Identifikacija aspergila iz sekcija Circumdati, Flavi i Nigri u prašini nakon poplave

Geček, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:272052

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Jelena Geček

Identifikacija aspergila iz sekcija *Circumdati*, *Flavi* i *Nigri* u prašini nakon poplave

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018. godina

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

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

Zahvaljujem se svojoj mentorici dr. sc. Danieli Jakšić na stručnom vodstvu, ohrabrujućim savjetima i potpori. Također zahvaljujem ostalim zaposlenicima Zavoda koji su mi olakšali boravak i rad na Zavodu za mikrobiologiju te svojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj potpori i razumijevanju.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. PLIJESNI RODA *ASPERGILLUS* 2

1.2. POPLAVA U GUNJI 2014. GODINE 4

1.3. PLIJESNI KAO JAVNOZDRAVSTVENI PROBLEM 5

2. OBRAZLOŽENJE TEME 6

3. MATERIJALI I METODE 8

3.1. PRIPREMA IZOLATA ASPERGILA ZA ANALIZU 9

3.2. MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA *ASPERGILLUS* VRSTA 9

3.2.1. IZOLACIJA DNA 9

3.2.2. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE, PCR 11

3.2.3. ANALIZA GENSKIH SLIJEDOVA 13

4. REZULTATI I RASPRAVA 14

4.1. BIORAZNOLIKOST VRSTA RODA *ASPERGILLUS* IZ SEKCIJA *CIRCUMDATI*, *FLAVI* I *NIGRI* U UZORCIMA PRAŠINE NA POJEDINIM LOKACIJAMA 15

4.2. ASPERGILI IZ SEKCIJE *CIRCUMDATI* 17

4.3. ASPERGILI IZ SEKCIJE *FLAVI* 18

4.4. ASPERGILI IZ SEKCIJE *NIGRI* 19

5. ZAKLJUČCI 21

6. LITERATURA 23

7. SAŽETAK 29

8. SUMMARY 31

1. UVOD

1.1. PLIJESNI RODA *ASPERGILLUS*

Vrste roda *Aspergillus* su ubikvitarne filamentozne gljivice (plijesni) međusobno različitih morfoloških, fizioloških i filogenetičkih svojstava. Dok su kao korisni mikroorganizmi svoju ulogu pronašli u biotehnologiji, prehrambenoj i kemijskoj industriji, aspergili su značajni kontaminanti hrane te uzročnici infektivnih i alergijskih bolesti (Pitt i Hocking, 2009; Klich, 2006). Do danas je opisano više od 344 vrste aspergila među kojima su od osobitog javnozdravstvenog interesa vrste iz sekcija *Circumdati*, *Flavi* i *Nigri*. Pored alergijskog i/ili invazivnog potencijala, aspergili su prijetnja ljudskom zdravlju i zbog tvorbe mikotoksina, odnosno sekundarnih metabolita plijesni. Većina njih su male molekule producirane tijekom morfološke i kemijske diferencijacije, a izlučuju se ili deponiraju unutar ili van staničnog zida. I dok su endometaboliti (primarni metaboliti) pronađeni kod gotovo svih vrsta gljiva (i kod većine drugih organizama), profil egzometabolita, egzoproteina i egzopolisaharida taksonomski je ograničen i specifičan za pojedinu vrstu. Ipak, neki sekundarni metaboliti mogu biti zajednički različitim vrstama, a stečeni su lateralnim ili horizontalnim transferom gena. Prema literaturi, najviše identificiranih metabolita nalazimo upravo unutar roda *Aspergillus*, njih 1984 (Frisvad, 2014). Rast plijesni, a posljedično i tvorba njihovih sekundarnih metabolita, u unutrašnjim prostorima u kojima ljudi borave ponajviše ovisi o dostupnosti vode, tj. o aktivitetu vode u supstratu, a_w. Minimalni aktivitet vode potreban za rast plijesni varira od manje od 0,80 do iznad 0,98 (WHO, 2009). Vrste roda *Aspergillus* spadaju u primarne i sekundarne kolonizatore te se kao takve mogu prilagoditi a_w vrijednosti ispod 0,80, što im omogućava rast u vlažnim unutrašnjim prostorima u većem postotku u odnosu na druge plijesni (Jakšić Despot i Šegvić Klarić, 2014). Plijesnima su za rast potrebni nutrijenti poput ugljikohidrata, proteina i lipida, a važan izvor tih nutrijenata je i građevinski materijal koji je većinom organskog sastava i kod povećane dostupnosti vode u supstratu, tj. a_w vrijednosti, taj materijal postaje vrlo dobra podloga za rast plijesni. Većina plijesni izolirana iz unutrašnjeg okoliša raste pri temperaturi od 10 do 30°C (WHO, 2009).

Do povećane dostupnosti vode u supstratu, a_w vrijednosti, a posljedično i do povećanog rasta brojnih mikroorganizama, uključujući i plijesni, u unutarnjim prostorima može dovesti neadekvatna ventilacija, izolacija, sustav grijanja i klimatiziranja, kao i curenje cijevi i kondenzacija, ali i prirodne katastrofe poput poplava (WHO, 2009).

Aspergili iz sekcije *Circumdati* široko su rasprostranjeni i nalaze se u tlu, na poljoprivrednom dobru i uskladištenoj hrani, a kao najpogodniji supstrati, osobito za vrste proizvođače okratoksina, ističu se žitarice (osobito riža, rjeđe pšenica i kukuruz), kava i drugi napitci

(poput vina, piva, soka od grožđa, mlijeka) te prehrambene namirnice (Visagie i sur., 2014; Frisvad i sur., 2004; Abarca i sur., 2001). Za čak 13 vrsta unutar sekcije *Circumdati* dokazana je proizvodnja okratoksina A pri čemu se najpotentnijim proizvođačima smatraju vrste *A. ochraceus*, *A. steynii* i *A. westerdijkiae* (Visagie i sur., 2014). Okratoksin A (OTA) dokazani je karcinogen u životinja i Svjetska agencija za istraživanje raka (*engl. International Agency for Research on Cancer, IARC*) svrstala ga je u skupinu 2B kao mogući humani karcinogen (Hope i Hope, 2012). Dokazane su povišene koncetracije okratoksina A u urinu osoba koje su boravile u vodom oštećenim prostorima u odnosu na kontrolnu grupu gdje je koncentracija OTA bila ispod granice detekcije (Hooper i sur., 2009).

Aspergili iz sekcije *Flavi* prisutni su u tlu, zraku, prašini, vodi i na brojnim prehrambenim namirnicama poput plodova kikirikija, oraha, badema, lješnjaka, kakaovca, na žitaricama poput kukuruza, zobi i pšenice, na sjemenkama pamuka i suhog voća. Za 13 vrsta iz sekcije *Flavi* dokazana je sposobnost proizvodnje aflatoksina. Aflatoksin B1 (AFB1) smatra se najtoksičnijim prirodnim spojem uopće, a najznačajnijim proizvođačima smatraju se *A. flavus* i *A. parasiticus* (Frisvad i Larsen, 2015; Varga i sur., 2011). Svjetska agencija za istraživanje raka (*IARC*) svstala je aflatoksin B1 u skupinu IA karcinogena, tj. među spojeve koji su dokazano karcinogeni za ljude, zbog dokazane uzročno-posljedične veze izloženosti AFB1 i razvoja hepatocelularnog karcinoma kod ljudi. Osim karcinogenog djelovanja, aflatoksini su i mutageni, teratogeni, hepatotoksični, nefrotoksični, imaju imunosupresivno djelovanje i dovode do krvarenja u gastrointestinalnom traktu i bubrezima (Klich, 2009, Krishnan i sur., 2009).

