

Lara Špiljak

**Molekularna identifikacija plijesni rodova
Aspergillus, *Penicillium* i *Talaromyces* u vlažnom
stambenom prostoru primjenom sekundarnog
markera za gen kalmodulin**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

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 i susretljivosti tijekom izrade ovog rada. Posebno hvala obitelji i prijateljima na podršci, strpljenju i razumijevanju.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OBRAZLOŽENJE TEME	4
3. MATERIJALI I METODE	5
3.1. Materijali	5
3.2. Metode.....	6
3.2.1. Presađivanje uzoraka.....	6
3.2.2. Izolacija DNA, PCR i molekularna identifikacija.....	7
4. REZULTATI I RASPRAVA	9
5. ZAKLJUČCI	15
6. LITERATURA.....	16
7. SAŽETAK.....	22
8. SUMMARY	23

1. UVOD

Plijesni su sveprisutni biološki zagađivači u bioaerosolima te ih nalazimo svugdje kako u vanjskom, tako i u unutarnjem okolišu. Mogu biti transportirane u zgrade na površinama materijala ili odjeći, a mogu i prodrijeti u unutrašnjost aktivnom ili pasivnom ventilacijom zbog čega su uobičajena komponenta prašine u kućanstvu i na radnom mjestu, no kada su im uvjeti izrazito pogodni za rast i razmnožavanje zbog velike količine spora i fragmenata micelija u zraku mogu predstavljati i zdravstveni rizik za ljude koji borave u tom okolišu (WHO, 2009).

Procijenjeno je da 10-50% unutarnjih okoliša u Australiji, Europi, Indiji, Japanu i Sjevernoj Americi ima problema s vlagom (WHO, 2009) što osigurava povoljne uvjete za bujanje plijesni te je povezano s mnoštvom zdravstvenih problema. Jedan od njih je „sindrom bolesne zgrade“ što je termin korišten za opisivanje situacije u kojoj stanari doživljavaju akutne posljedice na zdravlje i komfor koje se čine direktno povezane s vremenom provedenim u zgradi bez identificirane specifične bolesti (Joshi, 2008), no boravak u takvim zgradama je povezan i s mnoštvom specifičnijih posljedica poput razvoja i egzacerbacije astme, dispneje, kašlja, respiratornih infekcija, bronhitisa, alergijskog rinitisa, atopijskog dermatitisa pa i sa smetnjama u spavanju (Mendell i sur., 2011; Norbäck i sur., 2016; Wang i sur., 2020). Spomenute zdravstvene posljedice povlače i ekonomske te je procijenjeno da se ukupna potrošnja društva na bolesti koje proizlaze iz izlaganja vlazi i plijesnima mjeri u milijardama dolara godišnje samo u SAD-u (Mudarri, 2016).

Miris plijesni je uzrokovan hlapljivim organskim spojevima (VOC) koje proizvode plijesni te mogu ispoljiti razne učinke na zdravlje od kojih je najevidentniji iritacija dišnih puteva, a prisutstvo nekih od njih je asocirana i sa smanjenom funkcijom pluća te astmom (Wang i sur., 2023). Plijesni proizvode i velike količine spora koje mogu ostati u zraku tijekom duljih vremenskih razdoblja, a aerosoliziraju i fragmenti micelija koji, osim što mogu poslužiti kao izvori alergena i mikotoksina, mogu biti i manjeg promjera od spora te prodrijeti dublje u dišne puteve ljudi (Brasel i sur., 2005; Górný i sur., 2002; Green i sur., 2006).

Mnoge vrste plijesni proizvode alergene tipa I, a senzitivizacija imunoglobulinom E na najuobičajenije vanjske i unutarnje gljivične vrste rodova *Penicillium* i *Aspergillus* je snažno povezana s alergijskim bolestima dišnog sustava, posebice s astmom (Moses i sur., 2019). Vrste rodova *Penicillium* i *Aspergillus* koje mogu biti nađene u većini kućanstava te posebice u onima pogođenim poplavama (Omebeyinje i sur., 2021) također su poznati proizvođači alergena tipa III koji induciraju proizvodnju imunoglobulina G, a mogu i kolonizirati pluća gdje stvaraju puno perzistentniji alergijski stimulans te u slučaju znatne kolonizacije i infektivnu komponentu (posebice bitnu kod imunokomprimiranih osoba) što može dovesti do progresivnog oštećenja

pluća zbog kronične opstrukcije dišnih puteva viskoznom mukusom (Rick i sur., 2016; WHO, 2009).

Plijesni iz roda *Aspergillus* važan su rod filamentoznih gljiva iz porodice Aspergillaceae, reda Eurotiales s gotovo 450 prihvaćenih vrsta te velikim brojem novoopisanih vrsta na godišnjoj bazi od početka molekularne filogenetike (Houbraken i sur., 2020). Aspergili serije *Versicolores* uključuju nekoliko vrsta koje nalazimo u zraku te kojima smo izloženi svakodnevno. Sposobnost tolerancije aktiviteta vode u intervalu 0.75-0.90 te širokog raspona pH kao i ionske jakosti čine aspergile posebice učestalim unutarnjim gljivicama (Samson, 2011). Većina ih sintetizira sterigmatocistin, ciklopiazonsku kiselinu, 5-metoksisterigmatocistin, dihidroksisterigmatocistin, nidulotoksin, averufin, versikonol i versikolorine A, B i C (Piontek i sur., 2016).

Penicillium je vrlo raznolik i sveprisutan rod plijesni koji, kao i *Aspergillus*, pripada porodici Aspergillaceae unutar reda Eurotiales. Vrste roda *Penicillium* imaju bitne uloge kao razlagači organskih materijala te uzrokuju destruktivne truleži u industriji hrane gdje proizvode širok raspon mikotoksina, najbitniji od kojih su ohratoksin A, patulin, citreoviridin, citrinin, ciklopiazonska kiselina, penicilinska kiselina i rokfortin C (Perrone i Susca, 2017). Općenito su striktno aerobne te nutritivno nezahtjevne gljivice koje brzo rastu te proizvode veliki broj egzogenih suhih spora koje se lako rasprostranjuju zrakom (Perrone i Susca, 2017). Plijesni roda *Penicillium* su češće u unutrašnjem zraku nego vanjskom (Hyvärinen i sur., 1993), a povezanost povišene relativne vlažnosti zraka s njihovim višim koncentracijama te lako otpuštanje spora ih čini posebno učestalim zagađivačima u zgradama oštećenim vlagom.

Talaromyces je rod gljivica koji pripada porodici Trichocomaceae, također reda Eurotiales. Prije 2011. je sadržavao isključivo teleomorfe vrsta roda *Penicillium*, no uslijed filogenetske analize su Samson i sur. (2011) većinu anamorfnih vrsta roda *Penicillium* podroda *Biverticillium* uklopili u rod *Talaromyces*. Iako slične rodovima *Aspergillus* i *Penicillium*, karakteristične žute i crvene boje kolonija i micelija roda *Talaromyces* su često uzrokovane akumulacijom mitorubrina i drugih azafilona i jedinstvenih antrakina i mitorubina koji u rodovima *Aspergillus* i *Penicillium* nisu nađeni (Samson i sur., 2011). *Talaromyces* vrste su uobičajeno rasprostranjene u širokom rasponu supstrata, a najčešća u prirodi je *Talaromyces flavus* koja se povremeno izolira sa proizvoda poput žitarica (Batt i Tortorello, 2014). Za nekolicinu je poznato da uzrokuju potencijalno fatalne infekcije (Sun i sur., 2020). Najznačajnija od njih je *Talaromyces marneffei*, termalno dimorfna vrsta koja uzrokuje infekcije kod imunokomprimiranih ljudi, posebice oboljelih od AIDS-a (Limper i sur., 2017).

