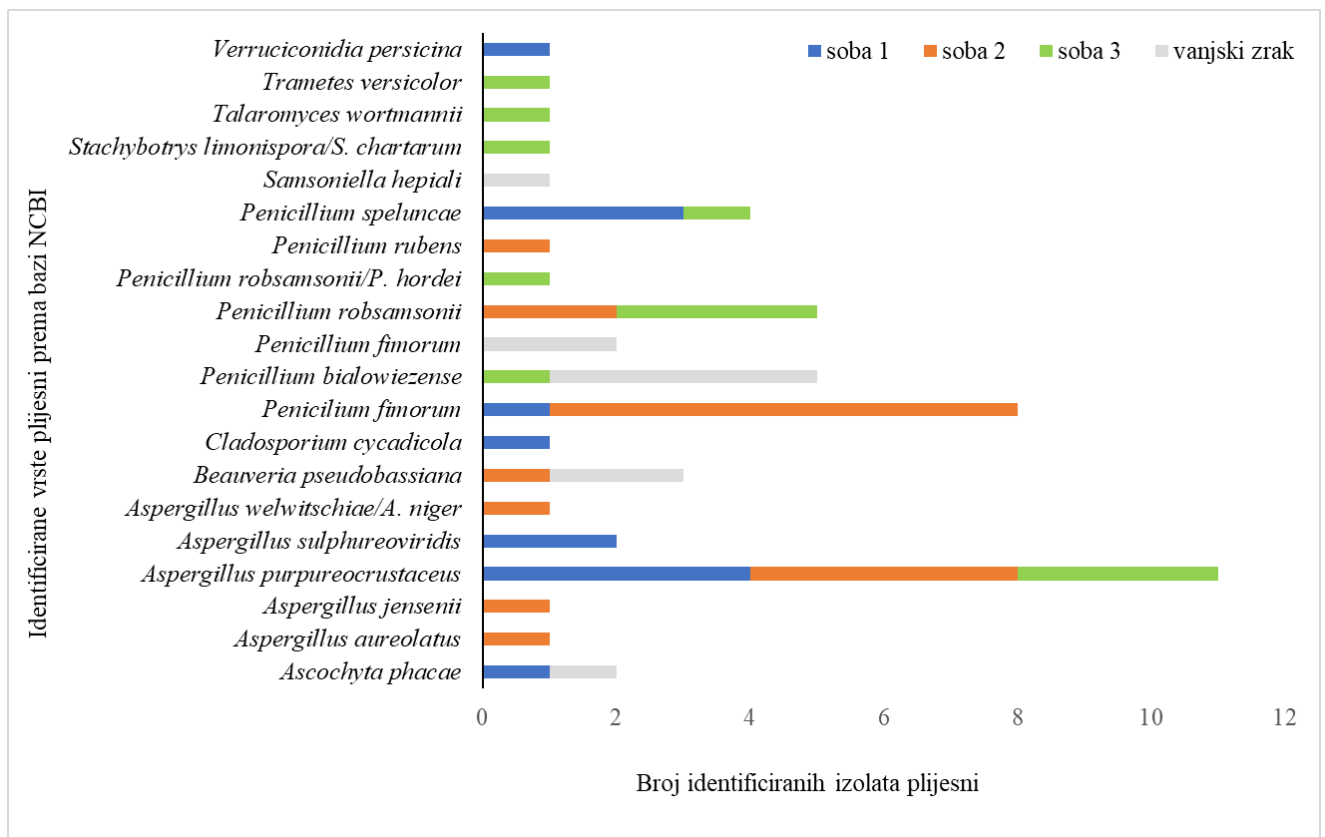
Obzirom na mjesto uzorkovanja (soba 1, 2, 3 ili vanjski zrak) može se uočiti raznolikost u sastavu vrsta (slika 1). Najviše izolata identificirano je kao vrsta *Aspergillus purpureocrustaceus* (11/43) koja je bila prisutna u sve tri prostorije uzorkovanja u poplavljenom stanu, a nije izolirana iz vanjskog zraka (slika 1). Ova novoopisana vrsta spada u sekciju *Nidulantes* i srodna je vrsti *A. tumidus*, a prvi puta je izolirana iz biljnog materijala u Južnoj Africi 2020. godine (Visagie i Houbraken, 2020). Može se pretpostaviti da biljni materijal u stambenom prostoru može biti potencijalni izvor ove plijesni u vlažnom stanu.