Aspergili iz sekcije *Nigri* pokazuju široku rasprostranjenost i prisutni su na raznim supstratima uključujući tlo, žitarice, mliječne proizvode, stočnu hranu, nađeni su na raznom voću, povrću, na raznom tekstilnom materijalu i na mesnim proizvodima, a izolirani su i iz zraka unutrašnjih prostora, uključujući stanove, urede i industrijske pogone (Jakšić Despot i Šegvić Klarić, 2014; Jurjević i sur., 2012) gdje se može očekivati i povećano stvaranje dvije glavne skupine mikotoksina: fumonizina i okratoksina (Varga i sur., 2014). Dosadašnja istraživanja upućuju na povezanost fumonizina (FB) s ezofagealnim karcinomom, pulmonarnim edemom kod svinja, leukoencefalomalacijama kod konja, s karcinomom i defektom neuralne cijevi kod eksperimentalnih glodavaca, s jetrenom i bubrežnom toksičnošću te karcinomom jetre (Varga i sur., 2010; Šegvić Klarić i sur., 2007), dok je okratoksin A najpoznatiji kao nefrotoksin, no poznata su i njegova imunosupresivna, oksidativna, teratogena i karcinogena svojstva te sposobnost interferencije s metabolizmom

glukoze i s procesima koagulacije krvi. Zbog nefrotoksičnosti, izvjesna je njegova uključenost u etiologiju edemske nefropatije (Klich, 2009; Šegvić Klarić i sur., 2007).

Iako su aspergili kserofilni organizmi, značajnija proizvodnja toksičnih sekundarnih metabolita započinje kod povećane dostupnosti vode u supstratu, tj. a_w vrijednosti između 0,85 i 0,95. Takvi se uvjeti stvaraju i nakon značajnije intruzije vode, primjerice nakon poplava, nakon čega slijedi period sušenja koji pogoduje disperziji konidija i fragmenata micelija te sekundarnih metabolita koji se na njima akumuliraju, u zrak unutrašnjih prostora, a posljedično dovodi i do njihovog taloženja u prašini. Prašina nadalje pruža značajan izvor nutrijenata koji pogoduje ekstenzivnom rastu plijesni (Fog Nielsen, 2003).

1.2. POPLAVA U GUNJI 2014. GODINE

Sredinom svibnja 2014. godine u donjem je dijelu toka rijeke Save došlo do katastrofalnih poplava, najgorih u dosad zabilježenoj povijesti, a kao posljedica intenzivnih oborina uzrokovanih višednevnim zadržavanjem jake i duboke ciklone iznad jugoistočne Europe. Poplavi nezapamćenih razmjera na području istočne Hrvatske, Bosne i Hercegovine i Srbije doprinijelo je i dugotrajno, kišno razdoblje s početka 2014. godine koje je rezultiralo tlom već poprilično zasićenim vlagom.

U razdoblju od 14. do 18. svibnja 2014. godine na područnim hidrološkim postajama donje Save zabilježene su rekordne vrijednosti vodostaja i protoka kao izravna posljedica velike količine oborina u Bosni i Hercegovini i ekstremnih dotoka rijeke Bosne i rijeke Vrbasa. Povijesni maksimumi vodostaja zabilježeni su na postajama Slavonski Brod, Slavonski Šamac, Županja i Gunja. Dana 17. svibnja izmjeren je vodostaj na rijeci Savi za područje Gunje od 1173cm (dotadašnji maksimum od 690cm zabilježen je 31.12.2012.) te protok od 4625 m^3/s (u odnosu na dosadašnje maksimalno registrirane protoke od 3500 do 4000 m^3/s). Tog je dana, u neposrednoj blizini kuća, došlo do puknuća nasipa na dva mjesta, kod Rajeva Sela i Račinovaca, ugrozivši sela županjske Posavine, osobito Rajevo Selo, Račinovce i Gunju (Kuspilić i sur., 2014; http://klima.hr/razno/priopcenja/poplava_sava_2014.pdf).

S obzirom na količinu vode nakon poplava, tj. na povećanje dostupnosti vode u supstratu, očekuje se promjena u ekosustavu, osobito u sastavu plijesni u unutrašnjim prostorima u kojima ljudi borave i rade. Stoga se nameće pitanje o potencijalnoj štetnosti navedenih promjena na zdravlje pojedinaca na poplavama zahvaćenim područjima.

1.3. PLIJESNI KAO JAVNOZDRAVSTVENI PROBLEM

Procijenjeno je da je do 50% bolesti posljedica izloženosti kontaminiranom zraku u unutrašnjim prostorima pri čemu se oštećenje vodom tih prostora smatra najznačajnijim faktorom rizika. U vodom oštećenim prostorima povećava se izloženost plijesnima i njihovim metabolitima koje je moguće dokazati u krvi i urinu ljudi koji su boravili u tim prostorima. Iako postoje mnoge studije o ingestiji kao glavnom putu izloženosti, sve se više istražuje inhalacijski i transdermalni put izloženosti mikotoksinima (Ammann, 2016; Doi i Uetsuka, 2014). Inhalacija prašine kontaminirane plijesnima pogoduje povećanoj osjetljivosti sluznice dišnog sustava, a u slučaju kronične izloženosti moguća je inicijacija i progresija kroničnih upalnih bolesti u dišnom sustavu, primjerice astme, kronične opstrukcijske plućne bolesti, ali i karcinoma kao posljedice kronične upale (Karvala i sur., 2011; Hope i Simon, 2007).

Plijesni nađene u unutrašnjem okolišu jesu one koje rastu na supstratima poput građevinskog materijala, tepiha ili hrane, no ne smiju se zanemariti vrste unijete izvana unutra pri čemu se vanjski okoliš, osobito onaj u neposrednoj blizini stambenog ili radnog prostora, smatra važnim čimbenikom koji određuje sastav plijesni u unutrašnjem prostoru (Amend i sur., 2010). Taloženje plijesni iz zraka unutrašnjeg prostora predstavlja glavni izvor bioraznolikosti plijesni u prašini. Zbog ventilacije i ljudskih aktivnosti, unutrašnji je zrak u stalnom gibanju i neizbježno je paralelno odvijanje procesa taloženja i resuspendiranja čestica prašine u tim prostorima (Rintala i sur., 2012).

Kako bi se izbjegli štetni učinci za zdravlje ljudi, najvažnija je prevencija i minimizacija vlage u unutrašnjim prostorima čime se sprječava rast mikroorganizama na unutrašnjim površinama ili unutar građevinskih materijala. Učinkovita kontrola vlažnosti uključuje primjeren izbor građevinskog materijala koji će spriječiti štetnu kondenzaciju, učinkovitu ventilaciju te odgovarajući sustav grijanja. Relativnu vlažnost treba održavati ispod granice rasta plijesni i drugih mikroorganizama, tj. ispod 75%. Jednako je važno održavanje sustava za ventilaciju, grijanje i klimatizaciju kako ne bi postati izvorom kontaminacije u zatvorenom prostoru. Kontrola vlažnosti u unutrašnjim prostorima ne podrazumijeva potpunu eliminaciju vode zato što materijali koji se relativno brzo suše ne predstavljaju opasnost za zdravlje. Ukoliko do problema dođe, važna je brza remedijacija koja podrazumijeva smanjenje ili redukciju izvora vlažnost te čišćenje, tj. uklanjanje koloniziranog materijala (WHO, 2009).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Vrste roda *Aspergillus* unutar sekcija *Circumdati, Flavi* i *Nigri* potencijalno su opasne za zdravlje ljudi zbog alergijskog, invazivnog i toksičnog djelovanja u uvjetima povećane koncentracije njihovih konidija, dijelova micelija i sekundarnih metabolita u zatvorenim prostorima u kojima ljudi borave i rade.