Primarno je plućni patogen koji se širi u ostale unutarnje organe limfnim ili krvnim žilama, (Narayanasamy i sur., 2021).

S obzirom na raširenost spomenutih plijesni, njihovu raznolikost te poveznicu između izlaganja njima i raznoraznih zdravstvenih problema postoji velika potreba za njihovom brзом i pouzdanom identifikacijom. Klasične metode identifikacije bazirane na morfologiji mogu zbog fenotipske plastičnosti te genetske varijabilnosti dovesti do krivih interpretacija zbog čega su danas uvelike zamijenjene molekularnom identifikacijom.

DNA barkodiranje je molekularna tehnologija koja omogućava brzu i pouzdanu identifikaciju baziranu na amplifikaciji kratkih DNA fragmenata. Iako je unutarnja transkribirana razmaknica (*ITS* regija) prihvaćena kao primarni barkod za gljivice (Schoch i sur., 2012), *ITS* podaci u *International Nucleotide Sequence Database* (INSD) koja uključuje GenBank, EMBL i DDBJ su pokazali da *ITS* regija nije jednako varijabilna u svim skupinama gljivica te kod rodova poput *Aspergillus* i *Penicillium* ne pruža dovoljnu preciznost u identifikaciji (Tekpinar i Kalmer, 2019; Visagie i sur., 2014b). Zato se *ITS* zna koristiti u kombinaciji s jednim ili više protein-kodirajućih gena poput gena za kalmodulin.

Kalmodulin (*CaM*) je visoko očuvan kiseli monomerni polipeptid prisutan u eukariotskim stanicama koji pripada velikoj obitelji kalcij-vezujućih proteina (Kretsinger, 1980). Njegova primarna uloga je da djeluje kao unutarstanični receptor za dvovalentne kalcijeve katione (Ca^{2+}) koji signalizira proliferaciju, pokretljivost i progresiju kroz stanični ciklus. Prethodno je već ukazana njegova vrijednost u molekularnom istraživanju taksonomskih skupina roda *Aspergillus*, *Penicillium* i *Talaromyces* (Houbraken i sur, 2020; Samson i sur., 2014; Wang i Zhuang, 2007).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U ovom radu identificirat će se do razine vrste izolati plijesni rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Talaromyces* (N = 35) koji su tijekom 2022. godine prikupljeni u stanu s vidljivim porastom plijesni na vlažnim zidovima te u vanjskom zraku u neposrednoj blizini stana u svrhu kontrole. Identifikacija će se provesti pomoću sekundarnog molekularnog markera dijela gena za kalmodulin (*CaM*) te usporedbom dobivenih nukleotidnih slijedova s podacima u bazi podataka *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) primjenom algoritma *Basic Local Alignment Tool* (BLAST) dostupnog na mrežnim stranicama <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Specifični cilj ovog rada je pokazati prednosti korištenja sekundarnog markera *CaM* u identifikaciji vrsta rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Talaromyces* u odnosu na identifikaciju primjenom identifikacijskog markera ITS. Pojavnost identificiranih plijesni te javnozdravstveni značaj identificiranih vrsta usporedit će se s podacima dostupnim u literaturi.

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

- NucleoSpin 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: CMD5 (5'-CCGAGTACAAGGARGCCTTC-3') 10 μ M, CMD6 (5'-CCGATRGAGGTCATRACGTGG-3') 10 μ M
- 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)
- Gel i WB dokumentacijski sustavi s UV fluorescencijom (UVITEC Cambridge Essential V6, UVITEC Ltd., Cambridge, Engleska, UK)

3.2. Metode

3.2.1. Presađivanje uzoraka

Uzorci zraka prikupljeni su u stambenom prostoru zahvaćenom vlagom 2022. godine 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. Izdvojeni su izolati (N=35) plijesni rodova *Aspergillus* (13/35), *Penicillium* (21/35) i *Talaromyces* (1/35).

3.2.2. Izolacija DNA, PCR i molekularna identifikacija

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 ultračistoj vodi, regije *CaM* umnoženi su lančanom reakcijom polimeraze (PCR) uz početnice CMD5 (5'-CCGAGTACAAGGARGCCTTC-3') i CMD6 (5'-CCGATRGAGGTCATRACGTGG-3') (Hong i sur., 2006) 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 razrijeđeno je s 3 μ L sterilne ultračiste vode te pomiješano sa fluorescentnom bojom GelStar (1:1500). Takva smjesa pipetirana je u jažice na gelu nakon čega se provela 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 optimizirala ponavljanjem postupka 3.2.3. uz optimizaciju uvjeta PCR reakcije, npr. promjenom temperature vezanja početnica.

Tablica 1. Uvjeti PCR reakcije

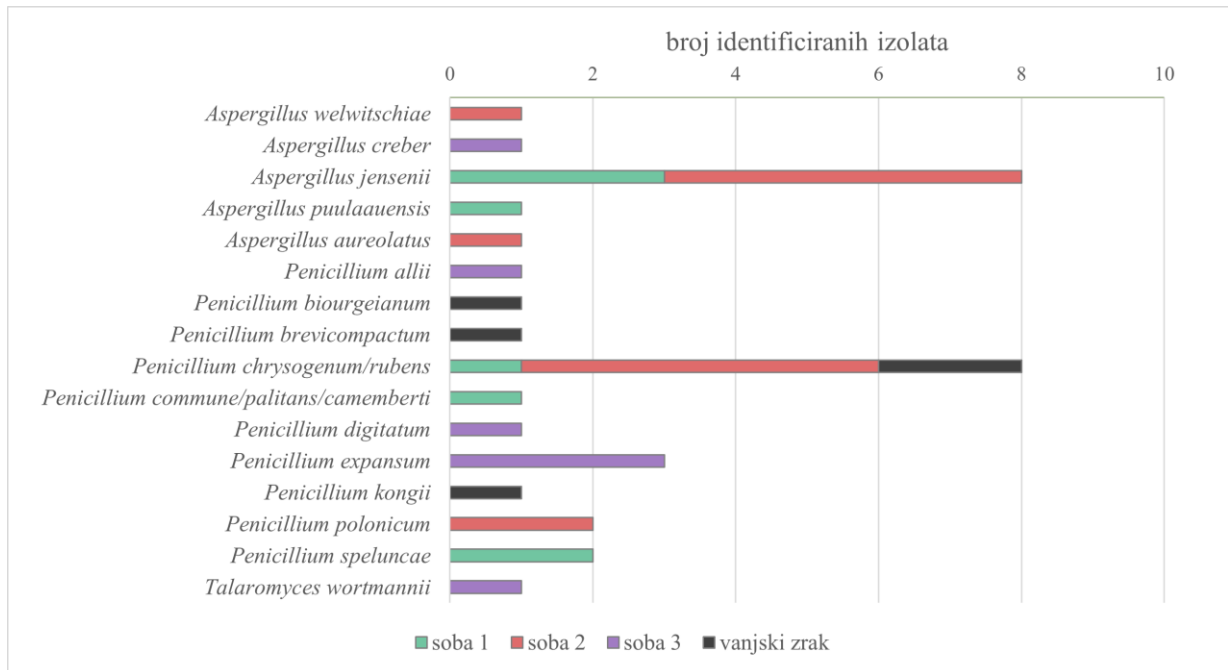
Reakcijski koraci	Temperatura/°C	Vrijeme/s
Inicijalna denaturacija DNA	95	120
Denaturacija DNA	95	20
Vežanje početnica	52-56	20
Elongacija	72	40
Završna elongacija	72	120