U zraku poplavljenoga stana identificirane su i vrste *A. puulaauensis* i *A. jensenii*. Obzirom na očekivano preklapanje u genskoj regiji za ITS sa drugim srodnim vrstama iz serije *Versicolores* uputno je provesti identifikaciju primjenom sekundarnih genskih markera npr. β -tubulin, kalmodulin ili RNA polimerazu II.

Obzirom na visoku razinu morfološke i genetske sličnosti vrsta iz serije *Versicolores* prema najnovijim izmjenama u klasifikaciji nekadašnjih 17 filogenetičkih vrsta iz serije *Versicolores* reducirano je na četiri vrste: *A. versicolor*, *A. creber*, *A. sydowii* i *A. subversicolor* (Sklenář i sur., 2022). Stoga je moguće da izolati identificirani kao vrste *A. puulaauensis* i *A. jensenii* zapravo pripadaju vrsti *A. creber*. Nedavno provedeno opširno istraživanje poplavljenih stambenih prostora u Hrvatskoj pokazala je da su upravo vrste *A. creber* i *A. jensenii* najzastupljenija u takvim prostorima (Jakšić i sur., 2021).

Od ostalih visokozastupljenih vrsta istaknule su se *Penicillium fimorum* (8/43) i *Penicillium robsamsonii* (5/43) (slika 1). *P. fimorum* i *P. robsamsonii* su nedavno karakterizirane vrste u novoj sekciji *Robsamsonia*. Vrste su filogenetički srodne pa bi se radi preciznije identifikaciju trebali koristiti sekundarni molekularni markeri, primjerice za kalmodulin i tubulin, odnosno kemijski biomarkeri u koje spadaju sekundarni metaboliti karakteristični za pojedinu vrstu (Houbraken i sur., 2016). Primjerice, *P. robsamsonii* ispušta ketoglobozine, piripirope, patulodin i kvinolaktaktin, dok *P. fimorum* proizvodi citreozokumarin, palitantin i ksantoepocin (Houbraken i sur., 2016). Od nabrojanih metabolita koje ispuštaju vrste *P. robsamsonii* i *P. fimorum*, samo ketoglobozini imaju neke dokaze o toksičnosti pokazane na životinjskim modelima (Ohtsubo i sur., 1978; Veselý i sur., 1995). Neki od derivata

izokumarina su se također pokazali toksičnima (Bui-Klimke i Wu, 2015; Tavares i sur., 1999), no o citreoizokumarinu još nisu napravljene takve studije. Vrsta *P. speluncae*, izolirana iz zraka u dvije vlažne prostorije (Slika 1), također je nova vrsta, identificirana 2020. godine u špiljama Kanade (Visagie i sur., 2020). Od značajnijih metabolita proizvodi ciklofenine, viridikatine, ketoglobozine, te mikroheterogenu skupinu cikličkih i linearnih tetrapeptida (Visagie i sur., 2020). Literatura je ograničena i o ovom setu sekundarnih metabolita, no postoje dokazi o toksičnosti odnosno hepatotoksičnosti i mutagenosti ciklofenina na životinjskim modelima i *in silico* (Cutler i sur., 1984; Tolosa i sur., 2020).



Slika 1. Zastupljenost različitih vrsta plijesni u unutarnjem zraku poplavljenog stana (soba 1, soba 2 i soba 3) i u vanjskom zraku, prema naznačenim prostorijama uzorkovanja zraka.

U Tablici 2 mogu se uočiti razlike u podacima o identitetu pojedinih vrsta plijesni identificiranim putem ITS barkoda za gljive primjenom baza podataka NCBI i ISHAM. U bazi ISHAM 28 uzoraka nije dalo rezultat (nd), a uočeno je i značajno odstupanje od identiteta utvrđenog upotrebom baze NCBI. Baza NCBI je bolje ažurirana, time i opsežnija i sadrži sve okolišne sojeve plijesni, dok je baza ISHAM ažurirana klinički značajnim vrstama plijesni. Osim što je u bazi ISHAM dobiveno manje rezultata, rezultati koji su dobiveni se u nekim slučajevima drastično razlikuju što govori u prilog slabij pokrivenosti baze ISHAM te

visokoj razini kondenziranosti ITS genske regije čak i kod filogenetički vrlo različitih vrsta (crveno, Tablica 2). Neki izolati su identificirani kao različite, ali filogenetički srodne vrste što je očekivano obzirom na korišteni biomarker ITS (zeleno, Tablica 2). Primjerice, u regiji ITS postoji značajno preklapanje sa vrstama *A. jensenii* i *A. creber* iz serije *Versicolores* sekcije *Nidulantes* (Tablica 2). Utvrđeno je i preklapanje u ITS regiji kod srodnih vrsta *P. bialowiezense* i *P. brevicompactum*. Obje vrste se mogu naći u prašini i materijalu stambenih prostora i dokazane su im povišene koncentracije u vlažnim prostorijama, a može ih se razlikovati upotrebom sekundarnih molekularnih markera za β -tubulin ili histon 4 (James i sur., 2008).