Stoga je cilj ovoga rada istražiti bioraznolikost aspergila izoliranih iz prašine koja je prikupljena tijekom 2016. godine u Gunji te usporediti sa izolatima iz prašine s kontrolne lokacije Gornji Stupnik. Identifikacija do razine vrste provest će se na temelju analize slijedova dijela gena za kalmodulin (*CaM*). S obzirom na poznata svojstva identificiranih vrsta, specifični cilj ovoga rada je procijeniti rizik za zdravlje ljudi koji žive u prostorima povećane vlažnosti.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. PRIPREMA IZOLATA ASPERGILA ZA ANALIZU

Kemikalije i hranjive podloge:

- Medij za trajno čuvanje kultura plijesni (glicerol:voda, 1:1 v/v)
- *Czapek Yeast Extract Agar* (CYA, Difco, SAD): 10 mL Czapek koncentrat [natrijev nitrat ($NaNO_3$) 30g, kalijev klorid (KCl) 5g, magnezijev sulfat heptahidrat ($MgSO_4x7H_2O$) 5g i željezov sulfat heptahidrat ($FeSO_4x7H_2O$) 0,1g otopljeni su u 100mL destilirane vode], 1 mL otopina elemenata u tragovima [bakrov sulfat pentahidrat ($CuSO_4x5H_2O$) 0,5g i cinkov sulfat heptahidrat ($ZnSO_4x7H_2O$) 1g otopljeni su u 100mL destilirane vode], 1 g monokalijev fosfat (KH_2PO_4), 5 g kvaščev ekstrakt, 30 g saharoza i 15 g agar – otopljeni u 1 L destilirane vode. Tako priređena otopina sterilizirana je autoklaviranjem (121 °C, 15 min)
- Medij za izolaciju DNA: glukoza (10 g/L), pepton (10 g/L) i kvaščev ekstrakt (10 g/L) otopljeni u destiliranoj vodi

Uređaji:

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

Nakon odmrzavanja uzoraka aspergila (N=29) pohranjenih u mediju za trajno čuvanje kultura plijesni, provedena je inokulacija na CYA agar, a potom su uzorci inkubirani oko tri dana u mraku na 25 °C. Svaki od izolata iz čiste kulture na CYA agaru reinokuliran je u tekući hranjivi medij (medij za izolaciju DNA) te ponovno inkubiran na oko tri dana u mraku na 25 °C. Iz poraslog micelija proveden je postupak izolacije DNA.

Uzorci obrađeni u ovom radu dio su znanstveno-istraživačkog projekta (Štetni učinci pojedinačnih i kombiniranih mikotoksina *Aspergillus* vrsta – MycotoxA IP-09-2014-5982) kojega financira Hrvatska zaklada za znanost, HRZZ.

3.2. MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA *ASPERGILLUS* VRSTA

3.2.1. IZOLACIJA DNA

Kemikalije:

- Sterilni pijesak
- Otopina za lizu: natrijev N-lauril sarkozinat 20% w/v u vodi (Sigma-Aldrich, Njemačka)

- Otopina za taloženje proteina i lipida: natrijev acetat (Kemig, Zagreb, Hrvatska) 5 mol/L, pH = 5±0,02
- Otopine za taloženje i ispiranje DNA: izopropanol (Kefo d.o.o., Sisak, Hrvatska), etanol 96% v/v (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

Uređaji:

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

Na uzorcima aspergila od interesa poraslih u 1 mL tekućeg hranjivog medija (medija za izolaciju DNA) u mikrotubicama proveden je postupak izolacije DNA:

1. Centrifugiranjem (25 °C, 10 min, 16000 g) je porasli micelij izoliran od tekućeg medija koji je potom uklonjen mikropipetom. Micelij je potom ispran s 1 mL sterilne vode koja je uklonjena nakon centrifugiranja (25 °C, 10 min, 16000 g). Čisti micelij je zamrznut (-20 °C, 30 min), a potom liofiliziran kroz 24h.
2. Liza stanične strukture provedena je na tri načina: mehanički (mljevenjem micelija mikropistilom uz sterilni pijesak), kemijski (dodatkom otopine za lizu) i termički (suspenzija staničnog lizata inkubirana je u termobloku pri uvjetima 70 °C, 15 min, 400 o/min).
3. Proteini i ostaci staničnog lizata istaloženi su dodatkom Na-acetata i centrifugiranjem (25 °C, 10 min, 16000 g). DNA je ostala otopljena u nadtalogu koji je pažljivo prenesen u čiste mikrotubice.
4. Izdvojenom nadtalogu u omjeru 1:1 dodan je hladni izopropanol (-20 °C) čime je istaložena DNA. Nakon centrifugiranja (25 °C, 10 min, 16000 g), nadtalog je uklonjen.
5. Talog DNA ispran je dodatkom koncentriranog etanola koji je uklonjen nakon centrifugiranja (25 °C, 10 min, 16000 g).
6. Ostaci etanola u talogu DNA uklonjeni su sušenjem u termo-vakuum uparivaču (30 °C, 15 min, 1400 o/min).
7. DNA je resuspendirana u sterilnoj vodi.

Uspješnost izolacije DNA provjerena je gel-elektroforezom na agarozi (1%) u TAE puferu (1X) miješanjem otopine izolirane DNA s radnom otopinom boje. Detekcija DNA temelji se na fluorescenciji pod UV svjetlom valne duljine 254 nm. Korištene kemikalije i uređaji za provođenje gel-elektroforeze detaljno su opisani u potpoglavlju 3.2.2. .

3.2.2. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE, PCR

Kemikalije:

- Reakcijska smjesa za PCR: Taq reakcijski pufer (10X, 25 mM $MgCl_2$; Takara Bio SAD), smjesa polinukleotida (dNTP; 2,5 mM; Takara Bio SAD), Taq DNA polimeraza (250 U; Takara Bio SAD) i voda (čistoće za upotrebu u molekularnoj biologiji, bez nukleaza; Takara Bio SAD); uzvodna i nizvodna početnica (cmd5 i cmd6) za umnažanje dijela gena za kalmodulin (*CaM*): 5'-CCGAGTACAAGGARGCCTTC-3' (cmd5; 32,3 nmol; Metabion, Njemačka) i 5'-CCGATRGAGGTCATRACGTGG-3' (cmd6; 28,7 nmol; Metabion, Njemačka) i DNA kalup, tj. genomska DNA izolirana iz filamentoznih gljivica. Vodena otopina serumskog albumina goveda (*engl. bovine serum albumin*, BSA; Sigma-Aldrich, Njemačka) konc. 20 mg/mL po potrebi je korištena u svrhu optimizacije uvjeta PCR reakcije
- Agaroza (SeaKem® LE Agarose, Lonza, SAD)
- TAE pufer 50X sastava tris baza (40 mM), octena kiselina (20 mM) i EDTA (1 mM) u destiliranoj vodi, pH 8,3 (AccuGENE 50X; Lonza, Belgija). Radna otopina pufera (1X) priredi se razrjeđivanjem destiliranom vodom.
- Pomoćna boja za praćenje elektroforeze [*engl. loading buffer* 6X (Takara, SAD)]
- Fluorescentna boja GelStar 10,000X (Lonza, SAD). Radna otopina boje priredi se miješanjem s pomoćnom bojom (1:1000). U vodenoj otopini za gel-elektroforezu ukupno razrjeđenje flurescentne boje je 10000
- Komercijalni set za pročišćavanje izolirane DNA i PCR produkata (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel GmbH & Co., Njemačka)

Uređaji:

- Uređaj za PCR (T-100 Thermal Cycler, BioRad, SAD)
- Sustav za elektroforezu (Sub-Cell® GT Agarose Gel Electrophoresis Systems, BioRad, SAD)
- UV transiluminator (UVITEC, UK)

Otopine izoliranih DNA u sterilnoj vodi korištene su za umnažanje dijela gena *CaM* upotrebom početnica cmd5 i cmd6 u svrhu identifikacije vrsta. Reakcijski ciklus opisan je u tablici 1.

Tablica 1. Reakcijski ciklus PCR za *CaM*

REAKCIJSKI KORACI	**TEMPERATURA/°C**	**VRIJEME**	**BROJ CIKLUSA**
Inicijalna denaturacija DNA	95	5 min	1
Denaturacija DNA	95	20 s	
Vezanje početnica	52	20 s	
Elongacija	72	40 s	10 (od koraka 2 do 4)
Denaturacija	95	20 s	
Vezanje početnica	56	20 s	
Elongacija	72	40 s	25 (od koraka 5 do 7)
Završna elongacija	72	5 min	1

Sastavnice reakcijske smjese za PCR navedene su podnaslovu ***Kemikalije*** ovog potpoglavlja, a njihove koncentracije prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. Koncentracije sastavnica PCR reakcijske smjese

SASTAVNICA	**KONCENTRACIJA/25 µL**
Taq reakcijski pufer	1X
dNTP	200 µM
cmd5	0,2 µM
cmd6	0,2 µM
BSA	0-1,2 µg/µL
Taq DNA polimeraza	1 U
Genomska DNA	varijabilno ≈ 40 pg/µL
Voda za PCR (do 25 µL)	

Uspješnost PCR reakcije također je provjeravana gel-elektroforezom temeljenom na fluorescenciji PCR produkta (DNA fragment oko 500 parova baza – pb).