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 protein-kodirajuće regije *CaM* kod pojedinog izolata sa

nukleotidnim slijedovima *CaM* pohranjenih u bazi podataka *National Centre for Biotechnology Information Basic Local Alignment Tool* (NCBI-BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Iz uzoraka zraka prikupljenih u 3 prostorije vlagom pogođenog stana i vanjskog zraka izdvojeno je 35 izolata plijesni prethodno karakteriziranih pripadajući rodovima *Aspergillus* (43%), *Penicillium* (53%) i *Talaromyces* (3%) posljedično identificiranih pomoću parcijalnog gena za *CaM* kao 16 različitih vrsta plijesni (slika 1.)



Slika 1. Zastupljenost pojedinih vrsta plijesni prema mjestu uzorkovanja u unutrašnjosti odnosno vanjskom zraku identificiranih koristeći sekvence parcijalnog gena za *CaM*

Identificirane plijesni u unutrašnjem i vanjskom zraku su se očekivano razlikovale. U vanjskom zraku su od traženih rodova identificirane isključivo plijesni roda *Penicillium* i to *P. biourgeianum*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum/rubens* te *P. kongii* (Slika 1). U unutrašnjem zraku unutar roda *Aspergillus* (13/30) dominirale su vrste serije *Versicolores* – *A. jensenii* (9/13), *A. creber* (1/13) i *A. puulaauensis* (1/13). Preostala 2 izolata roda *Aspergillus* su identificirana kao *A. aureolatus* iz sekcije *Nidulantes* te *A. welwitschiae* iz sekcije *Nigri*. Od plijesni roda *Penicillium* (16/30) vrste *P. chrysogenum* i/ili *P. rubens* predstavljale su 20% svih izolata (6/30), te 38% izolata roda *Penicillium* (8/16) u unutrašnjem zraku. U manjoj mjeri su bile zastupljene vrste *P. polonicum* (2/16) serije *Viridicata* i *P. speluncae* (2/16) serije *Camembertiorum* te *P. digitatum* (1/16) serije *Digitata* i *P. allii* (1/16) serije *Corymbifera*. Identificiran je jedan izolat roda *Talaromyces* kao vrsta *Talaromyces wortmannii*.

Iz tablice 1. vidljive su razlike u identifikaciji na temelju ITS molekularnog markera (Sviben, 2023) i primjenom markera *CaM* korištenog u ovome radu. Sukladno zapažanjima u radu Houbraken i sur. iz 2012. korištenjem *CaM* nije bilo moguće razlučiti vrste *Penicillium chrysogenum* i *Penicillium rubens*, a nije bilo moguće razlučiti ni vrste *Penicillium commune*, *P. palitans* i *P. camemberti*. Možemo pretpostaviti da bi filogenetička analiza ili identifikacija primjenom drugog molekularnog markera poput β -tubulina *benA* pomogla u preciznijoj identifikaciji izolata ovih srodnih vrsta.

Rezultati ovog rada u skladu su s prethodnim istraživanjima koja su pokazala da je *Penicillium chrysogenum* među najčešćim vrstama u unutrašnjem zraku (Beguin i Nolard, 1994; Delanoë i sur., 2020) te da su vrste *A. jensenii* i *A. creber* najčešće u bioaerosolima (Géry i sur., 2021; Jakšić Despot i sur., 2016; Visagie i sur., 2014a). Značajno se razlikuju rezultati rada Sviben iz 2023. gdje je upotrebom ITS molekularnog markera identificirano tek 8 različitih vrsta rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Talaromyces*, dok je primjena sekundarnog molekularnog markera *CaM* iste izolate razlučila u 16 različitih vrsta (Tablica 2). Usporedbom rezultata identifikacije temeljene na dva različita molekularna markera vidljivo je da se vrste roda *Aspergillus* *A. jensenii* i *A. creber* ne mogu razlučiti na temelju ITS te rezultati identifikacije upućuju na vrstu *A. purpureocrustaceus* odnosno *A. sulphureoviridis* (Tablica 2). Nepodudarnost rezultata identifikacije uočena je i kod roda *Penicillium* gdje su dobiveni potpuno različiti rezultati identifikacije upotrebom ITS odnosno *CaM*. U slučaju izolata vrste *Talaromyces wortmannii* nije bilo razlike u identifikaciji izolata primjenom markera ITS i *CaM*.

Tablica 2. Usporedba rezultata identifikacije plijesni Sviben (2023.) korištenjem ITS molekularnog markera s rezultatima ovog rada dobivenih korištenjem markera CaM.

Vrste identificirane pomoću ITS	N	Vrste identificirane pomoću CaM	N
<i>Aspergillus aureolatus</i>	1	<i>Aspergillus aureolatus</i>	1
<i>Aspergillus purpureocrustaceus</i>	9	<i>Aspergillus jensenii</i>	7
		<i>Aspergillus creber</i>	1
		<i>Aspergillus puulaauensis</i>	1
<i>Aspergillus sulphureoviridis</i>	2	<i>Aspergillus jensenii</i>	2
<i>Aspergillus welwitschiae/niger</i>	1	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	1
<i>Penicillium fimorum</i>	8	<i>Penicillium chrysogenum/rubens</i>	8
<i>Penicillium bialowiezense</i>	3	<i>Penicillium biourgeianum</i>	1
		<i>Penicillium kongii</i>	1
		<i>Penicillium brevicompactum</i>	1
<i>Penicillium robsamsonii</i>	5	<i>Penicillium expansum</i>	3
		<i>Penicillium polonicum</i>	2
<i>Penicillium robsamsonii/hordei</i>	1	<i>Penicillium digitatum</i>	1
<i>Penicillium speluncae</i>	4	<i>Penicillium alii</i>	1
		<i>Penicillium commune/palitan/camemberti</i>	1
		<i>Penicillium speluncae</i>	2
<i>Talaromyces wortmannii</i>	1	<i>Talaromyces wortmannii</i>	1

N- broj izolata plijesni iz zraka

Također se razlikuju rezultati istraživanja Delanoë i sur. iz 2020. gdje je korištenjem ITS regije najčešća identificirana vrsta roda *Aspergillus* te druga najčešća vrsta gljivica općenito bila *A. versicolor* identificirana u 73% kućanstava, nakon koje su slijedile *A. fumigatus* te *A. flavus*, no te razlike posljedica značajnih preklapanja unutar genske regije ITS kod roda *Aspergillus*, a djelomično i posljedica aktualnih taksonomskim promjena.