Prema smjernicama za unutrašnju kvalitetu zraka Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, 2009), dugotrajna visoka vlažnost zraka (a_w , > 0.90; ERH, > 90%) kakva se događa u slučaju poplave, pogoduje rastu visoko toksinogene vrste *Stachybotrys chartarum*. Interakcija mukoznih membrana respiratornog i probavnog sustava te kože s toksičnim metabolitima ove plijesni može dovesti do nekrotičnih promjena pa i respiratornih i gastrointestinalnih hemoragija (Dylag i sur., 2022). Identifikacija izolata plijesni pomoću ITS koda upućuje na moguće prisustvo ove plijesni u zraku stambenog prostora o čemu do sada nema podataka u literaturi. Međutim, prema genskom markeru ITS nije moguće razlučiti između molekularno srodnih vrsta *Stachybotrys chartarum* i *Stachybotrys limonispota*, što je moguće razjasniti primjenom sekundarnih genskih markera, npr. za kalmodulin, RNA polimerazu II, translacijski elongacijski faktor 1 i β -tubulin (Lombard i sur., 2016). Plijesan *S. chartarum* je proizvođač raznolikih metabolita uključujući fenilspirodrimane, trihotecene, derivate izoindola, atranone, diterpenoida, ksantona, ciklokinona i ciklosporina (Ibrahim i sur., 2022). Stoga bi nalaz ovih metabolita u ekstraktu kulture plijesni i/ili u ekstraktu strugotine zida iz vlažnog prostora pridonio identifikaciji prisutnosti ove opasne vrste plijesni u stambenom prostoru.

Tablica 2. Usporedba identificiranih izolata prema bazi podataka NCBI sa bazom podataka medicinski značajnih gljivica ISHAM. Zelenom bojom označene su filogenetički srodne vrste, crvenom bojom filogenetički nesrodne vrste ili odsustvo podatka u jednoj od baza, a žutom bojom neujednačenost u identifikaciji obzirom na odsustvo podataka u bazi za neki od izolata iste vrste

Identificirana vrsta (NCBI)	Identificirana vrsta (ISHAM)
<i>Ascochyta phacae</i>	nd
<i>Aspergillus aureolatus</i>	<i>Aspergillus jensenii</i>
<i>Aspergillus jensenii</i>	<i>Aspergillus puulaauensis</i>
<i>Aspergillus purpureocrustaceus</i>	<i>Aspergillus creber/ Aspergillus jensenii/ nd</i>
<i>Aspergillus sulphureoviridis</i>	nd
<i>Aspergillus welwitschiae/A. niger</i>	<i>Aspergillus tuingensis</i>
<i>Beauveria pseudobassiana</i>	nd
<i>Cladosporium cycadicola</i>	<i>Cladosporium sphaerospermum/ C. cladosporioides</i>
<i>Penicillium fimorum</i>	<i>Penicillium chrysogenum/nd</i>
<i>Penicillium bialowiezense</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>
<i>Penicillium fimorum</i>	<i>Penicillium rubens/nd</i>
<i>Penicillium robsamsonii</i>	<i>Penicillium expansum/nd</i>
<i>Penicillium robsamsonii/P. hordei</i>	nd
<i>Penicillium rubens</i>	nd
<i>Penicillium speluncae</i>	<i>Aspergillus clavatus/nd</i>
<i>Samsoniella hepiali</i>	<i>Beauveria bassiana</i>
<i>Stachybotrys limonisporea/S. chartarum</i>	nd
<i>Talaromyces wortmannii</i>	<i>Talaromyces rugulosus</i>
<i>Trametes versicolor</i>	<i>Trichosporon montevideense</i>
<i>Verruciconidia persicina</i>	<i>Acremonium persicinum</i>