Prije sekvenciranja, PCR produkti su pročišćeni kroz kolone prema uputama proizvođača: dodatkom otopine kaotropne soli, PCR produkt ostaje vezan za silikagel membranu kolone, dok ostali sastojci, poput ostataka dNTP, početnica, dimera početnica, BSA i dr., prolaze kroz

membranu nakon centrifugiranja (1 min, 11000 g). Silikagel membrana ispire se etanolom, provodi se centrifugiranje (1 min, 11000 g) i sušenje u termo-vakuum uparivaču (30 °C, 10 min, 1400 o/min), a zatim se pročišćeni PCR produkt ispire s membrane dodatkom Tris-EDTA pufera (pH 8,5) na sobnoj temperaturi. Sekvenciranje je provedeno Sangerovom dideoksi metodom u tvrtki Macrogen Inc. (Amsterdam, Nizozemska).

3.2.3. ANALIZA GENSKIH SLIJEDOVA

Sekvenciranjem određeni nukleotidni slijedovi dijela *CaM* gena sravnjeni su korištenjem MUSCLE analize (*engl.MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation*; Edgar, 2004) programskog paketa MEGA 7.0 (Kumar i sur., 2016). Homologija genskih slijedova ispitana je pretragom sličnosti nukleotid-nukleotid dostupnoj na internetskoj stranici *National Center for Biotechnology Information* (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. BIORAZNOLIKOST VRSTA RODA *ASPERGILLUS* IZ SEKCIJA *CIRCUMDATI, FLAVI* I *NIGRI* U UZORCIMA PRAŠINE NA POJEDINIM LOKACIJAMA

Koncept identifikacije vrsta aspergila temelji se na tzv. polifaznom pristupu, koji uz opis makro- i mikromorfoloških karakteristika, uključuje i molekularne metode identifikacije analizom karakterističnih genskih markera DNA. Kao ključni identifikacijski marker *Aspergillus* vrsta, koristi se ITS (*engl.Internal transcribed spacer*) – analiza slijeda nukleotida ponavljajućih slijedova nekodirajuće DNA smještenih između male i velike podjedinice ribosomske RNA (rRNA). Analizom slijedova nukleotida ITS ne postiže se razlikovanje pojedinih vrsta zbog nedostatne varijabilnosti, stoga je nužno korištenje sekundarnih markera, poput analize slijeda dijela gena za kalmodulin (*CaM*) koji je korišten i u ovom radu s ciljem identifikacije vrsta unutar sekcija (Samson i sur., 2014).

Prikupljeni izolati aspergila (N = 29) iz prašine pridruženi su odgovarajućoj vrsti, lokaciji uzorkovanja (obnovljene i neobnovljene lokacije u Gunji te kontrolne lokacije u Gornjem Stupniku) i periodu uzorkovanja (veljača (II – 16) i rujan (IX – 16) 2016. godine) te su rezultati prikazani u tablici 3.

Izolati aspergila iz kućne prašine na svim trima lokacijama, raspoređeni su u tri sekcije: *Circumdati*, *Flavi* i *Nigri*. Ukupno 9/29 izolata prikupljeno je na obnovljenim lokacijama u Gunji, 8/29 na neobnovljenim lokacijama u Gunji i njih 12/29 na kontrolnim lokacijama u Gornjem Stupniku. Pod obnovljenim lokacijama podrazumijevaju se obnovljene kuće i škole, a pod neobnovljenim lokacijama neobnovljene kuće u Gunji.

Većina izolata aspergila prikupljena je tijekon rujna 2016. godine (19/29), dok je manji broj izolata iz veljače iste godine (10/29). Za većinu rodova plijesni, pa tako i za rod *Aspergillus*, porast u vanjskom zraku očekuje se tijekom ljetnih i jesenskih mjeseci kada se glavnim izvorom bioraznolikosti plijesni u unutrašnjim prostorima smatra upravo vanjski okoliš – glavnina materijala se izvana unutra prenosi zrakom, ponajviše kroz otvorene prozore i vrata, a mikroorganizmi se unose i zemljom, na dijelovima biljaka i drugih čestica zadržanih na cipelama i odjeći ljudi koji ulaze u te prostore, kao i na dlaki kućnih ljubimaca. Kvalitativni sastav prašine u takvim uvjetima najviše definira taloženje čestica unijetih iz vanjskog okoliša (Rintala i sur., 2012; Koch i sur., 2000). Stoga je ovakva distribucija, obzirom na period uzorkovanja, očekivana.

Tablica 3. Identificirani izolati aspergila iz prašine

SEKCIJA	VRSTA	MFBF	PERIOD UZORKOVANJA	LOKACIJA
Cremei	*A.dimorphicus*	AC 12398	IX – 16	Gornji Stupnik, kontrolne lokacije
Circumdati	*A.ochraceus*	AC 12210	II – 16	Gornji Stupnik, kontrolne lokacije
Circumdati	*A.sclerotiorum*	AC 12208	II – 16	Gornji Stupnik, kontrolne lokacije
Circumdati	*A.ochraceus*	AC 12413	IX – 16	Gornji Stupnik, kontrolne lokacije
Circumdati	*A.ochraceus*	AC 12404	IX – 16	Gunja, neobnovljene lokacije
Circumdati	*A.westerdijkiae*	AC 12408	IX – 16	Gunja, obnovljene lokacije
Flavi	*A.flavus*	AF 12206	II – 16	Gornji Stupnik, kontrolne lokacije
Flavi	*A.flavus*	AF 12140	II – 16	Gunja, obnovljene lokacije
Flavi	*A.flavus*	AF 12403b	IX – 16	Gunja, neobnovljene lokacije
Flavi	*A.flavus*	AF 12405	IX – 16	Gunja, neobnovljene lokacije
Flavi	*A.flavus*	AF 12398	IX – 16	Gunja, obnovljene lokacije
Flavi	*A.flavus*	AF 12404	IX – 16	Gunja, neobnovljene lokacije
Nigri	*A.welwitschiae*	AN 12137	II – 16	Gunja, obnovljene lokacije
Nigri	*A.tubingensis*	AN 12209	II – 16	Gornji Stupnik, kontrolne lokacije
Nigri	*A.tubingensis*	AN 12140	II – 16	Gunja, obnovljene lokacije
Nigri	*A.tubingensis*	AN 12138	Ii - 16	Gunja, obnovljene lokacije
Nigri	*A.welwitschiae*	AN 12208	II – 16	Gornji Stupnik, kontrolne lokacije
Nigri	*A.tubingensis*	AN 12136	II – 16	Gunja, obnovljene lokacije
Nigri	*A.welwitschiae*	AN 12399	IX – 16	Gunja, obnovljene lokacije
Nigri	*A.welwitschiae*	AN 12405	IX – 16	Gunja, neobnovljene lokacije
Nigri	*A.welwitschiae*	AN 12413	IX – 16	Gornji Stupnik, kontrolne lokacije
Nigri	*A.tubingensis*	AN 12411	IX – 16	Gornji Stupnik, kontrolne lokacije
Nigri	*A.tubingensis*	AN 12403b	IX - 16	Gunja, neobnovljene lokacije
Nigri	*A.tubingensis*	AN 12414	IX – 16	Gornji Stupnik, kontrolne lokacije
Nigri	*A.welwitschiae*	AN 12412A	IX – 16	Gornji Stupnik, kontrolne lokacije
Nigri	*A.tubingensis*	AN 12400	IX – 16	Gunja, obnovljene lokacije
Nigri	*A.tubingensis*	AN 12410	IX – 16	Gornji Stupnik, kontrolne lokacije
Nigri	*A.welwitschiae*	AN 12406	IX – 16	Gunja, neobnovljene lokacije
Nigri	*A.luchuensis*	AN 12404	IX – 16	Gunja, neobnovljene lokacije

Najveća bioraznolikost utvrđena je među izolatima aspergila prikupljenih na kontrolnim lokacijama u Gornjem Stupniku gdje je identificirano 6 različitih vrsta iz 3 sekcije: *Circumdati* (*A. ochraceus, A. sclerotiorum* te *A. dimorphicus,* vrsta koja je izdvojena iz sekcije *Circumdati* i svrstana u sekciju *Cremei*), *Flavi* (*A. flavus*) i *Nigri* (*A. welwitschiae* i *A. tubingensis*). Potom slijede izlolati s neobnovljenih lokacija u Gunji među kojima je identificirano 5 različitih vrsta: sekcija *Circumdati* (*A. ochraceus*), sekcija *Flavi* (*A. flavus*) i sekcija *Nigri* (*A. welwitschiae*, *A. tubingensis* i *A. luchuensis*). Najmanja bioraznolikost utvrđena je među izolatima prikupljenim u prašini na obnovljenim lokacijama u Gunji (4 različite vrste): sekcija *Circumdati* (*A. westerdijkiae*), sekcija *Flavi* (*A. flavus*) i sekcija *Nigri* (*A. welwitschiae* i *A. tubingensis*).