Vrsta *A. versicolor* je do prije nekoliko godina bila smatrana najčešćom vrstom bioaerosola unutarnjeg okoliša, no valja napomenuti da prilikom usporedbe podataka treba uzeti u obzir učestale taksonomske promjene poput napomene u radu Visagie i sur. (2014a) da bi se većina „*A. versicolor*“ vrsta iz mikološke kolekcije plijesni DTO (Tehničkog Sveučilišta u Danskoj) pohranjenih u CBS bazi mikrobnih kultura Westerdijk Instituta u Nizozemskoj sada trebala identificirati kao *A. creber*. Također, prema najnovijim taksonomskim izmjenama je serija *Versicolores* reducirana na 4 vrste (*A. versicolor*, *A. creber*, *A. sydowii* i *A. subversicolor*), a preostale vrste su sinonimizirane s *A. versicolor* ili *A. creber* (Sklenář i sur., 2022) čime su *A. jensenii* i *A. puulaauensis* sinonimizirane s *A. creber* što *A. creber* čini najčešćom vrstom u bioaerosolu unutrašnjeg okoliša ovog rada sukladno zapažanjima Géry i sur. iz 2021. te Jakšić i sur. 2021. Valja napomenuti i da je *A. welwitschiae* nedavno sinonimiziran s *A. niger* uslijed

redukcije broja vrsta serije *Nigri* (Bian i sur., 2022) te da je predloženo da *P. kongii* opisan 2013. u Kini zapravo nije zasebna vrsta nego sinonim za *P. brevicompactum* (Visagie i sur., 2014a; Wang i Wang, 2013).

Premda je korištenje morfologije prilikom identifikacije gljivica vrlo bitno za razumijevanje evolucije morfoloških karakteristika, više nije najefikasniji ni najprecizniji način osobito na razini vrste te su metode bazirane na sekvenciranju DNA uvelike zamijenile tradicionalne metode. DNA barkodiranje je metoda u kojoj korisnik uspoređuje nepoznatu sekvencu sa sekvencama unutar baze podataka (Raja i sur., 2017). Korisnost i uspjeh markera ili barkoda značajno ovisi o stopi evolucije, duljini sekvence i sačuvanim bočnim regijama (Yang i Rannala, 2012). Kodirajuće i nekodirajuće regije mogu biti iskorištene kao DNA barkodovi te je određivanje potencijalne regije kao barkoda jedan od najvažnijih koraka prilikom identifikacije specifične vrste. Uobičajeni DNA barkodovi predloženi za gljive su *ITS* regija ribosomalnih RNA gena, nuklearni geni koji kodiraju za ribosomalnu veliku (*LSU*; 28S rRNA) i malu podjedinicu (*SSU*, 18S rRNA), podjedinicu citokrom oksidaze 1 (*COX1*, *COI*), najveću podjedinicu RNA polimeraze II (*RPB1*), drugu najveću podjedinicu RNA polimeraze II (*RPB2*), β -tubulin (*benA*), komponenta 7 kompleksa minikromosomskog održavanja (*MCM7*), translacijski elongacijski faktor 1- α (*TEF1- α*), γ -aktin, šesta podjedinica ATP sintaze (*ATP6*) i kalmodulin (*CaM*) (Tekpinar i Kalmer, 2019).

Iako je *ITS* indiciran brojnim studijama kao potencijalni barkod za većinu gljivica zbog visokog stupnja međuvrsne varijabilnosti, sačuvanih mjesta početnica i višestrukih kopija unutar genoma, nije pretjerano moćan prilikom razlučivanja vrsta unutar rodova *Penicillium* i *Aspergillus* (Samson i sur., 2014; Tekpinar i Kalmer, 2019). Dok su neke studije pokazale da je *COX1* gen vrijedan molekularan marker za determinaciju vrsta plijesni rodova *Penicillium* i *Aspergillus*, postoje i studije kontradiktornih rezultata (Geiser i sur., 2007; Molitor i sur., 2010; Seifert i sur., 2007). Schoch i sur. (2009) su pokazali da *RPB1* i *RPB2* geni pružaju više filogenetičkih informacija od ribosomalnih gena za carstvo Ascomycota u koje spadaju rodovi *Aspergillus*, *Penicillium* i *Talaromyces*. Iako je *CaM* preporučen kao sekundarni marker prilikom identifikacije plijesni rodova *Aspergillus* (Samson i sur. 2014), valja napomenuti da postoje preporuke i za korištenje *benA* gena kod identifikacije vrsta rodova *Aspergillus* i *Talaromyces* (Houbraken i sur., 2021).

Osim molekularnih markera prilikom identifikacije vrsta postoji potencijal u korištenju kemijskih markera u svrhu identifikacije s obzirom da rodovi *Aspergillus*, *Penicillium* i *Talaromyces* sadrže vrste koje proizvode veliki broj za njih specifičnih ekstroлита s visokim stupnjem kemokonzistentnosti (Frisvad i sur., 2015). Analizom sekundarnih metabolita gljivica

u zagađenoj knjižnici u Veneciji su Micheluz i sur. 2016. potvrdili metaboličke uzorke dobro karakteriziranih vrsta te proširili znanje o proizvodnji sekundarnih metabolita nekoliko drugih vrsta. *Penicillium brevicompactum* je uglavnom karakteriziran proizvodnjom mikofenolne kiseline dok su tipični metaboliti za *Penicillium chrysogenum* identificirani kao krizogin, rokfortin C i sekalonska kiselina D (Fischer i sur., 2000.; Frisvad i sur., 2004; Gutarowska i sur., 2014; Nielsen, 2003) zajedno s andrastinom A i B, citreorozeinom, fulvinskom kiselinom, neoksalinom i oksalinom koje uobičajeno proizvode i druge *Penicillium* spp. (Frisvad i sur., 2004). Isto tako, identifikacija sterigmatocistina ukazuje na prisutnost plijesni rodova *Aspergillus* koji ga proizvode, a koji su dominantno identificirani u ovom radu.

Javnozdravstveni značaj dobivenih rezultata proizlazi iz povezanosti identificiranih vrsta plijesni i njihovog toksinogenog i alergijskog potencijala, a neke vrste se mogu povezati i sa infekcijama kod ljudi, osobito kod imunokompromitiranih osoba.