Plijesni roda *Aspergillus* i *Penicillium* koje su bile visokozastupljene u uzorcima zraka iz poplavljenoga stana mogu se povezati sa alergijama. Senzitivizacija na plijesni i na njihove strukturalne dijelove te neke metabolite, može dovesti do alergijskih reakcija (Denning i sur., 2006; Edmondson i sur., 2005; Shen i sur., 1998). Od metabolita, kao najjači alergeni su se pokazale serinske proteaze koje utječu na respiratorni epitel tako da ga uništavaju i/ili aktiviraju te olakšavaju prijenos alergena kroz epitelnu barijeru (Moss, 2023; Soh i sur., 2023; Shen i sur., 2007). Aspergili i penicilije mogu se povezati sa ekstrinzičnom bronhijalnom astmom i alergijskim fungalnim sinusitisom (Borchers i sur., 2011; Agarwal i Gupta, 2017).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih podataka i obrađenih rezultata može se zaključiti:

- Dominantna vrsta u stanu pogođenom vlagom bila je *Aspergillus purpureocrustaceus* nađena u sve tri unutrašnje prostorije u kojima je uzorkovanje provedeno, a nije nađena u vanjskom zraku.
- U unutrašnjem zraku visokozastupljeni *Penicillium fimorum*, *P. robsamsonii*, nađeni i u vanjskom zraku, te *P. speluncae*, izoliran samo iz unutrašnjih prostorija, sve su redom nedavno karakterizirane vrste.
- U kontrolnim uzorcima prikupljenim izvan zgrade najviše je puta izolirana vrsta *P. bialowiezense*, a zatim *P. fimorum* i *Beauveria pseudobassiana*.
- Srodne vrste *Stachybotrys limonispora* i *S. chartarum* nije moguće razlučiti identifikacijom prema molekularnom markeru ITS, a pronalazak ovih vrsta u jednoj sobi vlažnog stana osobito zabrinjava zbog dosadašnjih spoznaja o toksičnosti sekundarnih metabolita koje ispuštaju.
- Uzroci nepoklapanja podataka o identitetu pojedinih vrsta plijesni dobivenih iz baza podataka NCBI i ISHAM su različito ažuriranje ovih baza te visoki stupanj preklapanja u genskoj regiji za ITS.
- Kako bi se osigurala točnija identifikacija među srodnim vrstama, potrebno je korištenje sekundarnih molekularnih markera, npr. dijelova genskih regija za kalmodulin i β -tubulin, uz identifikaciju kemijskih markera
- Penicilije i aspergili, dominantni rodovi u rezultatima ovog rada, povezani su sa senzitivacijom u ljudi i mogu dovesti do alergijskih reakcija i bronhijalne astme.
- Plijesni koje su izolirane iz unutarnjih prostorija stana pogođenog vlagom mogući su proizvođači potencijalno štetnih sekundarnih metabolita koji mogu negativno utjecati na zdravstveno stanje ljudi koji žive u prostorima u kojim je koncentracija tih plijesni povišena te je potrebno provesti dodatne studije kako bi se dobio bolji uvid u stvarni rizik koji predstavlja mikrobiota vlažnih prostorija na ljudsko zdravlje.

6. LITERATURA

- Agarwal R, Gupta D. Severe asthma and fungi: current evidence. *Med Mycol*, 49, 2011, 150–157.
- Andersen B, Frisvad JC, Søndergaard I, Rasmussen IS, Larsen LS. Associations between fungal species and water-damaged building materials. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 4180-4188.
- Bloom E, Bal K, Nyman E, Must A, Larsson L. Mass spectrometry-based strategy for direct detection and quantification of some mycotoxins produced by *Stachybotrys* and *Aspergillus* spp. in indoor environments. *Appl Environ Microbiol*, 73, 2007, 4211–4217.
- Borchers AT, Chang C, Eric Gershwin M. Mold and Human Health: a Reality Check. *Clin Rev Allergy Immunol*, 52, 2017, 305-322.
- Bui-Klimke TR, Wu F. Ochratoxin A and human health risk: a review of the evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 55, 2015, 1860-9.
- Croft WA, Jarvis BB, Yatawara CS. Airborne outbreak of trichothecene mycotoxicosis. *Atmos Environ*, 20, 1986, 549–552.
- Cutler HG, Crumley FG, Cox RH, Wells JM, Cole RJ. The biological properties of cyclopenin and cyclophenol. *Plant Cell Physiol*, 25, 1984, 257–263.
- Denning DW, O'Driscoll BR, Hogaboam CM, Bowyer P, Niven RM. The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence. *Eur Respir J*, 27, 2006, 615-26.
- Došen I, Andersen B, Phippen CB, Clausen G, Nielsen KF. *Stachybotrys* mycotoxins: from culture extracts to dust samples. *Anal Bioanal Chem*, 408, 2016, 5513-26.
- Dyląg M, Spychała K, Zielinski J, Łagowski D, Gnat S. Update on *Stachybotrys chartarum*- Black Mold Perceived as Toxicogenic and Potentially Pathogenic to Humans. *Biology*, 11, 2022, 352.
- Edmondson DA, Nordness ME, Zacharisen MC, Kurup VP, Fink JN. Allergy and "toxic mold syndrome". *Ann Allergy Asthma Immunol*, 94, 2005, 234-9.
- Eduard W. Fungal spores. The Nordic Expert Group for Criteria Documentation of Health Risk from Chemicals. Stockholm, Arbete och Hälsa, 2006, str. 21-27.
- Frisvad J. Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* Species. *Front Microbiol*, 5, 2015, 773.
- Ghorbel D, Hadrich I, Neji S, Trabelsi H, Belaaj H, Sellami H, Cheikhrouhou F, Makni F,