4.2. ASPERGILI IZ SEKCIJE *CIRCUMDATI*

Od ukupno 29 izolata, 6 ih je identificirano kao vrste iz sekcije *Circumdati*. Najveći broj izolata identificiran je kao *A. ochraceus* (3/6), po jedan izolat identificificiran je kao *A. sclerotiorum* i jedan kao *A. westerdijkiae*. Zbog značajne morfološke sličnosti s vrstama iz sekcije *Circumdati*, jednom je izolatu tek nakon molekularne analize utvrđena pripadnost sekciji *Cremei*. Izolat je identificiran kao vrsta *A. dimorphicus*. Ta je vrsta srodna vrsti *A. wentii* koja je smještena u sekciju *Cremei* (Varga i sur., 2000; Peterson, 1995). Sekcija *Cremei* obuhvaća 14 vrsta koje su manjeg značaja za ljude iako određene vrste proizvode mikotoksine poput sterigmatocistina, patulina i emodina. Najčešće su izolirane iz tla, rijetko se nalaze u unutrašnjim prostorima ili medicinskim materijalima (Hubka i sur., 2016).

Najveći je broj izolata aspergila iz sekcije *Circumdati* prikupljen na kontrolnim lokacijama u Gornjem Stupniku (4/6): 2 su izolata identificirana kao *A. ochraceus,* 1 kao *A. sclerotiorum,* a u Gornjem Stupniku prikupljen je i izolat koji je naknadno dodijeljen sekciji *Cremei*. Jedan od šest izolata navedene sekcije uzorkovan je na obnovljenim lokacijama u Gunji te je identificiran kao *A. westerdijkiae*. S neobnovljenih lokacija u Gunji također je samo jedan izolat identificiran kao pripadnik sekcije *Circumdati,* a radi se o vrsti *A. ochraceus*.

Veći je broj izolata uzorkovan u rujnu 2016. godine (4/6), dok su u veljači iste godine uzorkovana 2 izolata.

Među izolatima dodijeljenim sekciji *Circumdati* posebno zabrinjava prisutnost vrsta *A. ochraceus, A. sclerotiorum* i *A. westerdijkiae* koji se smatraju značajnijim proizvođačima potentnog mikotoksina, okratoksina A (Visagie i sur., 2014). Većina vrsta iz sekcije *Circumdati* proizvodi više toksina istovremeno. Tako na primjer, uz prethodno spomenute mikotoksine, *A. ochraceus* i *A. westerdijkiae* proizvode i asperloksine i aspergamide, a

interakcija tih mikotoksina nije u potpunosti poznata i potencijalno je opasna za zdravlje ljudi (Frisvad i sur., 2004). Uz ingestiju kao glavni put izloženosti, vrlo je opasna inhalacija OTA zbog njegove učinkovite apsorpcije kroz pluća i visoke bioraspoloživosti neposredno nakon inhalacije (Hope i Hope, 2012). Osim samih mikotoksina, plijesni, u zrak unutrašnjeg i vanjskog okoliša, otpuštaju velike količine konidija i aerogenih fragmenata hifa koji predstavljaju značajan izvor aeroalergena i doprinose razvoju ili pogoršanju kroničnih respiratornih bolesti, osobito alergija poput fungalnog rinitisa, hipersenzitivne pneumonije i/ili astme (Šegvić Klarić i sur., 2015).

Kontaminacija zraka vrstama navedene sekcije, kao i njihovim toksičnim metabolitima, povezuje se s raznim bolestima poput akutnog bubrežnog zatajenja, fokalne segmentalne glomeruloskleroze, onikomikoza, alergijske bronhopulmonalne aspergiloze, otomikoza (Hope i Hope, 2012; Zottii sur., 2010; Harima i sur., 2004; Novey i Wells, 1978) i brojnih drugih te je vrlo važno odrediti kako koncentraciju plijesni u zatvorenim prostorima u kojima ljudi borave, tako i koncentraciju njihovih toksičnih metabolita.

4.3. ASPERGILI IZ SEKCIJE *FLAVI*

Od ukupno 29 izolata aspergila, 6 ih je identificirano kao pripadnici sekcije *Flavi*, a kao jedina vrsta iz navedene sekcije pojavila se vrsta *A. flavus*. Na neobnovljenim lokacijama u Gunji tri su izolata identificirana kao *A. flavus*, na obnovljenim lokacijama u Gunji dva su izolata pripadnici navedene sekcije, a na kontrolnim lokacijama u Gornjem Stupniku samo je jedan izolat potvrđen kao vrsta *A. flavus*.

Ukupno 4 od 6 izolata iz sekcije *Flavi* uzorkovana su u rujnu 2016. godine, a 2 izolata od ukupno 6 prikupljena su u veljači 2016. god.

Ovi su rezultati u skladu s dosadašnjim istraživanjima prema kojima je upravo *A. flavus* najzastupljenija vrsta iz sekcije *Flavi*. Zbog male veličine spora, sposobnosti rasta na 37 °C i vrlo učinkovite produkcije mikotoksina (osobito aflatoksina), spomenuta vrsta predstavlja rizik za zdravlje ljudi i životinja (Varga i sur., 2011). Iako primarno zastupljeni u tropskim i suptropskim područjima, aflatoksinogeni sojevi *A. flavus* sve su učestaliji u područjima s umjerenom klimom zbog aktualnih klimatskih promjena koje utječu na ekspresiju gena uključenih u biosintezu AFB1 – nagle promjene vlažnosti zraka (sve češća sušna razdoblja i poplave), porast temperature i koncentracije CO_2 (Medina i sur., 2014).

Vrsta *A. flavus* je, uz *A. parasiticus*, najznačajniji proizvođač AB1, jednog od najtoksičnijih prirodnih spojeva. Najistraženiji je učinak AFB1 na jetru – uzrokuje teško oštećenje jetre praćeno mogućom žuticom, hepatitisom i smrtnim ishodom. Uz to, dokazano je genotoksičan,

karcinogen i teratogen za ljude i životinje (Perrone i sur., 2014). Iako se mehanizmi hepatokarcinogeneze povezuju s ingestijom kontaminirane hrane, provode se istraživanja toksičnosti AFB1 po inhalaciji aerogenih mikročestica proizvođača AFB1. Uzročno-posljedična veza dokazana je i kod izloženosti aflatoksinu B1 i razvoja karcinoma pluća kod radnika u Nizozemskoj zaposlenih u obradi kikirikija i sjemenki lana kontaminiranih aflatoksinogenim vrstama (Hayes i sur.,1984). Između 15 i 20% slučajeva invazivne aspergiloze uzrokovano je vrstom *A. flavus*, većinom kod imunokompromitiranih bolesnika. Slično kao kod infekcije vrstom *A. fumigatus* (najčešćim uzročnikom invazivne aspergiloze), manifestacije bolesti dišnog sustava očituju se kao aspergilom, invazivna pulmonalna aspergiloza ili traheobronhijalna aspergiloza. U *in vitro* i *in vivo* studijama pokazano je da i površinski vezani i egzoantigeni vrste *A. flavus* imaju sposobnost indukcije specifičnih monoklonskih protutijela i stanične imunosti (Krishnan i sur., 2009). Aspergili iz sekcije *Flavi* uzročnici su i drugih infekcija kod ljudi poput keratitisa, kutanih aspergiloza, sinusitisa i otomikoza (Manikandan i sur., 2010; Klich, 2009). Alergeni potencijal vrsta roda *Aspergillus* ispitan je kod brojnih vrsta (poput *A. fumigatus, A. flavus, A. niger* i dr.) te je utvrđena križna reaktivnost između određenih alergenih proteina između različitih vrsta roda *Aspergillus* (Vermani i sur., 2011). Zbog toga je važno poznavanje kvalitativnog sastava plijesni u prostoru u kojem ljudi borave i rade, osobito nakon ekstremnih promjena klimatskih uvjeta kada se očekuje promjena u sastavu i koncentraciji plijesni.