Vrste *A. creber*, *A. puulaauensis* i *A. jensenii* obiluju citotoksičnim ekstroilitima (Géry i sur., 2023) među kojima je najznačajniji sterigmatocistin (Jakšić Despot i sur., 2016). Istraživanja su pokazala da najučestalije vrste plijesni identificirane u uzorcima zraka iz vlažnog stana, *A. jensenii* i *A. creber*, proizvode veliku količinu 5-metoksisterigmatocistina, sterigmatocistina i nekolicine biosintetskih prekursora (averantina, averufanina, nidurufina, norsolinične kiseline te versikolorina A i C) kao i orselinske kiseline (Jakšić Despot i sur., 2016; Micheluz i sur., 2016). Sterigmatocistin je pokazao citotoksična i genotoksična svojstva u nekolicini staničnih linija ljudskog porijekla uključujući HepG2 stanice hepatocelularnog karcinoma, ezofagealne epitelne Het2 stanice, A549 stanice plućnog adenokarcinoma, besmrtna BEAS-2B stanice bronhijskog epitela te THP-1 makrofagima slične stanice koje se koriste kao model procjene imunotoksičnosti (Despot i sur., 2016; Gao i sur., 2015; Huang i sur., 2014; Wang i sur., 2013). Istraživanja su pokazala i sposobnost aerosolizacije sterigmatocistina i aflatoksina te posljedične inhalacije od strane stanovnika plijesnima oštećenih zgrada (Aleksic i sur., 2017; Wang i sur., 2008). Ti mikotoksini su pokazali i inhalacijsku toksičnost (Jakšić i sur., 2020; Sabourin i sur., 2006) što pokazuje važnost praćenja tih vrsta plijesni u bioaerosolima te potencijal njihovog korištenja kao mikrobioloških indikatora nezdravog staništa. Osim mikotoksigenog potencijala, vrsta *A. creber* je prethodno izolirana iz kliničkih uzoraka, a prijavljena je i kao uzročnik infekcije u Brazilu (Nigri i sur., 2014; Siqueira i sur., 2016). Vrste iz sekcije *Nigri*, *Aspergillus welwitschiae* (odnosno *A. niger*) ima dokazanu sposobnost proizvodnje mikotoksina fumonizina i ohratoksina A koji se smatra potencijalnim karcinogenom za ljude (Perrone i Gallo, 2017; Susca i sur., 2016). Pored toga, ove vrste mogu uzrokovati i infekcije kod ljudi i životinja (Houbraken i sur., 2020).

Druga najčešća identificirana vrsta roda *Penicillium* ovog rada, *P. expansum* koji pripada seriji *Penicillium*, proizvodi široki raspon sekundarnih metabolita te je daleko najznačajniji izvor patulina, potencijalno karcinogenog mikotoksina (Andersen i sur., 2004; Perrone i Susca, 2017). *P. polonicum* je značajan proizvođač penicilinske kiseline, a proizvodi i verukozidin, mikotoksin za koji se tvrdilo da uzrokuje mikotoksikoze u životinja (Burka i sur., 1983). Mnoge vrste roda *Penicillium* su povezane s propadanjem specifične hrane te su stoga često nađene u unutrašnjosti stambenih prostora poput vrste *P. expansum* koja je povezana s truljenjem jabuka te *P. digitatum* koji uzrokuje truljenje citrusa dok je *P. allii* patogen bijelog luka (Valdez i sur., 2006; Visagie i sur., 2014b).

Talaromyces wortmannii je primarno endofitna plijesan slična vrsti *T. flavus* te jedina roda *Talaromyces* uz *T. flavus* koja se može očekivano naći u hrani (Batt i Tortorello, 2014). Proizvodi rugulozin i vortmanin, specifični inhibitor obitelji fosfatidilinozitol 3-kinaza (PI3K) za koji je pokazano da može inducirati staničnu toksičnost akumulacijom dvolančane DNA (Brian i sur., 1957; Ihara i sur., 2020; Samson i sur., 2010).

Trenutno tek nekoliko gljivičnih rodova sadrži dobro karakterizirane i pročišćene alergene te je velika većina ekstrakta gljivičnih alergena koji se koriste za provjeru senzitivizacije pacijenata varijabilna i nestandardizirana (Rudert i Portnoy, 2017). Iako je nekolicina studija pokazala da je rana izloženost vlažnom okolišu koji podržava rast mikroorganizama i gljivica rizični faktor za razvoj astme i senzitivizaciju, još nije razjašnjen potreban opseg, trajanje i konzistencija takvih izlaganja (Rudert i Portnoy, 2017). To se može objasniti izazovima u provođenju istraživanja koji bi podrazumijevalo promjenjivu izloženost gljivicama bez istovremenog mijenjanja izloženosti drugim supstancama poput bakterijskih endotoksina ili nealergenim gljivičnim produktima.

Izloženost identificiranim plijesnim staničnim predstavljajući značajan zdravstveni rizik od akutne i kronične toksičnosti prethodno spomenutih sekundarnih metabolita koje one proizvode do potencijala razvoja astme i alergija, ali i ozbiljnijih posljedica poput infekcija kod imunokompromitiranih osoba te ukazuje na važnost daljnjih istraživanja te rutinske identifikacije gljivica prisutnih unutar stambenih prostora pogođenih vlagom u svrhu procjene i minimizacije rizika.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata možemo izvući sljedeće zaključke:

- Primjenom sekundarnog molekularnog markera *CaM* izolati plijesni rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Talaromyces* koji su bili prikupljeni iz zraka u vlažnome stanu (N=35) identificirano je kao 16 različitih vrsta, dvostruko više nego primjenom molekularnog markera ITS
- Najučestalija vrsta u stanu pogođenom vlagom je *Aspergillus jensenii* (30%), zatim *Penicillium chrysogenum/rubens* (20%), *Penicillium expansum* (10%) te *Penicillium polonicum* (7%) i *Penicillium speluncae* (7%)
- U kontrolnim uzorcima vanjskog zraka su izolirane plijesni *P. biourgeianum*, *P. brevicompactum*, *P. kongii* te *P. chrysogenum/rubens* od kojih je jedino *P. chrysogenum/rubens* izolirana i u unutrašnjem zraku
- Korištenjem *CaM* za identifikaciju plijesni se ne mogu adekvatno razlučiti vrste *P. chrysogenum* i *P. rubens*, kao ni *P. commune*, *P. palitans* i *P. camemberti*
- Najbolji pristup točnoj i preciznoj identifikaciji plijesni bi trebao uključivati kombinaciju različitih molekularnih i kemijskih markera
- Identifikacija plijesni unutar zgrada oštećenih vlagom u kojima borave ljudi je bitna prilikom procjene zdravstvenog rizika zbog specifičnosti metaboličkih profila pojedinih vrsta te posljedične izloženosti različitim mikotoksinima, ali i procjeni rizika od infekcija i alergija povezanih sa plijesnima.