- Ayadi A. Detection of virulence factors and antifungal susceptibility of human and avian *Aspergillus flavus* isolates. *J Mycol Med*, 29, 2019, 292–302
- Hintikka EL, Nikulin M. Airborne mycotoxins in agricultural and indoor environments. *Indoor Air*, 8, 1998, 66–70.
- Houbraken J, Wang L, Lee HB, Frisvad JC. New sections in *Penicillium* containing novel species producing patulin, pyripyropens or other bioactive compounds. *Persoonia*, 36, 2016, 299-314.
- Ibrahim SRM, Choudhry H, Asseri AH, Elfaky MA, Mohamed SGA, Mohamed GA. *Stachybotrys chartarum* – a hidden treasure: secondary metabolites, bioactivities, and biotechnological relevance. *J Fungi*, 8, 2022, 504.
- Institute of Medicine. Risk factors for moisture problems. U: Damp indoor spaces and health. Washington, DC, National Academies Press, 2004 str. 27-29.
- International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) Barcoding Database (<https://its.mycologylab.org/>), pristupljeno 25.8.2023.
- Jakšić Despot D., Šegvić Klarić M. A year-round investigation of indoor airborne fungi in Croatia. *Arh Hig Rada Toksikol*, 65, 2014, 209–218.
- Jakšić D, Sertić M, Kifer D, Kocsubè S, Mornar Turk A, Nigović B, Šarkanj B, Krska R, Sulyok M, Šegvić Klarić M. Fungi and their secondary metabolites in water-damaged indoors after a major flood event in eastern Croatia. *Indoor Air*, 31, 2021, 730–744.
- Jakšić D, Jelić D, Kopjar N, Šegvić Klarić M. Combined toxicity of the most common indoor *Aspergilli*. *Pathogens*, 12, 2023, 459.
- Johanning E, Biagini R, Hull D, Morey P, Jarvis B, Landsbergis P. Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment. *Int Arch Occup Environ Health*, 68, 1996, 207–218.
- Lee R, Workman A, Carey R, Chen B, Rosen PL, Doghramji L, Adappa ND, James N, Palmer J, Kennedy DW, Cohen NA. Fungal aflatoxins reduce respiratory mucosal ciliary function. *Sci Rep*, 6, 2016, 33221
- Lombard L, Houbraken J, Decock C, Samson RA, Meijer M, Réblová M, Groenewald JZ, Crous PW. Generic hyper-diversity in *Stachybotriaceae*. *Persoonia*, 36, 2016, 156-246.
- Masclaux, F.; Guého, E.; de Hoog, G.S.; Christen, R. Phylogenetic relationships of human-pathogenic *Cladosporium* (*Xylohypha*) species inferred from partial LS rRNA Sequences. *J Med Vet Mycol*, 33, 1995, 327–338.
- Moss RB. Severe Fungal Asthma: A Role for Biologics and Inhaled Antifungals, *J Fungi*, 9, 2023, 85.