4.4. ASPERGILI IZ SEKCIJE *NIGRI*

Od ukupno 29 izolata aspergila, najveći broj (17/29) pripada sekciji *Nigri*. Na temelju slijedova dijela gena za *CaM*, većina izolata identificirana je kao vrste *A. tubingensis* (9/17) i *A. welwitschiae* (7/17). Nakon provedene identifikacije, za jedan izolat iz neobnovljene lokacije u Gunji, utvrđeno je da se radi o vrsti *A. luchuensis* (1/17).

Najveći broj izolata aspergila iz sekcije *Nigri* prikupljen je na kontrolnim lokacijama u Gornjem Stupniku (7/17) i to vrste *A. tubingensis* (4/7) i *A.welwitschiae* (3/7). Na obnovljenim lokacijama u Gunji 6 je izolata identificirano kao pripadnici sekcije *Nigri*: *A. tubingensis* (4/6) i *A. welwitschiae* (2/6). Na neobnovljenim lokacijama 4 izolata pripadaju navedenoj sekciji: *A. welwitschiae* (2/4), *A. tubingensis* (1/4) te *A. luchuensis* (1/4).

Iako morfološki vrlo bliska vrstama *A. niger* i *A. tubingensis*, vrsta *A. luchuensis* molekularnom analizom jasno se izdvaja kao zasebna vrsta. Većina sojeva *A. luchuensis* proizvodi antafumicin i djelomično karakteriziran metabolit nazvan „luchuensin“, asperazin, atromentin, funalenon, piranonigrin A i povremeno tenzidol B. Ni jedan od sekundarnih

metabolita ne smatra se toksičnim za sisavce, a za ni jedan od sojeva nije dokazana proizvodnja fumonizina i okratoksina. Zbog toga se *A. luchuensis* smatra sigurnim u fermentacijskim postupcima proizvodnje hrane i pića, a osobito često se za tu namjenu koristi u istočnoj Aziji (Hong i sur., 2013).

Ukupno 11 od 17 izolata prikupljeno je u rujnu 2016. god., dok je 6 izolata (6/17) iz veljače iste godine.

Novija istraživanja sugeriraju da vrsta *A. niger* nije najzastupljenija vrsta među crnim aspergilima. Naime, razvoj molekularnih metoda identifikacije aspergila omogućio je razlikovanje visoko srodnih vrsta *A. niger* i *A. welwitschiae*. Među izolatima obuhvaćenim ovim istraživanjem najučestalijima su se pokazale vrste *A. tubingensis* i *A. welwitschiae*, dok ni jedan izolat crnih aspergila nije identificiran kao *A. niger*. Pojavnost određenih vrsta crnih aspergila u unutrašnjem okolišu slična je na prostorima sličnih klimatskih uvjeta. *A. welwitschiae*, uz *A. niger* i *A. carbonarius*, najčešća je vrsta iz sekcije *Nigri* u podnebljima umjerene klime. Ova je vrsta jedna od najpotentnijih proizvođača OTA i FB i kao takva značajan je čimbenik rizika za izložene pojedince (Varga i sur., 2014). *A. tubingensis* pokazao se kao oportunistički patogen koji uzrokuje teške invazivne infekcije u imunokompromitiranih osoba, primjerice u pacijenata s osteomijelitisom (Bathoorn i sur., 2013).

Crni aspergili značajni su humani i animalni patogeni i smatraju se jednim od najznačajnijih uzročnika invazivne aspergiloze, otomikoze te alergijskih reakcija, posebno tipa III i IV (Szigeti i sur., 2012). Također je dokazano da, ovisno o koncentraciji i vremenu izloženosti, okratoksin A i fumonizini dovode do povećanja lipidne peroksidacije, smanjenja antioksidativnog potencijala stanice i smanjene vijabilnosti u bubrežnim epitelnim stanicama svinje, PK15 stanicama (Šegvić Klarić i sur., 2007).

5. ZAKLJUČCI

Sukladno rezultatima istraživanja, zaključci ovoga rada su sljedeći:

- Među odabranim aspergilima iz sekcija *Circumdati*, *Flavi* i *Nigri* prikupljenim tijekom 2016. godine, samo su aspergili iz sekcije *Flavi* bili učestaliji u prašini prikupljenoj u Gunji i to na neobnovljenim lokacijama.
- Većina aspergila iz sve tri sekcije izolirana je iz prašine prikupljene u ljetnom periodu.
- Veća bioraznolikost uočena je među izolatima iz sekcija *Circumdati* odnosno *Nigri* gdje su identificirane po 3 različite vrste: *A. ochraceus*, *A. sclerotiorum*, *A. westerdijkiae* (*Circumdati*) te *A. tubingensis*, *A. welwitschiae* i *A. luchuensis* (*Nigri*), dok su svi izolati iz sekcije *Flavi* identificirani kao vrsta *A. flavus*.
- Vrste iz sekcije *Nigri*, *A. tubingensis* i *A. welwitschiae*, pokazale su se kao najzastupljenije sa 9/29 odnosno 7/29 izolata, a slijedi ih vrsta iz sekcije *Flavi*, *A. flavus* (6/29).
- Precizniju procjenu štetnosti po zdravlje ljudi, osim kvalitativnog sastava aeromikote, omogućit će podaci o koncentraciji plijesni u prašini te ispitivanje mikotoksinogenog potencijala identificiranih vrsta što je dio ostalih istraživanja obuhvaćenih znanstvenim projektom MycotoxA (HRZZ, IP-09-2014-5982).

6. LITERATURA

Abarca ML, Accensi F, Bragulat MR, Cabañes FJ. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp.. *Journal of food protection*, 2001, 64, 903–906.

Amend AS, Seifert KA, Samson R, Bruns TD. Indoor fungal composition is geographically patterned and more diverse in temperate zones than in the tropics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107, 13748–13753.

Ammann HM. Inhalation exposure and toxic effects of mycotoxins. U: Biology of microfungi. Li DW, urednik, Fungal biology. Springer, Cham, 2016, 495-523.

Bathoorn E, Escobar Salazar N, Sepehrkhouy S, Meijer M, De Cock H, Haas PJ. Involvement of the opportunistic pathogen *Aspergillus tubingensis* in osteomyelitis of the maxillary bone: a case report. *BMC Infectious Diseases*, 2013, 13, 59.

Doi K, Uetsuka K. Mechanisms of mycotoxin-induced dermal toxicity and tumorigenesis through oxidative stress-related pathways. *J Toxicol Pathol*, 2014, 27, 1-10.

Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acidc Res*, 2004, 32, 1792-1797.

Fog Nielsen K. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genet Biol*, 2003, 39, 103-117.

Frisvad JC, Frank JM, Houbraken J, Kuijpers A, Samson RA. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in mycology*, 2004, 50, 23-43.

Frisvad JC, Larsen TO. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 2015, 99, 7859–7877.

Frisvad JC. Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species. *Frontiers in microbiology*, 2014, 5, 773.

Hayes RB, van Nieuwenhuize JP, Raatgever JW, Ten Kate FJW. Aflatoxin exposures in the industrial setting: An epidemiological study of mortality. *Food Chem Toxicol*, 1984, 22, 39-43.

Harima N, Inoue T, Kubota T, Okada O, Ansai S, Manabe M, Ichinoe M, Kasai T. A case of otomycosis caused by *Aspergillus sclerotiorum*. *The Journal of dermatology*, 2004, 31, 949–950.

Hong SB, Lee M, Kim DH, Varga J, Frisvad JC, Perrone G, Gomi K, Yamada O, Machida M, Houbraken J, Samson RA. *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in East Asia. *PloS One*, 2013, 8, e63769.

Hooper D, Bolton V, Guilford F, Straus D. Mycotoxin detection in human samples from patients exposed to environmental molds. *International journal of molecular sciences*, 2009, 10, 1465–1475.

Hope AP, Simon RA. Excess dampness and mold growth in homes: an evidence-based review of the aeroirritant effect and its potential causes. *Allergy Asthma Proc*, 2007, 28, 262-270.