6. LITERATURA

- Aleksic B, Draghi M, Ritoux S, Bailly S, Lacroix M, Oswald IP, Bailly J-D, Robine E. Aerosolization of Mycotoxins after Growth of Toxinogenic Fungi on Wallpaper. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(16), e01001-17.
- Andersen B, Smedsgaard J, Frisvad JC. Penicillium expansum: Consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(8), 2421–2428.
- Batt CA, Tortorello ML (Ur.). *Encyclopedia of food microbiology* (2. ed). AP, Academic Press/Elsevier, 2014.
- Beguin H, Nolard N.. Mould biodiversity in homes I. Air and surface analysis of 130 dwellings. *Aerobiologia*, 1994, 10(2–3), 157.
- Brasel TL, Douglas DR, Wilson SC, Straus DC. Detection of Airborne *Stachybotrys chartarum* Macrocylic Trichothecene Mycotoxins on Particulates Smaller than Conidia. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1), 114–122.
- Brian PW, Curtis PJ, Hemming HG, Norris GLF. Wortmannin, an antibiotic produced by *Penicillium wortmanni*. *Transactions of the British Mycological Society*, 1957, 40(3), 365-IN3.
- Burka LT, Ganguli M, Wilson BJ. Verrucosidin, a tremorgen from *Penicillium verrucosum* var *cyclopium*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1957, 9, 544.
- Delanoë A, Heutte N, Gente S, Séguin V, Garon D. Relationships between Exposure to Bioaerosols, Moldy Surface and Symptoms in French Mold-Damaged Homes. *Atmosphere*, 2020, 11(3), 223.
- Despot DJ, Kocsubé S, Bencsik O, Kecskeméti A, Szekeres A, Vágvölgyi C, Varga J, Klarić MŠ. Species diversity and cytotoxic potency of airborne sterigmatocystin-producing *Aspergilli* from the section *Versicolores*. *Science of The Total Environment*, 2016, 562, 296–304.
- Díaz Nieto CH, Granero AM, Zon MA, Fernández H. Sterigmatocystin: A mycotoxin to be seriously considered. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, 118, 460–470.
- Fischer G, Müller T, Schwalbe R, Ostrowski R, Dott W. Species-specific profiles of mycotoxins produced in cultures and associated with conidia of airborne fungi derived

- from biowaste. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2000, 203(2), 105–116.
- Frisva, JC. Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 5.
- Géry A, Basset B, Gounel N, Gosselin M, Richard E, Séguin V, Bonhomme J, Garon D. Aflatoxin biosynthetic pathway extrolites in airborne *Aspergilli* series *Versicolores*. *World Mycotoxin Journal*, 2023, 16(2), 127–135.
- Géry A, Chosson E, Séguin V, Rioult J-P, Bonhomme J, Garon D. Characterization of airborne *Aspergillus* series *Versicolores* collected in French bioaerosols, 2021, 67–75.
- Górny RL, Reponen T, Willeke K, Schmechel D, Robine E, Boissier M, Grinshpun SA. Fungal fragments as indoor air biocontaminants. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(7), 3522–3531.
- Green, B. J., Tovey, E. R., Sercombe, J. K., Blachere, F. M., Beezhold, D. H., & Schmechel, D. (2006). Airborne fungal fragments and allergenicity. *Medical Mycology*, 44(s1), 245–255.
- Gutarowska B, Skóra J, Stępień L, Twarużek M, Błajet-Kosicka A, Otlewska A, Grajewski J. Estimation of fungal contamination and mycotoxin production at workplaces in composting plants, tanneries, archives and libraries. *World Mycotoxin Journal*, 2014, 7(3), 345–355.
- Hong S-B, Go S-J, H-D, Frisvad JC, Samson RA. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*, 2005, 97(6), 1316–1329.
- Houbraken J, Frisvad JC, Seifert KA, Overy DP, Tuthill DM, Valdez JG, Samson RA. New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section *Chrysogena*. *Persoonia*, 2012, 29, 78–100.
- Houbraken J, Kocsubé S, Visagie CM, Yilmaz N, Wang X-C, Meijer M, Kraak B, Hubka V, Bensch K, Samson RA, Frisvad JC. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology*, 2020, 95, 5–169.
- Houbraken J, Visagie CM, Frisvad JC. Recommendations To Prevent Taxonomic Misidentification of Genome-Sequenced Fungal Strains. *Microbiol Resour Announc*. 2021, 10, e01074-20

- Ihara M, Shichijo K, Takeshita S, Kudo T. Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase, induces accumulation of DNA double-strand breaks. *Journal of Radiation Research*, 2020, 61(2), 171–176.
- Jakšić D, Čurtović I, Kifer D, Rašić D, Kopjar N, Micek V, Peraica M, Klarić MŠ. Single-Dose Toxicity of Individual and Combined Sterigmatocystin and 5-Methoxysterigmatocystin in Rat Lungs. *Toxins*, 2020, 12(11), 734.
- 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*, 2021, 31(3), 730–744.
- Joshi, S. The sick building syndrome. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 2008, 12(2), 61.
- Jurjević Ž, Peterson SW, Solfrizzo M, Peraica M. Sterigmatocystin production by nine newly described *Aspergillus* species in section *Versicolores* grown on two different media. *Mycotoxin Research*, 2013, 29(3), 141–145.
- Kretsinger RH. Structure and evolution of calcium-modulated proteins. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 1980, 8(2), 119–174.
- Limper AH, Adenis A, Le T, Harrison TS. Fungal infections in HIV/AIDS. *The Lancet Infectious Diseases*, 2017, 17(11), e334–e343.
- Mendell, MJ, Mirer AG, Cheung K, Tong M, Douwes J. Respiratory and Allergic Health Effects of Dampness, Mold, and Dampness-Related Agents: A Review of the Epidemiologic Evidence. *Environmental Health Perspectives*, 2011, 119(6), 748–756.
- Micheluz A, Sulyok M, Manente S, Krska R, Varese GC, Ravagnan G. Fungal secondary metabolite analysis applied to Cultural Heritage: The case of a contaminated library in Venice. *World Mycotoxin Journal*, 2016, 9(3), 397–407.
- Molitor, C., Inthavong, B., Sage, L., Geremia, R. A., & Mouhamadou, B. (2010). Potentiality of the *cox1* gene in the taxonomic resolution of soil fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 302(1), 76–84.
- Moses L, Morrissey K, Sharpe RA, Taylor T. Exposure to Indoor Mouldy Odour Increases the Risk of Asthma in Older Adults Living in Social Housing. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2019, 16(14), 2600.
- Mudarri DH. Valuing the Economic Costs of Allergic Rhinitis, Acute Bronchitis, and Asthma from Exposure to Indoor Dampness and Mold in the US. *Journal of Environmental and Public Health*, 2016, 2386596.

- Narayanasamy S, Dougherty J, van Doorn HR, Le T. Pulmonary Talaromycosis: A Window into the Immunopathogenesis of an Endemic Mycosis. *Mycopathologia*, 2021, 186(5), 707–715.
- Nielsen KF. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genetics and Biology*, 2003, 39(2), 103–117.
- Norbäck D, Hashim JH, Cai G-H, Hashim Z, Ali F, Bloom E, Larsson L. Rhinitis, Ocular, Throat and Dermal Symptoms, Headache and Tiredness among Students in Schools from Johor Bahru, Malaysia: Associations with Fungal DNA and Mycotoxins in Classroom Dust. *PloS One*, 2016, 11(2), e0147996.
- Omebeyinje MH, Adeluyi A, Mitra C, Chakraborty P, Gandee GM, Patel N, Verghese B, Farrance CE, Hull M, Basu P, Lee K, Adhikari A, Adivar B, Horney JA, Chanda A. Increased prevalence of indoor *Aspergillus* and *Penicillium* species is associated with indoor flooding and coastal proximity: A case study of 28 moldy buildings. *Environmental Science. Processes & Impacts*, 2021, 23(11), 1681–1687.
- Perrone G, Gallo A. *Aspergillus* Species and Their Associated Mycotoxins. U: A. Moretti A. Susca, *Mycotoxigenic Fungi* (Springer New York), 2017, 1542, 33–49.
- Perrone G, Susca A. *Penicillium* Species and Their Associated Mycotoxins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2017, 1542, 107–119.
- Piontek M, Łuszczynska K, Lechów H. Occurrence of the Toxin-Producing *Aspergillus versicolor* Tiraboschi in Residential Buildings. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2016, 13(9), 862.
- Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, 2017, 80(3), 756–770.
- Rick EM, Woolnough K, Pashley CH, Wardlaw AJ. Allergic Fungal Airway Disease. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, 2016, 26(6), 344–354.
- Rudert A, Portnoy J. Mold allergy: Is it real and what do we do about it? *Expert Review of Clinical Immunology*, 2017, 13(8), 823–835.
- Sabourin, PJ, Price JA, Casbohm SL, Perry MR, Tuttle RS, Rogers JV, Rowell KS, Estep JE, Sabourin CL. Evaluation of Acute Immunotoxicity of Aerosolized Aflatoxin B(1) in Female C57BL/6N Mice. *Journal of Immunotoxicology*, 2006, 3(1), 11–20.
- Samson RA. Ecology and general characteristics of indoor fungi. *Fundamentals of Mold Growth in Indoor Environments and Strategies for Healthy Living*, prvo izdanje; Adan, C.G.O., U: Wageningen Academic, Nizozemska, 2011, 101–116

- Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B. *Food and indoor fungi* (drugo izdanje). Westerdijk Fungal Biodiversity Institute. 2010
- Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong S-B, Hubka V, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 2014, 78, 141–173.
- Samson, RA, Yilmaz N, Houbraken J, Spierenburg H, Seifert KA, Peterson SW, Varga J, Frisvad JC. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Studies in Mycology*, 2011, 70, 159–183.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(16), 6241–6246.
- Seifert KA, Samson RA, deWaard JR, Houbraken J, Lévesque CA, Moncalvo J-M, Louis-Seize G, Hebert PDN. Prospects for fungus identification using *COI* DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(10), 3901–3906.
- 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. *Studies in Mycology*, 2022, 102, 53–93.
- Sun B-D, Chen AJ, Houbraken J, Frisvad JC, Wu W-P, Wei H-L, Zhou Y-G, Jiang X-Z, Samson RA. New section and species in *Talaromyces*. *MycKeys*, 2020, 68, 75–113.
- Susca A, Proctor RH, Morelli M, Haidukowski M, Gallo A, Logrieco AF, Moretti A. Variation in Fumonisin and Ochratoxin Production Associated with Differences in Biosynthetic Gene Content in *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* Isolates from Multiple Crop and Geographic Origins. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7, 1412
- Sviben L. Bioraznolikost plijesni u vlažnom stambenom prostoru. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2023.
- Tekpinar AD, Kalmer A. Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. *Nova Hedwigia*, 2019, 109(1–2), 187–224.
- Valdez JG, Makuch MA, Ordovini AF, Masuelli RW, Overy DP, Piccolo RJ First report of *Penicillium allii* as a field pathogen of garlic (*Allium sativum*). *Plant Pathology*, 2006, 55(4), 583–583.

- Visagie CM, Hirooka Y, Tanney JB, Whitfield E, Mwangi K, Meijer M, Amend AS, Seifert KA, Samson RA. *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world. *Studies in Mycology*, 2014a, 78(1), 63–139.
- Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Hong S-B, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Varga J, Yaguchi T, Samson RA. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 2014b, 78(1), 343–371.
- Wang B, Wang L. *Penicillium kongii*, a new terverticillate species isolated from plant leaves in China. *Mycologia*, 2013, 105(6), 1547–1554.
- Wang J, Janson C, Gislason T, Gunnbjörnsdóttir M, Jogi R, Orru H, Norbäck D. Volatile organic compounds (VOC) in homes associated with asthma and lung function among adults in Northern Europe. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 2023, 321, 121103.
- Wang J, Janson C, Lindberg E, Holm M, Gislason T, Benediktsdóttir B, Johannessen A, Schlünssen V, Jogi R, Franklin KA, Norbäck D. Dampness and mold at home and at work and onset of insomnia symptoms, snoring and excessive daytime sleepiness. *Environment International*, 2020, 139, 105691.
- Wang L, Zhuang W-Y. Phylogenetic analyses of penicillia based on partial calmodulin gene sequences. *Biosystems*, 2007, 88(1–2), 113–126.
- Wang Y, Chai T, Lu G, Quan C, Duan H, Yao M, Zucker B-A., Schlenker G. Simultaneous detection of airborne aflatoxin, ochratoxin and zearalenone in a poultry house by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography. *Environmental Research*, 2008, 107(2), 139–144.
- 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.
- Yang Z, Rannala B. Molecular phylogenetics: Principles and practice. *Nature Reviews. Genetics*, 2012, 13(5), 303–314.
- Yilmaz N, Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Studies in Mycology*, 2014, 78, 175–341.

7. SAŽETAK

Plijesni rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Talaromyces* su jedni od najčešćih gljivičnih zagađivača stambenih prostora oštećenih vlagom koji predstavljaju značajan rizik za zdravlje ukućana s obzirom da mogu uzrokovati brojne akutne, ali i kronične zdravstvene posljedice. Da bi se procijenio obujam zagađenja prikupljeni su uzorci zraka u stanu s vidljivim porastom plijesni, kao i u neposrednoj blizini u svrhu kontrole. Od plijesni izoliranih iz uzoraka izdvojene su one rodova *Penicillium*, *Aspergillus* i *Talaromyces* u svrhu daljnje analize. Identificirane su do razine vrste sekvenciranjem dijela gena za kalmodulin (*CaM*) i usporedbom dobivenih nukleotidnih slijedova s podacima NCBI baze podataka. Među aspergilima (13/35) je dominirao *A. jensenii* (9/13), a identificirani su i *A. creber* (1/13), *A. puulaauensis* (1/13), *A. welwitschiae* (1/13) te *A. aureolatus* (1/13). *P. chrysogenum/rubens* je bila najzastupljenija vrsta roda *Penicillium* (8/24) od kojih su 2 uzorka identificirana iz vanjskog zraka. Preostale penicilije uključuju *P. expansum* (3/24), *P. polonicum* (2/24), *P. speluncae* (2/24), *P. allii* (1/24), *P. commune* (1/24) i *P. digitatum* (1/24). Po jedan od svakog izolata *P. biourgeianum*, *P. brevicompactum* te *P. kongii* su identificirani samo iz uzoraka vanjskog zraka. Jedini izolat roda *Talaromyces* je identificiran kao *T. wortmannii*. Iako *CaM* pruža precizniju identifikaciju od *ITS* molekularnog markera, ne može se primijeniti u razlučivanju vrsta *P. commune* od *P. palitans* i *P. camemberti*, kao i *P. chrysogenum* i *P. rubens*. Prema dostupnoj literaturi, identificirane vrste ukazuju na značajan zdravstveni rizik izloženim stanarima primarno zbog zabrinjavajućeg profila sekundarnih metabolita. Rezultati naglašavaju povezan dugoročni zdravstveni rizik asociran s boravkom u vlažnim stambenim prostorima s vidljivom porastom plijesni, a ukazuju i na potrebu za daljnjim istraživanjima s obzirom na prevalentnost tog problema.