- Mota IA, Borrego LM. Allergic Response to Fungal Exposure. U: Environmental Mycology in Public Health. Viegas C, Pinheiro A, Sabino R, Viegas S, Brandão J, Veríssimo C, urednici, Academic Press, 2016, str. 35-43.
- National Centre for Biotechnology Information Basic Local Alignment Tool (NCBI-BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), pristupljeno 25.8.2023.
- Nielsen KF. Mould growth on building materials: secondary metabolites, mycotoxins and biomarkers. Doktorski rad, Technical University of Denmark. 2002.
- Ohtsubo K, Saito M, Sekita S, Yoshihira K, Natori S. Acute toxic effects of chaetoglobosin A, a new cytochalasan compound produced by *Chaetomium globosum*, on mice and rats. *Jpn J Exp Med*, 48, 1978, 105-110.
- Perrone G, Susca A. *Penicillium* species and their associated mycotoxins. *Methods Mol Biol*, 1542, 2017, 107-119.
- Pieckova E. Domestic environment. Indoor mycobiota as a public health risk factor. U: Environmental mycology and public health. Fungi and mycotoxins risk assessment and management. Viegas C, Pinheiro AC, Sabino R, Viegas S, Brandao J, Verissimo C, urednici, Oxford, Elsevier, 2016, str. 129-144.
- Ráduly Z, Szabó L, Madar A, Pócsi I, Csernoch L. Toxicological and medical aspects of *Aspergillus*-derived mycotoxins entering the feed and food chain. *Front Microbiol*, 10, 2020, 2908.
- Samson R.A. Ecology and general characteristics of indoor fungi. U: fundamentals of mold growth in indoor environments and strategies for healthy living. Adan CGO, Samson RA, urednici, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 2011, str. 101–116.
- Shen HD, Han SH. Characterization of allergens of *Penicillium* and *Aspergillus* species. *J Microbiol Immunol Infect*, 31, 1998, 141-5.
- Shen HD, Tam MF, Tang RB, Chou H. *Aspergillus* and *Penicillium* allergens: focus on proteases. *Curr Allergy Asthma Rep*, 7, 2007, 351-6.
- Sklenář F, Glässnerová K, Jurjević Ž, Houbraken J, Samson RA, Visagie CM, Yilmaz N, Gené J, Cano J, Chen AJ, Nováková A, Yaguchi T, Kolařík M, Hubka V. Taxonomy of *Aspergillus* series *Versicolores*: species reduction and lessons learned about intraspecific variability. *Stud Mycol*, 102, 2022, 53-93.
- Soh WT, Zhang J, Hollenberg MD, Vliagoftis H, Rothenberg ME, Sokol CL, Robinson C, Jacquet A. Protease allergens as initiators-regulators of allergic inflammation. *Allergy*, 78, 2023, 1148-1168.

- Tavares DC, Varanda EA, Andrade FD, Vilegas W, Takahashi CS. Evaluation of the genotoxic potential of the isocoumarin paepalantine in in vivo and in vitro mammalian systems. *J Ethnopharmacol*, 68, 1999, 115-20.
- Tolosa J, Barba FJ, Pallarés N, Ferrer E. mycotoxin identification and in silico toxicity assessment prediction in atlantic salmon. *Mar Drugs*, 18, 2020, 629.
- Verhoeff AP, van Reenen-Hoekstra ES, Samson RA, Brunekreef B, van Wijnen JH. Fungal propagules in house dust. I. Comparison of analytic methods and their value as estimators of potential exposure. *Allergy*, 49, 1994, 533–539.
- Veselý D, Veselá D, Jelínek R. *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx produces chaetoglobosin A toxic to embryonic chickens. *Mycopathologia*, 132, 1995, 31–33
- Viegas C, Brandão J. Dispersion forms. U: *Environmental Mycology in Public Health*. Viegas C, Pinheiro A, Sabino R, Viegas S, Brandão J, Veríssimo C, urednici, Academic Press, 2016, str. 17-23.
- Visagie CM, Houbraeken J. Updating the taxonomy of *Aspergillus* in South Africa. *Stud Mycol*, 95, 2020, 253-292.
- Visagie CM, Yilmaz N, Vanderwolf K, Renaud JB, Sumarah MW, Houbraeken J, Assebgui R, Seifert KA, Malloch D. *Penicillium* diversity in Canadian bat caves, including a new species, *P. speluncae*. *Fungal Syst Evol*, 5, 2020, 1-15.
- World Health Organization, Regional Office for Europe. WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould. World Health Organization. Regional Office for Europe, 2009, str. 28-36.

7. SAŽETAK

Stambeni prostori pogođeni vlagom pružaju idealne uvjete plijesnima za razmnožavanje. Povišena koncentracija određenih vrsta plijesni može uzrokovati ponajprije respiratorne simptome i bolesti u ljudi koji u tim prostorima provode duže vrijeme. Izolati plijesni iz zraka prikupljenih u stana pogođenog vlagom te iz vanjskog zraka (kontrolni uzorci) identificirani su do razine vrste na temelju molekularnog markera ITS za gljive te usporedbom nukleotidnih slijedova pojedinog izolata s podacima u javno dostupnim bazama podataka (NCBI, ISHAM). Veću bioraznolikost pokazali su izolati iz unutarnjeg prostora gdje su identificirane vrste: *Aspergillus aureolatus* (N=1), *A. jensenii* (N=1), *A. purpureocrustaceus* (N=11), *A. sulphureoviridis* (N=2), *A. welwitschiae/A. niger* (N=1), *Cladosporium cycadicola* (N=2), *Penicillium robsamsonii* (N=5), *P. robsamsonii/P.hordei* (N=1), *P. rubens* (N=1), *P. speluncae* (N=4), *Stachybotrys limonisporea/S. chartarum* (N=1), *Talaromyces wortmanii* (N=1), *Trametes versicolor* (N=1) i *Verruciconidia persicana* (N=1). Vrste nađene samo u vanjskom zraku bile su *Beauveria pseudobassiana* (N=2) i *Samsoniella hepiali* (N=1), dok su vrste *Ascochyta phacae* (N=2), *P. bialowiezense* (N=5) i *P. fimorum* (N=10) identificirane u uzorcima unutarnjeg i vanjskog zraka. Dobiveni rezultati upućuju na razlike u identifikaciji obzirom na korištenu bazu podataka NCBI ili ISHAM te potrebu za ažuriranjem baze ISHAM nukleotidnim slijedovima novoopisanih vrsta roda *Penicillium* i *Aspergillus*. Upotreba sekundarnih molekularnih i/ili kemijskih markera omogućava preciznu identifikaciju plijesni do razine vrste zbog preklapanja u nukleotidnim slijedovima u regiji ITS među srodnim vrstama plijesni.

KLJUČNE RIJEČI: baza ISHAM, baza NCBI, vlaga, plijesni, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Stachybotrys*

8. SUMMARY

Residential spaces affected by moisture provide ideal conditions for mold proliferation. Elevated concentrations of certain mold species can primarily cause respiratory symptoms and illnesses in individuals who spend extended periods of time in these areas. Mold isolates were recovered from indoor air sampled in moisture-affected homes and from outdoor air (control samples). Identification to the species level was conducted based on the ITS molecular marker for fungi by comparing nucleotide sequences of individual isolates with data in publicly available databases (NCBI, ISHAM). Greater biodiversity was observed among the indoor air isolates, and the following species were identified: *Aspergillus aureolatus* (N=1), *A. jensenii* (N=1), *A. purpureocrustaceus* (N=11), *A. sulphureoviridis* (N=2), *A. welwitschiae/A. niger* (N=1), *Cladosporium cycadicola* (N=2), *Penicillium robsamsonii* (N=5), *P. robsamsonii/P.hordei* (N=1), *P. rubens* (N=1), *P. speluncae* (N=4), *Stachybotrys limonispora/S. chartarum* (N=1), *Talaromyces wortmanii* (N=1), *Trametes versicolor* (N=1), and *Verruciconidia persicana* (N=1). The outdoor air isolates were identified to *Beauveria pseudobassiana* (N=2) and *Samsoniella hepiali* (N=1), while the species *Ascochyta phacae* (N=2), *P. bialowiezense* (N=5), and *P. fimorum* (N=10) were identified in both indoor and outdoor air samples. The results obtained indicate differences in identification depending on the NCBI or ISHAM database used and suggest updating the ISHAM database with nucleotide sequences of newly described species of the genus *Penicillium* and *Aspergillus*. The use of secondary molecular and/or chemical markers allows for precise mold identification at the species level due to overlap in nucleotide sequences in the ITS region among closely related mold species.

KEY WORDS: NCBI database, ISHAM database, dampness, mould, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Stachybotrys*

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Mikrobiologiju
Schrottova 39, 10 000
Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

BIORAZNOLIKOST PLIJESNI U VLAŽNOM STAMBENOM PROSTORU

Lada Sviben

SAŽETAK

Stambeni prostori pogođeni vlagom pružaju idealne uvjete plijesnima za razmnožavanje. Povišena koncentracija određenih vrsta plijesni može uzrokovati ponajprije respiratorne simptome i bolesti u ljudi koji u tim prostorima provode duže vrijeme. Izolati plijesni iz zraka prikupljenih u stana pogođenog vlagom te iz vanjskog zraka (kontrolni uzorci) identificirani su do razine vrste na temelju molekularnog markera ITS za gljive te usporedbom nukleotidnih slijedova pojedinog izolata s podacima u javno dostupnim bazama podataka (NCBI, ISHAM). Veću bioraznolikost pokazali su izolati iz unutarnjeg prostora gdje su identificirane vrste: *Aspergillus aureolatus* (N=1), *A. jensenii* (N=1), *A. purpureocrustaceus* (N=11), *A. sulphureoviridis* (N=2), *A. welwitschiae/A. niger* (N=1), *Cladosporium cycadicola* (N=2), *Penicillium robsamsonii* (N=5), *P. robsamsonii/P.hordei* (N=1), *P. rubens* (N=1), *P. speluncae* (N=4), *Stachybotrys limonisporea/S. chartarum* (N=1), *Talaromyces wortmanii* (N=1), *Trametes versicolor* (N=1) i *Verruciconidia persicana* (N=1). Vrste nađene samo u vanjskom zraku bile su *Beauveria pseudobassiana* (N=2) i *Samsoniella hepiali* (N=1), dok su vrste *Ascochyta phacae* (N=2), *P. bialowiezense* (N=5) i *P. fimorum* (N=10) identificirane u uzorcima unutarnjeg i vanjskog zraka. Dobiveni rezultati upućuju na razlike u identifikaciji obzirom na korištenu bazu podataka NCBI ili ISHAM te potrebu za ažuriranjem baze ISHAM nukleotidnim slijedovima novoopisanih vrsta roda *Penicillium* i *Aspergillus*. Upotreba sekundarnih molekularnih i/ili kemijskih markera omogućava preciznu identifikaciju plijesni do razine vrste zbog preklapanja u nukleotidnim slijedovima u regiji ITS među srodnim vrstama plijesni.

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

Rad sadrži: 18 stranica, 1 grafičkih prikaza, 2 tablica i 47 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: baza ISHAM, baza NCBI, vlaga, plijesni, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Stachybotrys*

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

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

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

Dr. sc. Manuela Zadravec, Hrvatski Veterinarski Institut

Rad prihvaćen: rujan 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Microbiology
Schrottova 39, 10 000
Zagreb, Croatia

Diploma thesis

BIODIVERSITY OF MOLD IN A DAMP DWELLING

Lada Sviben

SUMMARY

Residential spaces affected by moisture provide ideal conditions for mold proliferation. Elevated concentrations of certain mold species can primarily cause respiratory symptoms and illnesses in individuals who spend extended periods of time in these areas. Mold isolates were recovered from indoor air sampled in moisture-affected homes and from outdoor air (control samples). Identification to the species level was conducted based on the ITS molecular marker for fungi by comparing nucleotide sequences of individual isolates with data in publicly available databases (NCBI, ISHAM). Greater biodiversity was observed among the indoor air isolates, and the following species were identified: *Aspergillus aureolatus* (N=1), *A. jensenii* (N=1), *A. purpureocrustaceus* (N=11), *A. sulphureoviridis* (N=2), *A. welwitschiae/A. niger* (N=1), *Cladosporium cycadicola* (N=2), *Penicillium robsamsonii* (N=5), *P. robsamsonii/P.hordei* (N=1), *P. rubens* (N=1), *P. speluncae* (N=4), *Stachybotrys limonispora/S. chartarum* (N=1), *Talaromyces wortmanii* (N=1), *Trametes versicolor* (N=1), and *Verruciconidia persicana* (N=1). The outdoor air isolates were identified to *Beauveria pseudobassiana* (N=2) and *Samsoniella hepiali* (N=1), while the species *Ascochyta phacae* (N=2), *P. bialowiezense* (N=5), and *P. fimorum* (N=10) were identified in both indoor and outdoor air samples. The results obtained indicate differences in identification depending on the NCBI or ISHAM database used and suggest updating the ISHAM database with nucleotide sequences of newly described species of the genus *Penicillium* and *Aspergillus*. The use of secondary molecular and/or chemical markers allows for precise mold identification at the species level due to overlap in nucleotide sequences in the ITS region among closely related mold species.

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

Thesis includes: 18 pages, 1 figures, 2 tables and 47 references. Original is in Croatian language.

Keywords: NCBI database, ISHAM database, dampness, mould, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Stachybotrys*

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

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

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

Manuela Zadravec, Ph.D. Croatian Veterinary Institute

The thesis was accepted: September 2023.