Hope JH, Hope BE. A Review of the diagnosis and treatment of ochratoxin A inhalational exposure associated with human illness and kidney disease including focal segmental glomerulosclerosis. *Journal of Environmental and Public Health*, 2012, 2012, 1–10.

Hubka V, Nováková A, Samson RA, Houbraken J, Frisvad JC, Sklenář F, Varga J, Kolařík M. *Aspergillus europaeus* sp. nov., a widely distributed soil-borne species related to *A. wentii* (section *Cremei*). *Plant Systematics and Evolution*, 2016, 302, 641-650.

Jakšić Despot D, Šegvić Klarić M. A year-round investigation of indoor airborne fungi in Croatia. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 2014, 65, 209–218.

Jurjević Z, Peterson SW,Stea G, Solfrizzo M, Varga J, Hubka V, Perrone G. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from indoor air. *IMA fungus*, 2012, 3, 159–173.

Karvala K, Toskala E, Luukkonen R, Uitti J, Lappalainen S, Nordman H. Prolonged exposure to damp and moldy workplaces and new-onset asthma. *Int Arch Occup Environ Health*, 2011, 84, 713-721.

Klich MA. Health effects of *Aspergillus* in food and air. *Toxicology and Industrial Health*, 2009, 25, 657–667.

Klich MA. Identification of clinically relevant aspergilli. *Med Mycol*, 2006, 44, 127-131.

Koch A, Heilemann KJ, Bischof W, Heinrich J, Wichmann HE. Indoor viable mold spores-a comparison between two cities, Erfurt (eastern Germany) and Hamburg (western Germany). *Allergy*, 2000, 55, 176-180.

Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. *Mycoses*, 2009, 52, 206–222.

Kumar S, Stecher G, and Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 2016, 33, 1870-1874.

Kuspilić N, Oskoruš D, Vujnović T. Katastrofalna poplava Save i poplavni rizici. *Građevinar*, 2014, 66, 653-661.

Manikandan P, Varga J, Kocsubé S, Revathi R, Anita R, Dóczi I, Németh TM, Narendran V, Vágvölgyi C, Bhaskar M, Manoharan C, Samson RA, Kredics L. Keratitis caused by the recently described new species *Aspergillus brasiliensis*: two case reports. *Journal of MedicalCase Reports*, 2010, 4, 68.

Medina A, Rodriguez A, Magan N. Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production. *Frontiers in microbiology*, 2014, 348, 1-7.

Novey HS, Wells ID. Allergic bronchopulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus ochraceus. American journal of clinical pathology*, 1978, 70, 840–843.

Perrone G, Gallo A, Logrieco AF. Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Europe in relation to the management of aflatoxin risk. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 377, 1-5.

Peterson SW. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* sections *Cremei* and *Wentii*, based on ribosomal DNA sequences. *Mycological Research*, 1995, 99, 1349-1355.

Pitt JI, Hocking AD. Fungi and food spoilage. Boston, MA, Springer US, 2009.

Rintala H, Pitkäranta M, Täubel M. Microbial communities associated with house dust. *Advances in applied microbiology*, 2012, 78, 75-120.

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.

Stoljetna poplava na donjem toku rijeke Save, 2014, http://klima.hr/razno/priopcenja/poplava_sava_2014.pdf, pristupljeno 15.7.2018.

Szigeti G, Kocsubé S, Dóczi I, Bereczki L, Vágvölgyi C, Varga J. Molecular identification and antifungal susceptibilities of black *Aspergillus* isolates from otomycosis cases in Hungary. *Mycopathologia*, 2012, 174, 143–147.

Šegvić Klarić M, Pepeljnjak S, Domijan AM, Petrik J. Lipid peroxidation and glutathione levels in porcine kidney PK15 cells after individual and combined treatment with fumonisin B1, beauvericin and ochratoxin A. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2007, 100, 157–164.

Šegvić Klarić M, Jakšić Despot D, Kopjar N, Rašić D, Kocsubé S, Varga J, Peraica M. Cytotoxic and genotoxic potencies of single and combined spore extracts of airborne OTA-producing and OTA-non-producing Aspergilli in Human lung A549 cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 120, 206-214.

Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*, 1993, 10, 512-526.

Varga J, Frisvad JC, Samson RA. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in mycology*, 2011a, 69, 57–80.

Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Baranyi N, Vágvölgyi C, Jakšić Despot D, Magyar D, Meijer M, Samson RA, Šegvić Klarić M. Occurrence of black Aspergilli in indoor environments of six countries. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 2014, 65, 219–223.

Varga J, Tóth B, Rigó K, Téren J, Hoekstra RF, Kozakiewicz Z. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* section *Circumdati* based on sequences of the internal transcribed spacer regions and the 5.8 S rRNA gene. *Fungal Genetics and Biology*, 2000, 30, 71–80.

Varga J, Kocsubé S, Suri K, Szigeti G, Szekeres A, Varga M, Tóth B, Bartók T. Fumonisin contamination and fumonisin producing black Aspergilli in dried vine fruits of different origin. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 143, 143–149.

Vermani M, Vijayan VK, Menon B, Kausar MA,Agarwal MK. Physico-chemical and clinico-immunologic studies on the allergenic significance of *Aspergillus tamarii*, a common airborne fungus. *Immunobiology*, 2011, 216, 393–401.

Visagie CM, Varga J, Houbraken J, Meijer M, Kocsubé S, Yilmaz N, Fotedar R, Seifert KA, Frisvad JC, Samson RA. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow Aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Studies in mycology*, 2014, 78, 1–61.

World Health Organization, WHO. WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould, WHO Guidelines for Indoor Air Quality, 2009.

Zotti M, Machetti M, Perotti M, Barabino G, Persi A. A new species, *Aspergillus persii* , as an agent of onychomycosis. *Medical Mycology*, 2010, 48, 656–660.

7. SAŽETAK

Sredinom svibnja 2014. godine, kao posljedica intenzivnih oborina uzrokovanih višednevnim zadržavanjem jake i duboke ciklone iznad jugoistočne Europe te dugotrajnog kišnog razdoblja s početka iste godine, došlo je do nezapamćenih poplava čije su se posljedice osobito odrazile na područje Gunje. Povećanjem dostupnosti vode u supstratu, tj. a_w vrijednosti, stvoreni su uvjeti koji pogoduju širenju konidija i fragmenata micelija plijesni te njihovih mikotoksina u zrak unutrašnjih prostora, a taloženjem dolazi do njihovog nakupljanja u prašini. Zbog alergijskog, invazivnog i toksičnog potencijala, opravdana je zabrinutost zbog prisutnosti aspergila iz sekcija *Circumdati, Flavi* i *Nigri* u uzorcima prašine te se postavlja pitanje njihovog utjecaja na zdravlje ljudi koji u tim prostorima borave i rade.

Izolati aspergila iz prašine (N = 29) koji su prikupljeni tijekom zimskog i ljetnog perioda uzorkovanja u 2016. godini, identificirani su do razine vrste na temelju analize slijedova dijela gena za kalmodulin (*CaM*).

Identificirano je ukupno osam različitih vrsta aspergila: sekcija *Circumdati* (*A. ochraceus*, N = 3; *A. sclerotiorum*, N = 1; *A. westerdijkiae*, N = 1), sekcija *Flavi* (*A. flavus*, N = 6) i sekcija *Nigri* (*A. tubingensis*, N = 9; *A. welwitschiae*, N = 7; *A. luchuensis*, N = 1). Jedan izolat koji je po morfološkim karakteristikama bio sličan aspergilima iz sekcije *Circumdati*, nakon molekularne analize, identificiran je kao vrsta *A. dimorphicus* iz sekcije *Cremei*.

Neznatno veća bioraznolikost utvrđena je među izolatima aspergila s kontrolnih lokacija (6 različitih vrsta) dok su izolati iz poplavom pogođenih područja identificirani kao 5 različitih vrsta (neobnovljene lokacije), odnosno 4 različite vrste (obnovljene lokacije).

Zabrinjava činjenica da su najzastupljenije vrste izolirane iz prašine (*A. tubingensis, A. welwitschiae* i *A. flavus*) proizvođači mikotoksina okratoksina A, fumonizina i aflatoksina B1. Obzirom na njihova toksična svojstva, postoji opravdani rizik za zdravlje izloženih ljudi. Preciznijoj procjeni izloženosti ljudi aspergilima iz prašine te s njima povezanim posljedicama na ljudsko zdravlje doprinijet će daljnja istraživanja koja obuhvaćaju određivanje koncentracije aspergila u prašini, profila sekundarnih metabolita identificiranih aspergila te ispitivanja toksičnosti *in vitro* i *in vivo*.

KLJUČNE RIJEČI: prašina, poplava, *CaM, Circumdati, Flavi, Nigri*

8. SUMMARY

In the middle of May 2014, as a consequence of the rainfall caused by the retention of strong and deep cyclone over Southeast Europe for several days and the prolonged rainy season from the beginning of the same year, unprecedented floods occurred, the consequences of which were particularly pronounced in the Gunja area. An increase in the availability of water in the substrate (a_w) created favorable conditions for spreading of the conidia and mycelial fragments of molds and their mycotoxins in the indoor air and precipitation resulted in their deposition in the dust. Because of the allergic, invasive and toxic potential, concerns about the presence of Aspergilli from the *Circumdati*, *Flavi* and *Nigri* sections in dust samples are justified, which raises the issue of their impact on the health of people living and working in these areas.

Aspergilli of interest (N = 29) were isolated from dust collected during winter and summer of 2016 and identified to the species level based on partial calmodulin gene sequences (*CaM*).

The analysis resulted in eight different species of Aspergilli: *A. ochraceus*, N = 3; *A. sclerotiorum*, N = 1; *A. westerdijkiae*, N = 1 (section *Circumdati*), *A. flavus*, N = 6 (section *Flavi*) and *A. tubingensis*, N = 9; *A. welwitschiae*, N = 7 and *A. luchuensis*, N = 1 (section *Nigri*). One isolate resambled morphological features of the section *Circumdati* was identified to *A. dimorphicus*, a species assigned to the section *Cremei*.

Slightly higher biodiversity of dustborne Aspergilli was found among the isolates from control locations (6 different species), while the isolates from flood affected area were identified to five (unrepaired houses) and four (repaired houses).

A worrying fact is that the most common types of dust isolates (*A. tubingensis*, *A. welwitschiae* and *A. flavus*) are producers of mycotoxins ochratoxin A, fumonisins and aflatoxin B1. Considering their toxic properties there is a possible health threat to exposed people. These effects will be further elucidated by ongoing studies concerning concentrations of dustborne Aspergilli, their profile of secondary metabolites as well as *in vitro* and *in vivo* toxicity assays.

KEY WORDS: dust, flood, *CaM*, *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri*

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

IDENTIFIKACIJA ASPERGILA IZ SEKCIJA *CIRCUMDATI, FLAVI* I *NIGRI* U PRAŠINI NAKON POPLAVE

Jelena Geček

SAŽETAK

Sredinom svibnja 2014. godine, kao posljedica intenzivnih oborina uzrokovanih višednevnim zadržavanjem jake i duboke ciklone iznad jugoistočne Europe te dugotrajnog kišnog razdoblja s početka iste godine, došlo je do nezapamćenih poplava čije su se posljedice osobito odrazile na područje Gunje. Povećanjem dostupnosti vode u supstratu, tj. a_w vrijednosti, stvoreni su uvjeti koji pogoduju širenju konidija i fragmenata micelija plijesni te njihovih mikotoksina u zrak unutrašnjih prostora, a taloženjem dolazi do njihovog nakupljanja u prašini. Zbog alergijskog, invazivnog i toksičnog potencijala, opravdana je zabrinutost zbog prisutnosti aspergila iz sekcija *Circumdati*, *Flavi* i *Nigri* u uzorcima prašine te se postavlja pitanje njihovog utjecaja na zdravlje ljudi koji u tim prostorima borave i rade. Izolati aspergila iz prašine (N = 29) koji su prikupljeni tijekom zimskog i ljetnog perioda uzorkovanja u 2016. godini, identificirani su do razine vrste na temelju analize slijedova dijela gena za kalmodulin (*CaM*). Identificirano je ukupno osam različitih vrsta aspergila: sekcija *Circumdati* (*A. ochraceus*, N = 3; *A. sclerotiorum*, N = 1; *A. westerdijkiae*, N = 1), sekcija *Flavi* (*A. flavus*, N = 6) i sekcija *Nigri* (*A. tubingensis*, N = 9; *A. welwitschiae*, N = 7; *A. luchuensis*, N = 1). Jedan izolat koji je po morfološkim karakteristikama bio sličan aspergilima iz sekcije *Circumdati*, nakon molekularne analize, identificiran je kao vrsta *A. dimorphicus* iz sekcije *Cremei*. Neznatno veća bioraznolikost utvrđena je među izolatima aspergila s kontrolnih lokacija (6 različitih vrsta) dok su izolati iz poplavom pogođenih područja identificirani kao 5 različitih vrsta (neobnovljene lokacije), odnosno 4 različite vrste (obnovljene lokacije). Zabrinjava činjenica da su najzastupljenije vrste izolirane iz prašine (*A. tubingensis*, *A. welwitschiae* i *A. flavus*) proizvođači mikotoksina okratoksina A, fumonizina i aflatoksina B1. Obzirom na njihova toksična svojstva, postoji opravdani rizik za zdravlje izloženih ljudi. Preciznijoj procjeni izloženosti ljudi aspergilima iz prašine te s njima povezanim posljedicama na ljudsko zdravlje doprinijet će daljnja istraživanja koja obuhvaćaju određivanje koncentracije aspergila u prašini, profila sekundarnih metabolita identificiranih aspergila te ispitivanja toksičnosti *in vitro* i *in vivo*.

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

Rad sadrži: 32 stranice, 3 tablice i 47 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: prašina, poplava, *CaM*, *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri*

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Daniela Jakšić**, *poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Maja Šegvić Klarić, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Maja Friščić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan, 2018.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

IDENTIFICATION OF POST-FLOOD DUSTBORNE ASPERGILLI FROM THE SECTIONS *CIRCUMDATI, FLAVI* AND *NIGRI*

Jelena Geček

SUMMARY

In the middle of May 2014, as a consequence of the rainfall caused by the retention of strong and deep cyclone over Southeast Europe for several days and the prolonged rainy season from the beginning of the same year, unprecedented floods occurred, the consequences of which were particularly pronounced in the Gunja area. An increase in the availability of water in the substrate (a_w) created favorable conditions for spreading of the conidia and mycelial fragments of molds and their mycotoxins in the indoor air and precipitation resulted in their deposition in the dust. Because of the allergic, invasive and toxic potential, concerns about the presence of Aspergilli from the *Circumdati*, *Flavi* and *Nigri* sections in dust samples are justified, which raises the issue of their impact on the health of people living and working in these areas. Aspergilli of interest (N = 29) were isolated from dust collected during winter and summer of 2016 and identified to the species level based on partial calmodulin gene sequences (*CaM*). The analysis resulted in eight different species of Aspergilli: *A. ochraceus*, N = 3; *A. sclerotiorum*, N = 1; *A. westerdijkiae*, N = 1 (section *Circumdati*), *A. flavus*, N = 6 (section *Flavi*) and *A. tubingensis*, N = 9; *A. welwitschiae*, N = 7 and *A. luchuensis*, N = 1 (section *Nigri*). One isolate resambled morphological features of the section *Circumdati* was identified to *A. dimorphicus*, a species assigned to the section *Cremei*. Slightly higher biodiversity of dustborne Aspergilli was found among the isolates from control locations (6 different species), while the isolates from flood affected area were identified to five (unrepaired houses) and four (repaired houses). A worrying fact is that the most common types of dust isolates (*A. tubingensis*, *A. welwitschiae* and *A. flavus*) are producers of mycotoxins ochratoxin A, fumonisins and aflatoxin B1. Considering their toxic properties there is a possible health threat to exposed people. These effects will be further elucidated by ongoing studies concerning concentrations of dustborne Aspergilli, their profile of secondary metabolites as well as *in vitro* and *in vivo* toxicity assays.

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

Thesis includes: 32 pages, 3 tables and 47 references. Original is in Croatian language.
Keywords: dust, flood, *CaM*, *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri*
Mentor: **Daniela Jakšić**, **Ph.D.** University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Reviewers: **Daniela Jakšić**, **Ph.D.** University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Šegvić Klarić, **Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Friščić, **Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September, 2018.