8. SUMMARY

Fungi from the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* are among the most prevalent fungal contaminants found in damp-damaged living environment, posing significant health risks to inhabitants. These fungi can trigger various acute and chronic health issues. To assess the extent of contamination, indoor air samples were collected from an apartment with visible mould growth and outdoor air samples were collected as a control. Among all the isolated fungi, those affiliated with the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* were specifically selected for further analysis. Identification was carried out at the species level utilizing partial calmodulin (*CaM*) gene sequencing, with obtained nucleotide sequences compared against the NCBI database. Among Aspergilli (13/35 isolates) *A. jensenii* was the most dominating species (9/13) while there was only one isolate each of *A. creber*, *A. puulaauensis*, *A. aureolatus* and *A. welwitschiae*. *P. chrysogenum/rubens* was the most frequent *Penicillium* species (8/24), two of which were from outdoor air samples. Other *Penicillia* included *P. expansum* (3/24), *P. polonicum* (2/24), *P. speluncae* (2/24), *P. allii* (1/24), *P. commune* (1/24) and *P. digitatum* (1/24). One of each isolates of *P. biourgeianum*, *P. brevicompactum* and *P. kongii* were only identified among outdoor air isolates. The single isolate assigned to the *Talaromyces* sp. was identified as *T. wortmannii*. Although *CaM* provided more precise species identification compared to the the *ITS* molecular marker, it showed a limitation in distinguishing *P. commune* from *P. palitans* and *P. camemberti* as well as *P. chrysogenum* and *P. rubens*. Based on the available literature, the identified species pose a significant health threat to occupants exposed to them, primarily due to their concerning array of secondary metabolites. This underscores a related long-term health risk associated with residing in damp and mouldy housing. Moreover, it highlights the necessity for additional research, given the prevalence of this issue.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Mikrobiologiju
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA PLIJESNI RODOVA *ASPERGILLUS*, *PENICILLIUM* I *TALAROMYCES* U VLAŽNOM STAMBENOM PROSTORU PRIMJENOM SEKUNDARNOG MARKERA ZA GEN KALMODULIN

Lara Špiljak

SAŽETAK

Plijesni rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Talaromyces* su jedni od najčešćih gljivičnih zagađivača stambenih prostora oštećenih vlagom koji predstavljaju značajan rizik za zdravlje ukućana s obzirom da mogu uzrokovati brojne akutne, ali i kronične zdravstvene posljedice. Da bi se procijenio obujam zagađenja prikupljeni su uzorci zraka u stanu s vidljivim porastom plijesni, kao i u neposrednoj blizini u svrhu kontrole. Od plijesni izoliranih iz uzoraka izdvojene su one rodova *Penicillium*, *Aspergillus* i *Talaromyces* u svrhu daljnje analize. Identificirane su do razine vrste sekvenciranjem dijela gena za kalmodulin (*CaM*) i usporedbom dobivenih nukleotidnih slijedova s podacima NCBI baze podataka. Među aspergilima (13/35) je dominirao *A. jensenii* (9/13), a identificirani su i *A. creber* (1/13), *A. puulaquensis* (1/13), *A. welwitschiae* (1/13) te *A. aureolatus* (1/13). *P. chrysogenum/rubens* je bila najzastupljenija vrsta roda *Penicillium* (8/24) od kojih su 2 uzorka identificirana iz vanjskog zraka. Preostale penicilije uključuju *P. expansum* (3/24), *P. polonicum* (2/24), *P. speluncae* (2/24), *P. allii* (1/24), *P. commune* (1/24) i *P. digitatum* (1/24). Po jedan od svakog izolata *P. biourgeianum*, *P. brevicompactum* te *P. kongii* su identificirani samo iz uzoraka vanjskog zraka. Jedini izolat roda *Talaromyces* je identificiran kao *T. wortmannii*. Iako *CaM* pruža precizniju identifikaciju od *ITS* molekularnog markera, ne može se primijeniti u razlučivanju vrsta *P. commune* od *P. palitans* i *P. camemberti*, kao i *P. chrysogenum* i *P. rubens*. Prema dostupnoj literaturi, identificirane vrste ukazuju na značajan zdravstveni rizik izloženim stanarima primarno zbog zabrinjavajućeg profila sekundarnih metabolita. Rezultati naglašavaju povezan dugoročni zdravstveni rizik asociran s boravkom u vlažnim stambenim prostorima s vidljivom porastom plijesni, a ukazuju i na potrebu za daljnjim istraživanjima s obzirom na prevalenciju tog problema.

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

Rad sadrži: 23 stranica, 1 grafički prikaz, 2 tablice i 66 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Aspergillus jensenii*, *Penicillium chrysogenum*, *Talaromyces wortmannii*, plijesni, identifikacija, kalmodulin

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, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

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

Rad prihvaćen:

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Microbiology
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diploma thesis

CALMODULIN BASED IDENTIFICATION OF AIRBORNE FUNGI FROM THE GENERA *ASPERGILLUS*, *PENICILLIUM* AND *TALAROMYCES* IN A DAMP-DAMAGED LIVING ENVIRONMENT

Lara Špiljak

SUMMARY

Fungi from the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* are among the most prevalent fungal contaminants found in damp-damaged living environment, posing significant health risks to inhabitants. These fungi can trigger various acute and chronic health issues. To assess the extent of contamination, indoor air samples were collected from an apartment with visible mould growth and outdoor air samples were collected as a control. Among all the isolated fungi, those affiliated with the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* were specifically selected for further analysis. Identification was carried out at the species level utilizing partial calmodulin (*CaM*) gene sequencing, with obtained nucleotide sequences compared against the NCBI database. Among Aspergilli (13/35 isolates) *A. jensenii* was the most dominating species (9/13) while there was only one isolate each of *A. creber*, *A. puulaauensis*, *A. aureolatus* and *A. welwitschiae*. *P. chrysogenum/rubens* was the most frequent *Penicillium* species (8/24), two of which were from outdoor air samples. Other *Penicillia* included *P. expansum* (3/24), *P. polonicum* (2/24), *P. speluncae* (2/24), *P. allii* (1/24), *P. commune* (1/24) and *P. digitatum* (1/24). One of each isolates of *P. biourgeianum*, *P. brevicompactum* and *P. kongii* were only identified among outdoor air isolates. The single isolate assigned to the *Talaromyces* sp. was identified as *T. wortmannii*. Although *CaM* provided more precise species identification compared to the *ITS* molecular marker, it showed a limitation in distinguishing *P. commune* from *P. palitans* and *P. camemberti* as well as *P. chrysogenum* and *P. rubens*. Based on the available literature, the identified species pose a significant health threat to occupants exposed to them, primarily due to their concerning array of secondary metabolites. This underscores a related long-term health risk associated with residing in damp and mouldy housing. Moreover, it highlights the necessity for additional research, given the prevalence of this issue.

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

Thesis includes: 23 pages, 1 figure, 2 tables and 66 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Aspergillus jensenii*, *Penicillium chrysogenum*, *Talaromyces wortmannii*, mould, identification, calmodulin

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
Ana-Marija Domijan, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry