

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

**Ivana Kovačević**

**Bioraznolikost aspergila sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* u prašini nakon  
poplave**

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za mikrobiologiju, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom dr. sc. Daniele Jakšić te je dio znanstveno-istraživačkog projekta (MycotoxA IP-09-2014-5982) kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost (HRZZ), čija je voditeljica prof. dr. sc. Maja Šegvić Klarić, a dr. sc. Daniele Jakšić suradnica na projektu. Rad je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2017/2018.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. POZADINA ISTRAŽIVANJA .....	1
1.2. PLIJESNI U ZATVORENOM PROSTORU .....	1
1.3. <i>ASPERGILLUS</i> VRSTE OPĆENITO .....	2
1.4. <i>ASPERGILLUS</i> VRSTE IZ SEKCIJE <i>CIRCUMDATI</i> .....	2
1.5. <i>ASPERGILLUS</i> VRSTE IZ SEKCIJE <i>FLAVI</i> .....	3
1.6. <i>ASPERGILLUS</i> VRSTE IZ SEKCIJE <i>NIGRI</i> .....	4
1.7. <i>ASPERGILLUS</i> VRSTE IZ SEKCIJE <i>VERSICOLORS</i> .....	4
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>6</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>7</b>
3.1. MATERIJALI.....	7
3.1.1. MIKOLOŠKA ANALIZA.....	7
3.1.2. IZOLACIJI GENOMSKE DNÁ IZ FILAMENTOZNIH GLJIVICA.....	8
3.1.3. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE (PCR), PROČIŠĆAVANJE I DETEKCIJA PRODUKATA REAKCIJE .....	8
3.1.4. PRIPREMA PREPARATA ZA MIKROMORFOLOŠKU ANALIZU.....	10
3.2. METODE .....	10
3.2.1. UZORKOVANJE .....	10
3.2.2. MIKOLOŠKA ANALIZA.....	11
3.2.3. MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA.....	11
3.2.4. IZRADA MIKROSKOPSKIH PREPARATA .....	14
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>15</b>
4.1. POJAVNOST I BIOLOŠKA RAZNOLIKOST VRSTA RODA <i>ASPERGILLUS</i> IZ SEKCIJA <i>CIRCUMDATI</i> , <i>FLAVI</i> , <i>NIGRI</i> I <i>VERSICOLORS</i> U UZORCIMA PRAŠINE NA POJEDINIM LOKACIJAMA.....	15
4.2. MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA IZOLATA <i>ASPERGILA</i> .....	18
4.3. MORFOLOŠKA OBILJEŽJA IDENTIFICIRANIH VRSTA.....	21
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>28</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>32</b>
<b>8. SAŽETAK</b> .....	<b>40</b>
<b>ZAHVALE</b> .....	<b>43</b>
<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>43</b>

## 1. UVOD

### 1.1. POZADINA ISTRAŽIVANJA

Poplava koja je zahvatila istočne krajeve Hrvatske u svibnju 2014. godine, posljedica je višednevnog utjecaja ciklone Donat i sekundarne ciklone Donat. U Bosni i Hercegovini zabilježen je pad od 200 do 250 L kiše po kvadratnom metru u 10 dana, što je opteretilo protoke rijeka i južne pritoke rijeke Save. Sava je zbog toga 16. svibnja 2014. postigla dosad nezabilježene protoke i vrijednosti vodostaja od 5500 m<sup>3</sup>/s, u usporedbi s uobičajenih 1000 – 1100 m<sup>3</sup>/s. Takav je vodostaj doveo do puknuća brane u Rajevom selu 17. svibnja 2014. i poplave 3206 hektara površine općine Gunja (<https://www.crometeo.hr/ciklona-donat-u-brojkama-koliko-je-kise-palo/>). Voda se zadržala i do nekoliko tjedana u ovom području, što je stvorilo okruženje pogodno za rast kako mikroorganizama, tako i plijesni.

Budući da prirodne katastrofe uzrokuju promjena u ekosustavu, posebno u sastavu plijesni u okruženju u kojem ljudi svakodnevno borave, postavlja se pitanje kako će se one odraziti na zdravlje izloženih ljudi.

### 1.2. PLIJESNI U ZATVORENOM PROSTORU

Većina je građevinskog materijala organskog sastava i stoga dobra podloga za rast gljivica posebno u uvjetima povećane dostupnosti vode čime se povećava aktivitet vode ( $a_w$ ) u supstratu. Povećanju  $a_w$ , a posljedično rastu gljivica, osobito pogoduju oštećenja zidova vodom koja može biti prisutna zbog curenja cijevi, kondenzacije vodene pare, ali i nakon prirodnih katastrofa primjerice razornih uragana ili poplava. Budući da gljivice mogu imati negativne učinke na zdravlje pojedinaca koji borave u kontaminiranom prostoru potrebno je sanirati nastala oštećenja u što kraćem vremenskom periodu. Pri tome je potrebno ukloniti vodu iz prostora, osušiti i provjetriti prostorije, a od osobite pomoći pri sanaciji vidljivog porasta plijesni je premazivanje zidova snažnim oksidansima na bazi klora (WHO, 2000).

Međutim, plijesni u zatvorenom prostoru nemoguće je i nepotrebno u potpunosti ukloniti s obzirom na to da su njihove konidije uobičajene i u vanjskom zraku odakle dopijevaju u zatvorene prostore. Ne postoje usuglašene smjernice sigurne koncentracije plijesni u zraku za stambene prostore. Generalno se smatra sigurnim za zdravlje ljudi ujednačenost sastava aeromikoflore u zraku u zatvorenom prostoru i vanjskom okolišu. Na raznovrsnost gljivica u domu utječe organski otpad, kućni ljubimci, uzgoj biljaka, tepisi, ali i namirnice koje svakodnevno donosimo u naš dom. Redovito čišćenje, provjetranje i osunčanost prostora uobičajene su mjere održavanja ravnoteže kvalitativnog i kvantitativnog sastava plijesni u

unutarnjem okolišu. Preporučeno je obratiti više pažnje na održavanje ventilacijskih i klima uređaja te radijatora. Ovim mjerama osobito se smanjuje njihovo nakupljanje u prašini te tako preveniraju nepovoljni učinci na zdravlje ljudi, primjerice alergije. Osim u stambenim prostorima ove mjere je potrebno provoditi i u radnim prostorima, a posebno u školama i vrtićima gdje duže vrijeme provode djeca koja predstavljaju posebno osjetljivu skupinu. Djeca se puno kreću i unose zemlju i prašinu izvana unutra, pa je sastav prašine u ovim ustanovama različit u usporedbi s drugim zatvorenim prostorima. Često se u školama i vrtićima pronađe veća količina gljivica rodova *Cladosporium* i *Penicillium* u zraku, dok se u prašini može pronaći obilna količina gljivica rodova *Aspergillus* sekcije *Aspergillus* (ranije *Eurotium* spp.), *Penicillium* i *Wallemia* (Samson i sur., 2010).

### 1.3. ASPERGILLUS VRSTE OPĆENITO

*Aspergillus* je rod koji obuhvaća 344 različitih vrsta plijesni koje su široko rasprostranjene po cijelom svijetu (Frisvad i sur., 2015; Samson i sur., 2014). Kolonije ovih plijesni većinom rastu brzo i različitih su boja (npr. bijele, roze, žute, smeđe, crne ili zelene), a većinom se sastoje od gusto naslaganih konidiofora, koji su polegnuti ili uspravni. Konidiofori se sastoje od aseptirane, nerazgranate stapke koja se pri vrhu širi u vezikul na kojem se nalaze fialide i ponekad metule. Fialide nose konidije, te zajedno s vezikulom i metulama, ako su prisutne, tvore konidijalnu glavicu. Vrste roda *Aspergillus* često se nalaze kao onečišćenja raznih supstrata kao što su zidovi i drugi građevinski materijal. Nekoliko je vrsta od osobitog značaja s obzirom da mogu uzrokovati infekcije i alergije, a mnoge od njih su i proizvođači sekundarnih toksičnih metabolita, mikotoksina. Druge su vrste zanimljive zbog uloge u fermentaciji ili proizvodnje organskih kiselina pa su kao takve našle primjenu u biotehnologiji i prehrambenoj industriji. Od posebnog su značaja za zdravlje ljudi, kako zbog alergijskog potencijala, tako i zbog tvorbe mikotoksina, vrste aspergila iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores*. Konidije i dijelovi micelija ovih vrsta veličinom 2 – 5 µm često se nalaze u zraku i ljudi ih svakodnevno udišu što može dovesti do inicijacije ili pogoršanja već postojeće bolesti dišnog sustava. (Krishnan i sur., 2009).

### 1.4. ASPERGILLUS VRSTE IZ SEKCIJE CIRCUMDATI

Ova sekcija uključuje 27 vrsta (Visagie, Varga, i sur., 2014) koje proizvode različite sekundarne metabolite, npr. mikotoksine okratoksin, penicilinsku kiselinu, ksantomegnin, viomelein i vioksantin. Raširene su po cijelom svijetu, ali češće su prisutne u toplijim krajevima i uobičajeno kontaminiraju grah, začine, biljne droge i žitarice (Samson i sur., 2010) A.

*ochraceus* i *A. sclerotiorum* uzročnici su onihomikoza, alergijske bronhopulmonarne aspergiloze i otomikoze kod ljudi i životinja (Zotti i sur., 2010; Harima i sur., 2004; Novey i Wells, 1978). Aspergili iz sekcije *Circumdati* učestali su i u stambenim i radnim sredinama. Primjerice, iz uzoraka kućne prašine mogu se izolirati vrste *A. occultus*, *A. subramaninii*, *A. westerdijkiae* (Visagie, Varga, i sur., 2014), a vrsta *A. sclerotiorum* iz zraka prikupljenog u mlinu žitarica (Šegvić Klarić i sur., 2015). Glavni sekundarni metabolit aspergila iz sekcije *Circumdati* je okratoksin A (OTA) kojeg čak 13 vrsta iz ove sekcije proizvode u velikim količinama, kao npr. *A. occultus*, *A. ochraceus* i *A. westerdijkiae* (Visagie, Varga, i sur., 2014). Proizvođače OTA nalazimo i među aspergilima drugih sekcija (sekcija *Nigri*), kao i drugim rodovima plijesni (*Penicillium* spp., *Petromyces* spp. i sl.). Okratoksin ima nefrotoksični, imunosupresivni, teratogeni i karcinogeni učinak. (Siqueira i sur., 2017) u čijoj pozadini je genotoksični učinak i oksidacijski stres (Šegvić Klarić i sur., 2010; Šegvić Klarić i sur., 2007). Međutim i inhalacija OTA može se nepovoljno odraziti na zdravlje ljudi. Tako su povećane koncentracije OTA detektirane u urinu ljudi koji žive u vlažnim stanovima, dok je kod kontrolne skupine koncentracija OTA bila ispod limita detekcije (Hooper i sur., 2009). Kod ljudi koji borave u vlažnim stanovima dokazana je uzročno-posljedična veza između inhalacije OTA i glomeruloskleroze (Hope i Hope, 2012). Nadalje, u uvjetima preopterećenosti zraka plijesnima proizvođačima OTA kod profesionalno izloženih radnika može doći do akutnog zatajenja bubrega (Di Paolo i sur., 1994).

### 1.5. ASPERGILLUS VRSTE IZ SEKCIJE FLAVI

U sekciju *Flavi* uključeno je 22 vrste. Nekoliko je vrsta iz ove sekcije važno kako zbog proizvodnje mikotoksina aflatoksina, ciklopiazonične kiseline, okratoksina ili koične kiseline, tako i zbog fermentacije u proizvodnji orijentalne hrane (Varga i sur., 2011b). Aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) smatra se najtoksičnijim prirodnim spojem uopće, a s obzirom na dokazani hepatokarcinogeni učinak kod ljudi, Svjetska agencija za istraživanje raka (eng. *International Agency for Research on Cancer*) svrstava ga u karcinogene prve skupine (IARC IA, IARC 2012). U najvećim količinama ga proizvode vrste *A. flavus* i *A. parasiticus* (Varga i sur., 2011b; Samson i sur., 2010). Vrsta *A. flavus* uzročnik je raznih infekcija, od kojih su najznačajnije invazivne aspergiloze, onihomikoze i keratitis (Manikandan i sur., 2010; Krishnan i sur., 2009). U industrijskim pogonima za obradu kave, kakaa i začina u Italiji AFB<sub>1</sub> detektiran je u koncentraciji do 45 pg/m<sup>3</sup> (Brera i sur., 2002), a u pogonima za obradu i skladištenje kukuruza u Indiji koncentracije u inhalabilnoj prašini bile su 20 – 80 pg/m<sup>3</sup> (Ghosh i sur., 1997). Na životinjskim farmama u SAD-u, AFB<sub>1</sub> detektiran je u koncentraciji do čak 4,8 μg/m<sup>3</sup> (Selim i

sur., 1998). Budući da je AFB<sub>1</sub> detektiran i u krvi izloženih radnika, inhalacija predstavlja značajan put izloženosti aflatoksinima (Brera i sur., 2002; Selim i sur., 1998).

#### 1.6. ASPERGILLUS VRSTE IZ SEKCIJE NIGRI

Sekcija *Nigri* sastoji se od 28 vrsta (Samson i sur., 2014; Silva i sur., 2011) uključujući i nedavno opisanu vrstu *Aspergillus labruscus* sp. nov. (Fungaro i sur., 2017). Zbog morfološke sličnosti vrste unutar sekcije, najzahtjevnije su za razlikovanje. Aspergili iz sekcije *Nigri* rašireni su po cijelom svijetu, a mogu se naći na grožđu, kavi, kukuruzu, crvenom luku i mnogoj drugoj hrani. Dok mnoge vrste uzrokuju propadanje hrane, druge su uključene u fermentaciju hrane zbog lučenja hidrolitičkih enzima, kao što su amilaza i lipaza te organskih kiselina, kao što su citrat i glukonat (Varga i sur., 2011a; Pitt i Hocking, 2009).

Među crnim aspergilima izdvajaju se i patogene vrste, primjerice *A. niger* i *A. tubingensis* koje se povezuju s invazivnom pulmonarnom aspergilozom ili otomikozom (Tochigi i sur., 2013; Sziget i sur., 2012). Crni aspergili mogu često biti izolirani iz zraka unutarnjeg prostora uključujući stanove (Jurjević i sur., 2012b; Rojas i Aira, 2012) i industrijske pogone (Wani i sur., 2014), a visoko su učestali u kućnoj prašini (Visagie, Hirooka, i sur., 2014) stoga se vrlo često povezuju i s alergijama (Mota i Borrego, 2016). Među crnim aspergilima posebno su značajne vrste proizvođači mikotoksina OTA, primjerica *A. niger*, *A. welwitschiae* i *A. carbonarius*, a u novije vrijeme otkriveno je da neke vrste mogu proizvoditi i fumonizine B<sub>2</sub>, B<sub>4</sub> i B<sub>6</sub> (Lamboni i sur., 2016; Logrieco i sur., 2014; Frisvad i sur., 2011). Fumonizini se općenito smatraju negenotoksičnim karcinogenima, te se smatra da je oksidacijski stres glavni mehanizam koji dovodi do oštećenja DNA (Domijan i sur., 2015; Šegvić Klarić i sur., 2007). Jetra i bubrezi su ciljni organi u kojima dolazi do ispoljavanja toksičnih učinaka fumonizina mehanizmom povezanim s poremećajem metabolizma sfingolipida zbog inhibicije ceramid sintaze (Wang i sur., 1991).

#### 1.7. ASPERGILLUS VRSTE IZ SEKCIJE VERSICOLORES

Do razvoja molekularnih metoda identifikacije aspergila upotrebom genskih markera za *ITS* (eng. *Internal transcribed spacer*), beta tubulin (*BenA*) i kalmodulin (*CaM*) (Peterson, 2008) vrsta *A. versicolor* bila je jedina vrsta ove sekcije identificirana u stambenim prostorima, a s kojom su se povezivali štetni učinci na zdravlje ljudi (Engelhart i sur., 2002; Gravesen i sur., 1999). Od 2012. do danas identificirano je 17 različitih vrsta unutar ove sekcije (Jakšić Despot i sur., 2017; Tsang i sur., 2016; Jurjevic i sur., 2012a). Ove vrste uglavnom su izolirane iz zraka i prašine unutarnjih zatvorenih prostora (*A. creber*, *A. cvjetkovicii*, *A. jensenii*, *A. protuberus* i

*A. puulaauensis*), ali i neobičnih supstrata kao što su pčelinje košnice (*A. puulaauensis*), parafina (*A. jensenii*), gumeni omotač električnog kabla (*A. protuberus*) ili plutajući grumen nafte s Atlantskog oceana (*A. creber*). Međutim, vrste ove sekcije kontaminiraju i hranu biljnog i životinjskog porijekla (Jurjevic i sur., 2012a). Pored toga, vrsta *A. sydowii* identificirana je kao dominantna vrsta pšenice Qu koja se koristi u proizvodnji rižinog vina (Shang i sur., 2012). Široka rasprostranjenost vrsta iz ove sekcije osobito zabrinjava s obzirom na visok potencijal tvorbe mikotoksina sterigmatocistina (STC) čije koncentracije dosežu 1% ukupne biomase producenta (Fog Nielsen, 2003). STC pokazuje različite toksične, mutagene i karcinogene učinke na životinje i proglašen je karcinogenom 2B kategorije (IARC, 1986), odnosno mogućim humanim karcinogenom. Citotoksičnost, genotoksičnost i imunomodulacijski učinci STC kao i ekstrakata aspergila proizvođača STC izoliranih iz zraka pokazani su u uvjetima *in vitro* na A549 stanicama (stanice adenokarcinoma pluća) te stanicama THP-1 induciranim u makrofage (Jakšić Despot, 2016). S obzirom na visoku zastupljenost u prostoru gdje ljudi borave i rade može se pretpostaviti rizik za zdravlje uslijed inhalacijske izloženosti. Neke su vrste unutar sekcije *Versicolores*, kao *A. versicolor* i *A. sydowii* uzročnici onihomikoza i aspergiloza (Siqueira i sur., 2016; Zhang i sur., 2012; Torres-Rodríguez i sur., 1998).



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Povećana dostupnost vode u supstratu,  $a_w$ , predstavlja jedan od najznačajnijih faktora za rast plijesni. Stoga se u građevnim objektima nakon poplave očekuje njihov porast na vlažnim zidovima odakle se putem konidija i dijelova micelija šire zrakom u okoliš, a taloženjem nakupljaju u prašini u zatvorenim prostorima.

Među plijesnima koje rastu u ovakvim uvjetima osobito su učestale vrste roda *Aspergillus* kojima  $a_w$  0,85 – 0,95 u supstratu predstavlja optimalne uvjete za rast i razmnožavanje. Pri tome su od posebnog javnozdravstvenog značaja aspergili iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores*, a obzirom na alergijski i invazivni potencijal te mogućnost biosinteze sekundarnih toksičnih metabolita.

Kako bi se procijenio rizik za zdravlje ljudi po inhalaciji prašine opterećene aspergilima specifični ciljevi ovog rada su:

- Odrediti ukupnu koncentracije aspergila u prašini te koncentracije aspergila iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* u prašini (CFU<sup>1</sup>/g)
- Na temelju morfoloških obilježja i molekularnih metoda analize slijedova gena za *CaM* identificirati izolate aspergila navedenih sekcija do razine vrste te prikazati njihovu filogenetsku povezanost
- Procijeniti rizik za zdravlje ljudi koji borave u prostorima prevelike vlažnosti, s obzirom na koncentraciju i sastav plijesni u prašini

---

<sup>1</sup> CFU- eng. Colony Forming Unit; broj vijabilnih čestica kao brojčana vrijednost koncentracije plijesni

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. MATERIJALI**

##### **3.1.1. Mikološka analiza**

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

- Peptonska voda (Biolife, Italija): pepton 10 g, natrij-klorid (NaCl) 5 g, bezvodni natrijev hidrogenfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 3,5 g i monokalijev fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1,5 g otopljeni su u litri destilirane vode uz zagrijavanje do vrenja. Tako priređena otopina sterilizirana je autoklaviranjem (121 °C, 15 min) nakon čega je dodan polisorb 80 (Tween 80; Sigma-Aldrich, Njemačka) 1% v/v.
- Dikloran 18% glicerolni agar (DG-18; Oxoid, UK): glukoza 10 g, pepton 5 g, monokalijev fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 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 otopljeni su u litri destilirane vode uz zagrijavanje do vrenja. Tako priređena otopina sterilizirana je autoklaviranjem (121 °C, 15 min).
- Dikloran-Rose Bengal-kloramfenikolni agar (DRBC; Oxoid, UK): glukoza 10 g, pepton 5 g, monokalijev fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1 g, magnezijev sulfat heptahidrat ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0,5 g, agar 15 g, dikloran (0,2% w/v u etanolu, 1 mL) 2 mg i kloramfenikol 100 mg otopljeni su u litri destilirane vode uz zagrijavanje do vrenja. Tako priređena otopina sterilizirana je autoklaviranjem (121 °C, 15 min) nakon čega je dodan Rose Bengal (5% w/v u  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 mL) 25 mg.
- Czapek-agar sa kvašćevim ekstraktom (CYA; Difco, SAD): Czapek koncentrat (natrijev nitrat ( $\text{NaNO}_3$ ) 30 g, kalijev klorid (KCl) 5 g, magnezijev sulfat heptahidrat ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) 5 g i željezov sulfat heptahidrat ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0,1 g otopljeni su u 100 mL destilirane vode) 10 mL, otopina elemenata u tragovima (bakrov sulfat pentahidrat ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) 0,5 g i cinkov sulfat heptahidrat ( $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) 1 g otopljeni su u 100 mL destilirane vode) 1 mL, monokalijev fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1 g, kvašćev ekstrakt 5 g, saharoza 30 g i agar 15 g otopljeni su u litri destilirane vode. 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 otopljeni su u litri destilirane vode. Tako priređena otopina sterilizirana je autoklaviranjem (121 °C, 15 min).

- Kreatin-sukroza agar (CREA) priređen je prema receptu Samson i sur., 2014: Kreatin monohidrat 3 g, sukroza 30 g, dikalijev fosfat trihidrat ( $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ) 1,3 g, bromkrezol ljubičasto 0,05 g, kalijev klorid (KCl) 0,5 g, magnezijev sulfat heptahidrat ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 0,5 g i željezov sulfat heptahidrat ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 0,01 g, cinkov sulfat heptahidrat ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 0,01 g, bakrov sulfat pentahidrat ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) 0,005 g i agar (So-bi-gel) 15 g otopljeni su u litri destilirane vode. Tako priređena otopina sterilizirana je autoklaviranjem (121 °C, 15 min).

#### *Uređaji*

- Autoklav (φ 300 x 500, Sutjeska, Beograd, Srbija)
- Termostatirana tresilica (Orbital Shaker-Incubator Grant-Bio ES20, Grant Instruments (Cambridge) Ltd., UK)

#### 3.1.2. Izolaciji genomske DNA iz filamentoznih gljivica

- Medij za izolaciju DNA: glukoza (10 g/L), pepton (10 g/L) i kvašćev ekstrakt (10 g/L) u destiliranoj vodi.
- 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, ispiranje i otapanje DNA: izopropanol (Kefo d.o.o., Sisak, Hrvatska), etanol 96% v/v (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), Tris-EDTA pufer pH = 8,5 ± 0,02 (Macherey-Nagel GmbH & Co., Njemačka).

#### 3.1.3. Lančana reakcija polimeraze (PCR), pročišćavanje i detekcija produkata reakcije

#### *Kemikalije*

- PCR reakcijska smjesa: *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 kalmomodulin (*CaM*): 5'-CCGAGTACAAGGARGCCTTC-3' (cmd5; 32,3 nmol; Metabion, Njemačka) i 5'-CCGATRGAGGTCATRACGTGG-3' (cmd6; 28,7 nmol;

Metabion, Njemačka)<sup>2</sup> te DNA kalup (genomska DNA izolirana iz filamentoznih gljivica). Vodena otopina serumskog albumina goveda (eng. *bovine serum albumin*, BSA; Sigma-Aldrich, Njemačka) koncentracije 20 mg/mL po potrebi je korištena kao dodatak u optimizaciji uvjeta PCR. Koncentracije sastavnica u PCR reakcijskoj smjesi prikazane su u tablici 1.

- Agaroza (SeaKem<sup>®</sup> 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 [eng. 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 fluorescentne boje je 10000.
- Komercijalni set za pročišćavanje izolirane DNA i PCR produkata (NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel GmbH & Co., Njemačka)

Tablica 1. Koncentracije sastavnica PCR reakcijske smjese

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

#### Uređaji i pribor

- Liofilizator (Freeze-dryer ALPHA 1-2 LDplus, Christ, Njemačka)
- Centrifuga (Table top Centrifuge Z 326 K, Hermle, LaborTechnik, Njemačka)
- Vortex (IKA<sup>®</sup> VORTEX 3, Sigma-Aldrich, Njemačka)

<sup>2</sup> A- purinska baza adenin, T-pirimidinska timin, C-pirimidinska baza citozin, G- purinska baza gvanin, R- purinska baza adenin ili gvanin

- Termoblok (Eppendorf ThermoMixer<sup>®</sup> C, Eppendorf, Njemačka)
- Termo-vakuum uparivač (Concentrator Plus, Eppendorf, Njemačka)
- Uređaj za PCR (T-100 Thermal Cycler, BioRad, SAD)
- Sustav za elektroforezu (Sub-Cell<sup>®</sup> GT Agarose Gel Electrophoresis Systems, BioRad, SAD)
- UV transiluminator (UVITEC, UK)

#### 3.1.4. Priprema preparata za mikromorfološku analizu

##### *Kemikalije i pribor*

- Polivinilni alkohol (Selvol<sup>™</sup> Polyvinyl Alcohol, Sekisui Chemical Co., SAD)
- Etanol 96% v/v (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Pokrovna stakalca (24x40 mm, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co, Njemačka)
- Predmetna stakalca (26x76 mm, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co, Njemačka)
- Mikrobiološka eza (Copan Italia S.p.A, Italija)

##### *Uređaji*

- Lupa (Stereo Zoom Microscope SZH-ILLD, Olympus, Japan)
- Mikroskop (Microscope BX40, Olympus, Japan)
- Kamera za mikroskop i lupu (Dino-Eye AM7023B digital eyepiece, Dino-Lite US, Dunwell Tech, SAD)

### 3.2. METODE

#### 3.2.1. Uzorkovanje

Uzorci obrađeni u ovom radu dio su znanstveno istraživačkog projekta (Štetni učinci pojedinačnih i kombiniranih mikotoksina *Aspergillus* vrsta-MycotoxA IP-09-2014-5982) financiran od Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ). Tako je u rujnu 2017. godine prikupljeno je 17 uzoraka prašine (10 – 20 g) u obnovljenim kućama i obnovljenoj školi (N = 6) te neobnovljenim kućama (N = 5) u poplavom pogođenom području u Gunji te u kućama i školi (N = 6) u kontrolnoj lokaciji Gornji Stupnik. Uzorci prašine sakupljeni su u plastične vrećice, hermetički zatvorene te pohranjene u zamrzivač (-20 °C) do analize.

### 3.2.2. Mikološka analiza

Vagano je 1 – 2 g uzorka prašine te pomiješano s peptonskom vodom u omjeru 1:18 (matične suspenzije). Posude su radi ujednačavanja sadržaja, postavljene na termostatiranu tresilicu (25 °C, 45 min, 300 o/min). Iz matičnih suspenzija priređen je koncentracijski niz (1:10) tako da je matična suspenzija uzastopno razrijeđena četiri puta (radne suspenzije) te je po 100 µL suspenzije svakog od razrjeđenja raspoređeno na površinu DG-18 i DRBC agara. Tako priređene hranjive podloge inkubirane su na 25 °C u mraku 5 – 7 dana te je na temelju poraslih kolonija određena koncentracija plijesni u prašini (CFU/g) prema formuli:

$$N = \frac{\sum C}{V \times (n_1 + 0,1 \times n_2) \times d}$$

N	CFU/g; koncentracija vijabilnih plijesni po gramu prašine
$\sum C$	suma svih poraslih kolonija na DG-18 ili DRBC na dva uzastopna odgovarajuća razrjeđenja <sup>3</sup>
V	volumen inokuluma (mL) stavljenog na svaku hranjivu podlogu
n <sub>1</sub>	broj hranjivih podloga u prvom brojevom razrjeđenju
n <sub>2</sub>	broj hranjivih podloga u drugom brojevom razrjeđenju
d	razrjeđenje iz kojeg su dobiveni prvi brojevi

Porasle gljivice koje su po makroskopskim obilježjima i mikromorfologiji odgovarale vrstama roda *Aspergillus* sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* izdvojene su na hranjive podlogu CYA i MEA. Identifikacija na temelju morfoloških osobina provedena je usporedbom s odgovarajućom literaturom (Samson i sur., 2014; Visagie, Varga, i sur., 2014; Jurjevic i sur., 2012a; J. Varga i sur., 2011a; J Varga i sur., 2011b; Samson i sur., 2010). Izolati aspergila od interesa (N = 26) pohranjeni su u Zbirku mikrobnih kultura Zavoda za mikrobiologiju, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta (MFBF).

### 3.2.3. Molekularna identifikacija

*Aspergillus* vrste od interesa uzgojene su u 1 mL tekućeg hranjivog medija (medij za izolaciju DNA, poglavlje 3.1.2.) u mikrotubicama (25 °C, 2 – 3 dana) te je iz poraslog micelija proveden postupak izolacije DNA u nekoliko koraka:

<sup>3</sup> Odgovarajuće razrjeđenje podrazumijeva broj kolonija koji nije veći od 150

- 1) Micelij je izoliran od tekućeg medija centrifugiranjem (10 min, 18600 g) i uklanjanjem medija pipetom te ispran dodatkom 1 mL vode koja uklonjena nakon centrifugiranja (10 min, 18600 g). Čisti micelij je zamrznut (-20 °C, 30 min), a potom liofiliziran kroz 24 h.
- 2) Stanične strukture lizirane su mljevenjem micelija mikropistolom uz sterilni pijesak te dodatkom otopine za lizu. Suspenzija staničnog lizata inkubirana je u termobloku (70 °C, 15 min, 400 o/min.).
- 3) Dodatkom Na-acetata i centrifugiranjem (25 °C, 10 min, 18600 g) istaloženi su proteini i ostaci staničnog lizata, a DNA je ostala otopljena u nadtalogu koji je pažljivo izdvojen u čiste mikrotubice.
- 4) Dodatkom hladnog izopropanola (-20 °C) izdvojenom nadtalogu u omjeru 1:1 istaložena je DNA (-20 °C, 15 min). Nakon centrifugiranja (25 °C, 10 min, 18600 g) nadtalog je uklonjen.
- 5) Talog DNA ispran je dodatkom koncentriranog etanola koji je uklonjen nakon centrifugiranja (25 °C, 10min, 18600 g)
- 6) Tragovi etanola u talogu DNA uklonjeni su sušenjem u termo-vakuum uparivaču (30 °C, 15 min, 1400 o/m)
- 7) DNA je otopljena u Tris puferu.

Uspješnost izolacije DNA provjerena je elektroforezom na agarози (1%) u TAE puferu (1X) tako da je otopina ispitivane DNA pomiješana sa radnom otopinom boje (poglavlje 3.1.3., *Kemikalije*) u jažicama na formiranom gelu. Detekcija DNA provedena je na temelju fluorescencije pod UV svjetlom valne duljine 254 nm.

### *PCR*

Iz tako izoliranih DNA svakog od sojeva, umnožen je dio *CaM* gena upotrebom početnica *cmd5* i *cmd6* u 25 µL reakcijske smjese (*Poglavlje 3.1.3., Kemikalije*). Tijek reakcijskih ciklusa PCR prikazan je u tablici 2:

Tablica 2. Reakcijski ciklus PCR za *CaM*

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

Uspješnost PCR reakcije provjerena je gel-elektroforezom na temelju fluorescencije PCR produkta (DNA fragment oko 500 parova baza- pb) miješanjem 2  $\mu$ L PCR produkta s radnom otopinom boje (poglavlje 3.1.3., *Kemikalije*).

Prije sekvenciranja PCR produkti pročišćeni su kroz kolone prema uputama proizvođača. Ukratko, PCR produkt veže se za silikagel membranu kolone dodatkom otopine kaotropne soli (npr. gvanidin tiocijanat ili gvanidin hidroklorid) dok ostali sastojci (ostaci dNTP, početnica, dimera početnica, BSA, i dr.) prolaze kroz membranu nakon centrifugiranja (1 min, 18600 g). Silikagel membrana ispiri se etanolom uz centrifugiranje (1 min, 18600 g), osuši u termo-vakuum uparivaču (30 °C, 10 min, 1400 o/min), a potom se DNA (pročišćeni PCR produkt) ispiri s membrane dodatkom Tris-EDTA pufera (pH 8,5) na sobnoj temperaturi.

#### *Filogenetička analiza*

Nukleotidni sljedovi dijela gena za kalmodulin (CaM) određeni za izolate aspergila sravnjeni su upotrebom MUSCLE analize (eng. *MUltiple Sequence Comparison by Log- Expectation*; Edgar, 2004) programskog paketa MEGA 7.0. (Kumar i sur., 2016) te je provedena preliminarna identifikacija do razine vrste pomoću programa BLAST (eng. *Basic Local Alignment Search Tool*) usporedbom s nukleotidnim sljedovima dijela gena CaM pohranjenim u bazi nukleotidnih sljedova NCBI (eng. *National Center for Biotechnology Information*) dostupnoj na mrežnoj stranici <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Kako bi se jasno razlučile pojedine vrste raspoređene u sekcije, iz ove baze prikupljeni su sljedovi nukleotida CaM izolata aspergila (Samson i sur. 2014) te je provedena i filogenetička analiza. Na temelju sravnjenih



sljedova nukleotida CaM ispitivanih izolata aspergila i prethodno identificiranih vrsta aspergila (tablica 3) u programskom paketu MEGA 7.0 filogenetičko stablo izračunato je metodom najveće vjerodostojnosti (eng. *Maximum Likelihood*) po modelu Tamura-Nei (Tamura & Nei 1993) te uz parametrijski model koji uključuje supstituirane nukleotide kao i mjesta bez varijacije (GTR+I, eng. *Generalised time reversible*). Procjena pouzdanosti pojedinih podskupina filogenetičkih rekonstrukcija provedena je usporedbom 500 pseudouzoraka tzv. bootstrap metodom. Homologija genskih sljedova ispitana je pretragom prema sličnosti nukleotid-nukleotid dostupnoj na internetskoj stranici NCBI.

Tablica 3. Vrste aspergila korištene u filogenetskoj analizi

Naziv vrste	Šifra izolata	GenBank*	Literatura
<i>A. ochraceus</i>	NRRL 419	EU021680.1	Peterson, 2008
<i>A. pallidofulvus</i>	NRRL 4789	EF661389.1	Peterson, 2008
<i>A. flavus</i>	NRRL 1957	EF661508.1	Peterson, 2008
<i>A. tubingensis</i>	NRRL 4875	EF661151.1	Peterson, 2008
<i>A. uvarum</i>	CBS 121591	FN594559.1	Samson i sur. 2014
<i>A. welwitschiae</i>	CBS 139.54	KC480196.1	Hong i sur. 2013
<i>A. puulaauensis</i>	NRRL 58602	JN854048.1	Jurjević i sur. 2012a
<i>A. sydowii</i>	NRRL 5585	JN854039.1	Jurjević i sur. 2012a
<i>A. griseoaurantiacus</i>	CBS 138191	KJ775357.1	Visagie i sur. 2014
<i>A. jensenii</i>	NRRL 225	JN854020.1	Jurjević i sur. 2012a
<i>A. iizukae</i>	NRRL 3750	EF669555.1	Peterson, 2008
<i>A. insuetus</i>	NRRL 279	EF652369.1	Peterson, 2008

\* pristupni broj za slijed nukleotida *CaM*

### 3.2.4 Izrada mikroskopskih preparata

Po jedan izolat svake identificirane vrste iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* izoliran je na MEA agar i inkubiran u mraku 3 – 5 dana (25 °C, 3 dana za sekcije *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri*, a za sekciju *Versicolores* 5 dana). Na predmetno stakalce stavljena je jedna kap polivinilnog alkohola na koju je ubodnom ezom prebačen dio kulture. Prije stavljanja pokrovnog stakalca radi uklanjanja spora dodan je etanol. Tako priređeni preparat promatran je pod mikroskopom pod povećanjem do 400 puta uz fotografiranje.

## 4. REZULTATI

### 4.1. POJAVNOST I BIOLOŠKA RAZNOLIKOST VRSTA RODA *ASPERGILLUS* IZ SEKCIJA *CIRCUMDATI*, *FLAVI*, *NIGRI* I *VERSICOLORES* U UZORCIMA PRAŠINE NA POJEDINIM LOKACIJAMA.

Ukupna koncentracija aspergila u prašini kao i koncentracije aspergila po sekcijama od interesa izračunate su na temelju porasta na DG-18 odnosno DRBC agaru te su rezultati prikazani u tablicama 4 i 5.

Ukupne koncentracije aspergila u prašini bile su oko 50 puta veća u uzorcima prašine iz obnovljenih lokacija u Gunji u odnosu na kontrolno područje. Pri tome su koncentracije aspergila izmjerene u prašini iz obnovljenih lokacija bile 5 – 10 puta veće u odnosu na one iz neobnovljenih lokacija (tablica 4).

Koncentracija aspergila iz sekcije *Circumdati* bila je do 10 puta veća u prašini iz obnovljenih lokacija u Gunji u odnosu na koncentraciju u prašini iz kontrolnog područja, dok u prašini s neobnovljenih lokacija u Gunji nije bilo aspergila iz ove sekcije (tablica 5).

Aspergili iz sekcije *Flavi* izolirani su samo iz prašine iz Gunje, a pri tome su im koncentracije u prašini bile oko 10 puta veće u uzorcima s neobnovljenih u odnosu na obnovljene lokacije (tablica 5).

Aspergili iz sekcije *Nigri* najučestaliji su bili u prašini s obnovljenih lokacija u Gunji, a koncentracije u prašini bile su oko 15 puta veće u odnosu na koncentracije u prašini s kontrolnih lokacija. Crni aspergili izolirani su i iz prašine s jedne neobnovljene lokacije u Gunji gdje im je izmjerena koncentracija bila oko 5 puta manja u odnosu na obnovljene lokacije (tablica 5).

Aspergili iz sekcije *Versicolores* izolirani su iz prašine s najvećeg broja lokacija, odnosno tri neobnovljene i pet obnovljenih lokacija u Gunji te s pet lokacija u kontrolnom području. Pri tome su im koncentracije u prašini prikupljene na obnovljenim lokacijama bile oko 400 puta veće u odnosu na neobnovljene lokacije, odnosno oko 200 puta u odnosu na kontrolne lokacije.

Tablica 4. Ukupna koncentracija aspergila u uzorcima prašine prikupljenih tijekom rujna 2017. godine

	<b>DG-18</b>			<b>DRBC</b>		
	CFU/g			CFU/g		
	n/N	$\bar{x} \pm SD$	Min – Maks	n/N	$\bar{x} \pm SD$	Min – Maks
Obnovljene lokacije (Gunja)	6/6	$8,3 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^5$	$1,62 \times 10^3 - 3,3 \times 10^5$	5/6	$6,0 \times 10^4 \pm 8,4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^2 - 1,9 \times 10^5$
Neobnovljene lokacije (Gunja)	4/5	$1,5 \times 10^4 \pm 2,3 \times 10^4$	$0 - 5,3 \times 10^4$	4/5	$4,7 \times 10^3 \pm 5,2 \times 10^3$	$3,2 \times 10^2 - 1,1 \times 10^4$
Kontrolne lokacije (Gornji Stupnik)	6/6	$1,6 \times 10^3 \pm 1,1 \times 10^3$	$1,62 \times 10^2 - 3,3 \times 10^3$	2/6	$2,6 \times 10^3 \pm 3,7 \times 10^3$	$17,9 - 5,2 \times 10^3$

Tablica 5. Ukupna koncentracija aspergila iz naznačenih sekcija u uzorcima prašine prikupljenih tijekom rujna 2017. godine

<b>sekcija <i>Circumdati</i></b>						
	<b>DG-18</b>			<b>DRBC</b>		
	CFU/g			CFU/g		
	n/N	$\bar{x} \pm SD$	Min – Maks	n/N	$\bar{x} \pm SD$	Min – Maks
Obnovljene lokacije (Gunja)	3/6	59,5 ± 44,9	17,9 – 1,07x10 <sup>2</sup>	2/6	1,12x10 <sup>3</sup> ± 1,84x10 <sup>3</sup>	35,7 – 3,25x10 <sup>3</sup>
Neobnovljene lokacije (Gunja)	0/5	-	-	0/5	-	-
Kontrolne lokacije (Gornji Stupnik)	0/6	-	-	1/6	1,62x10 <sup>2</sup> ± 0	-
<b>sekcija <i>Flavi</i></b>						
	<b>DG-18</b>			<b>DRBC</b>		
	CFU/g			CFU/g		
	n/N	$\bar{x} \pm SD$	Min – Maks	n/N	$\bar{x} \pm SD$	Min – Maks
Obnovljene lokacije (Gunja)	2/6	3,43x10 <sup>2</sup> ± 4,34x10 <sup>2</sup>	35,7 – 6,49x10 <sup>2</sup>	0/6	-	-
Neobnovljene lokacije (Gunja)	1/5	5,36x10 <sup>4</sup> ± 0	-	3/5	3,36x10 <sup>3</sup> ± 5,53x10 <sup>3</sup>	1,62x10 <sup>2</sup> – 9,74x10 <sup>3</sup>
Kontrolne lokacije (Gornji Stupnik)	0/6	-	-	0/6	-	-
<b>sekcija <i>Nigri</i></b>						
	<b>DG-18</b>			<b>DRBC</b>		
	CFU/g			CFU/g		
	n/N	$\bar{x} \pm SD$	Min – Maks	n/N	$\bar{x} \pm SD$	Min – Maks
Obnovljene lokacije (Gunja)	5/6	1,39x10 <sup>3</sup> ± 1,42x10 <sup>3</sup>	17,9 – 3,90x10 <sup>3</sup>	3/6	9,05x10 <sup>2</sup> ± 8,30x10 <sup>2</sup>	1,25x10 <sup>2</sup> – 1,62x10 <sup>3</sup>
Neobnovljene lokacije (Gunja)	1/5	3,25x10 <sup>2</sup> ± 0	-	0/5	-	-
Kontrolne lokacije (Gornji Stupnik)	2/6	99 ± 89,5	35,7 – 1,62x10 <sup>2</sup>	2/6	2,52x10 <sup>2</sup> ± 3,31x10 <sup>2</sup>	17,9 – 4,87x10 <sup>2</sup>
<b>sekcija <i>Versicolores</i></b>						
	<b>DG-18</b>			<b>DRBC</b>		
	CFU/g			CFU/g		
	n/N	$\bar{x} \pm SD$	Min – Maks	n/N	$\bar{x} \pm SD$	Min – Maks
Obnovljene lokacije (Gunja)	5/6	5,61x10 <sup>4</sup> ± 1,16x10 <sup>5</sup>	1,62x10 <sup>3</sup> – 2,92x10 <sup>5</sup>	1/6	1,87x10 <sup>5</sup> ± 0	-
Neobnovljene lokacije (Gunja)	2/5	3,69x10 <sup>2</sup> ± 3,96x10 <sup>2</sup>	89,3 – 6,49x10 <sup>2</sup>	2/5	1,22x10 <sup>3</sup> ± 5,71x10 <sup>2</sup>	8,12x10 <sup>2</sup> – 1,62x10 <sup>3</sup>
Kontrolne lokacije (Gornji Stupnik)	5/6	8,22x10 <sup>2</sup> ± 7,73x10 <sup>2</sup>	53,6 – 1,79x10 <sup>3</sup>	1/6	4,55x10 <sup>3</sup> ± 0	-

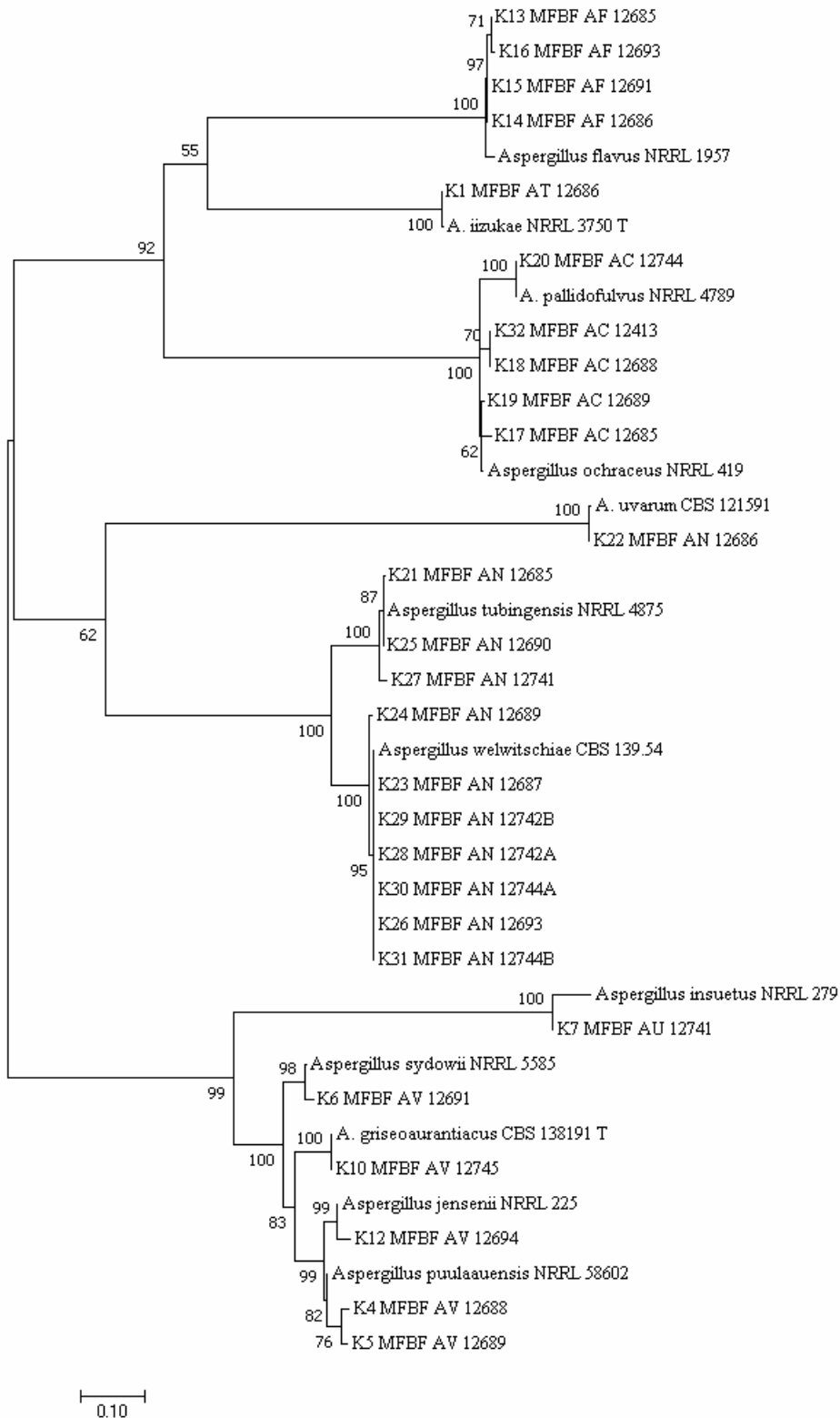
#### 4.2 MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA IZOLATA ASPERGILA

Prikupljeni izolati aspergila (N = 26) iz prašine na temelju genskog markera *CaM* identificirani su u dvanaest različitih vrsta: *Circumdati* (*A. ochraceus*, *A. pallidofulvus*), *Flavi* (*A. flavus*), *Nigri* (*A. tubingensis*, *A. uvarum* i *A. welwitschiae*), *Versicolores* (*A. griseoaurantiacus*, *A. jensenii*, *A. puulaauensis*, i *A. sydowii*), a dva izolata morfoloških sličnosti s aspergilima iz sekcije *Versicolores* identificirani su kao vrste iz sekcije *Terrei* (*A. iizukae*, N = 1) i *Usti* (*A. insuetus*, N = 1). U tablici 6 svaki od analiziranih izolata pridružen je odgovarajućoj vrsti te lokaciji uzorkovanja. Aspergili izolirani iz kućne prašine koja je prikupljena na obnovljenim lokacijama u Gunji pokazali su najveću bioraznolikost obzirom te su prikupljeni izolati identificirani kao 7 različitih vrsta: *A. flavus*, *A. iizukae*, *A. ochraceus*, *A. puulaauensis*, *A. tubingensis*, *A. uvarum* i *A. welwitschiae*. Među izolatima aspergila iz neobnovljenih lokacija identificirane su 4 različite vrste: *A. flavus*, *A. welwitschiae*, *A. sydowii* i *A. jensenii*, a iz kontrolnog područja u Gornjem Stupniku 5 različitih vrsta: *A. griseoaurantiacus*, *A. pallidofulvus*, *A. tubingensis*, *A. welwitschiae*.

Filogenetičko stablo (slika 1) potvrđuje identitet pojedinih izolata aspergila, asignira ih pripadajućim sekcijama uz međusobnu filogenetičku povezanost.

Tablica 6. Identificirani izolati aspergila iz prašine s naznačenih lokacija

<b>Sekcija</b>	<b>Vrsta</b>	<b>MFBF</b>	<b>Lokacija</b>
<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	AC 12685	Gunja, obnovljene lokacije
<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	AC 12688	Gunja, obnovljene lokacije
<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	AC 12689	Gunja, obnovljene lokacije
<i>Circumdati</i>	<i>A. pallidofulvus</i>	AC 12744	Gornji Stupnik, kontrolne lokacije
<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	AF 12685	Gunja, obnovljene lokacije
<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	AF 12686	Gunja, obnovljene lokacije
<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	AF 12691	Gunja, neobnovljene lokacije
<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	AF 12693	Gunja, neobnovljene lokacije
<i>Nigri</i>	<i>A. tubingensis</i>	AN 12685	Gunja, obnovljene lokacije
<i>Nigri</i>	<i>A. tubingensis</i>	AN 12690	Gunja, obnovljene lokacije
<i>Nigri</i>	<i>A. tubingensis</i>	AN 12741	Gornji Stupnik, kontrolne lokacije
<i>Nigri</i>	<i>A. uvarum</i>	AN 12686	Gunja, obnovljene lokacije
<i>Nigri</i>	<i>A. welwitschiae</i>	AN 12687	Gunja, obnovljene lokacije
<i>Nigri</i>	<i>A. welwitschiae</i>	AN 12689	Gunja, obnovljene lokacije
<i>Nigri</i>	<i>A. welwitschiae</i>	AN 12693	Gunja, neobnovljene lokacije
<i>Nigri</i>	<i>A. welwitschiae</i>	AN 12742A	Gornji Stupnik, kontrolne lokacije
<i>Nigri</i>	<i>A. welwitschiae</i>	AN 12742B	Gornji Stupnik, kontrolne lokacije
<i>Nigri</i>	<i>A. welwitschiae</i>	AN 12744A	Gornji Stupnik, kontrolne lokacije
<i>Nigri</i>	<i>A. welwitschiae</i>	AN 12744B	Gornji Stupnik, kontrolne lokacije
<i>Terrei</i>	<i>A. iizukae</i>	AT 12686	Gunja, obnovljene lokacije
<i>Usti</i>	<i>A. insuetus</i>	AU 12741	Gornji Stupnik, kontrolne lokacije
<i>Versicolores</i>	<i>A. puulaauensis</i>	AV 12688	Gunja, obnovljene lokacije
<i>Versicolores</i>	<i>A. puulaauensis</i>	AV 12689	Gunja, obnovljene lokacije
<i>Versicolores</i>	<i>A. sydowii</i>	AV 12691	Gunja, neobnovljene lokacije
<i>Versicolores</i>	<i>A. jensenii</i>	AV 12694	Gunja, neobnovljene lokacije
<i>Versicolores</i>	<i>A. griseoaurantiacus</i>	AV 12745	Gornji Stupnik, kontrolne lokacije

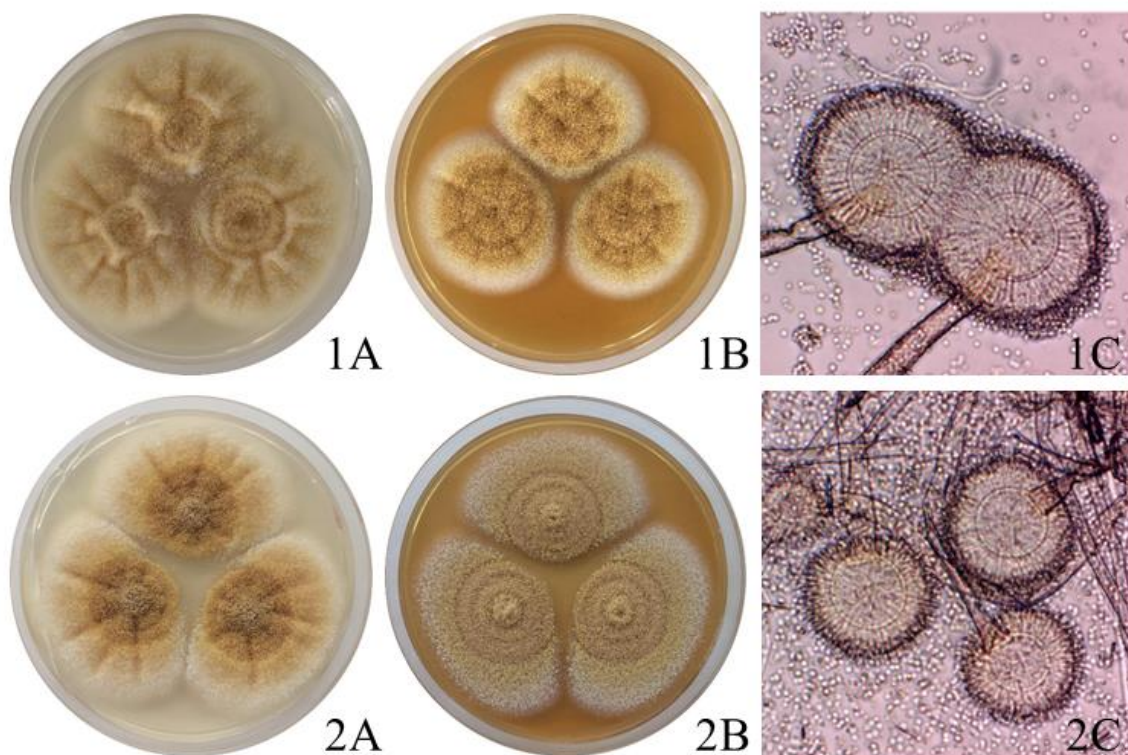


Slika 1. Filogenetičko stablo temeljeno na usporedbi slijedova nukleotida genskog markera *CaM*. Brojčane vrijednosti uz pojedini ogranak odgovaraju bootstrap vrijednostima ogranka. T=ex-type.

## 4.3. MORFOLOŠKA OBILJEŽJA IDENTIFICIRANIH VRSTA

Za opis makroskopskih obilježja i mikromorfologije različitih vrsta aspergila korištene su hranjive podloge CYA i MEA. S druge strane, CREA agar je korišten kako bi se utvrdilo je li ispitivana vrsta aspergila proizvođač kiseline. Naime, u CREA agar ugrađen je kiselo-bazni indikator bromkrezol ljubičasto koji pri pH vrijednosti nižoj od 6,8 mijenja boju iz ljubičaste u žutu.

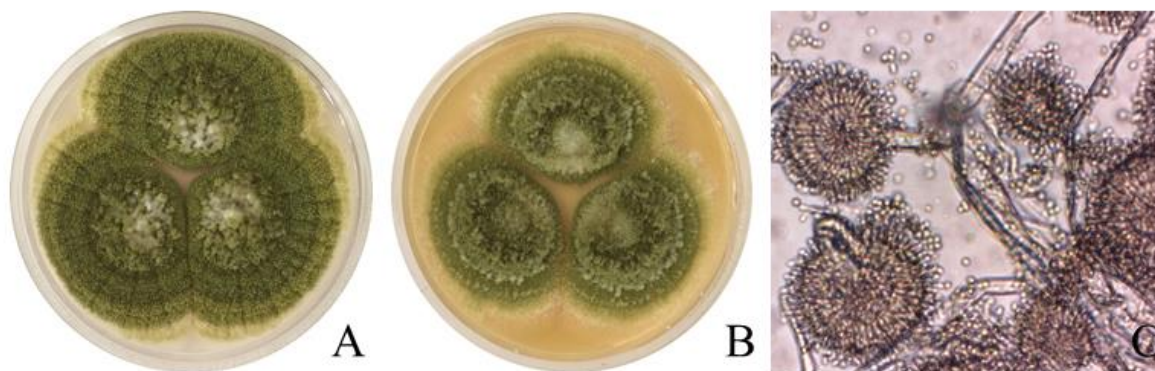
Obe identificirane vrste aspergila iz sekcije *Circumdati*, *A. ochraceus* i *A. pallidofulvus* (slika 2) formiraju brzorastuće kolonije promjera 50 – 60 mm žute do oker-žute boje na CYA (slika 2, 1A i 2A) i MEA (slika 2, 1B i 2B) agaru. Analizom mikromorfologije za obje vrste uočene su velike konidijalne glavice, nešto veće kod *A. ochraceus*, konidiofora grubih stijenki s velikim okruglim vezikulom oko kojih su raspoređene cilindrične metule i fialide (slika 2, 1C i 2C). Vrste iz ove sekcije nisu rasle na CREA agaru, niti su lučile kiseline.



Slika 2. Morfologija kolonija *Aspergillus* vrsta iz sekcije *Circumdati*: 1 *A. ochraceus*, 2 *A. pallidofulvus* nakon uzgoja 7 dana pri 25 °C na hranjivim podlogama CYA (A) i MEA (B). Mikromorfologija konidijalnih glavica (C) nakon uzgoja 5 dana pri 25 °C na MEA.

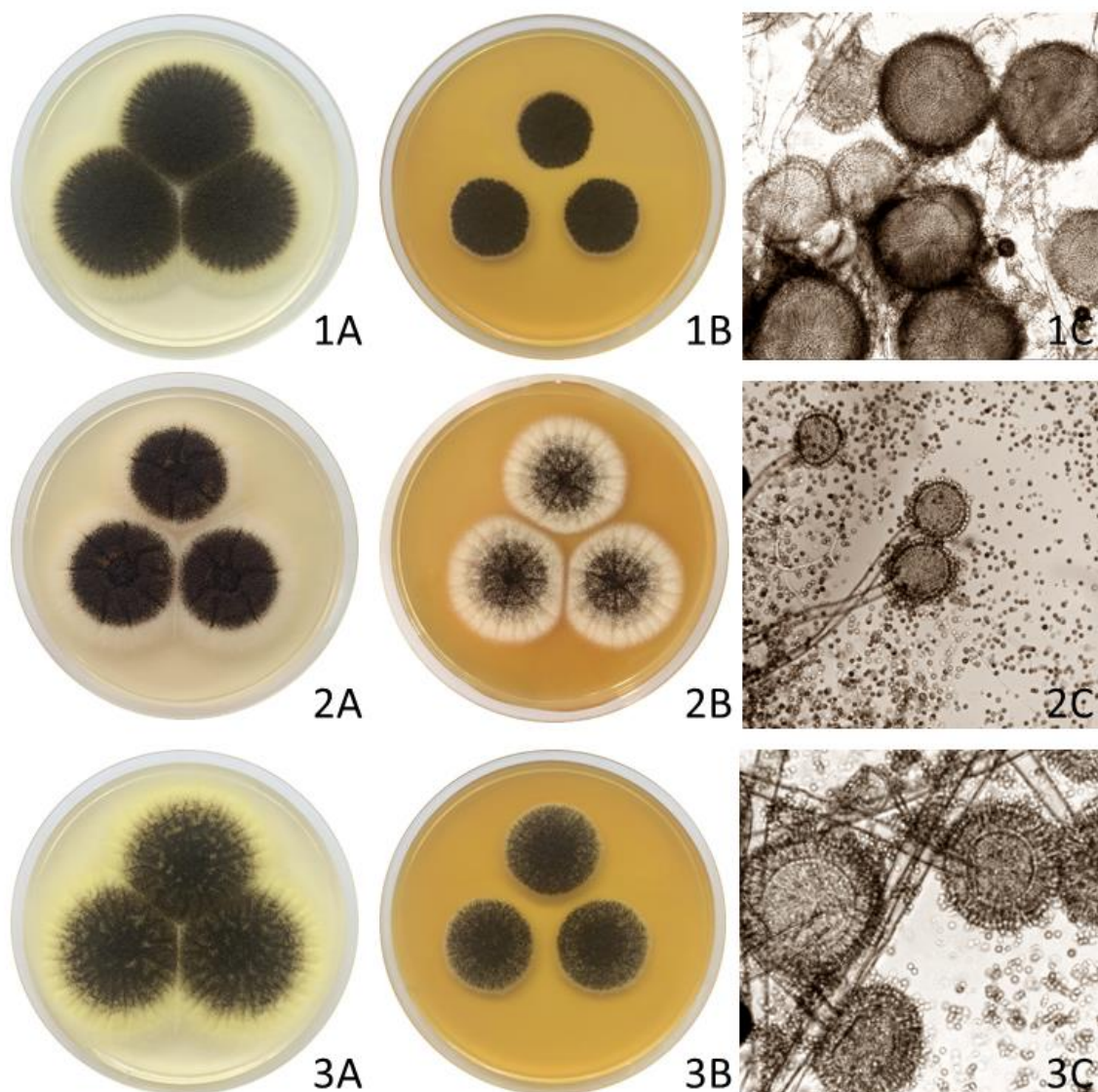


Vrstu *A. flavus* (sekcije *Flavi*) karakteriziraju brzorastuće zelene kolonije promjera 65 – 75 mm na CYA agaru (slika 3A), odnosno 55 – 65 mm na MEA agaru (slika 3B). Analizom mikromorfologije uočene su konidijalne glavice, manje u odnosu na vrste iz sekcije *Circumdati*, glatkih konidiofora s okruglim vezikulom i cilindričnim fijalidama (slika 3C).



Slika 3. Morfologija kolonija *Aspergillus* vrste iz sekcije *Flavi*, *A. flavus* nakon uzgoja 7 dana pri 25 °C na hranjivim podlogama CYA (A) i MEA (B). Mikromorfologija konidijalnih glavica (C) nakon uzgoja 5 dana pri 25 °C na MEA.

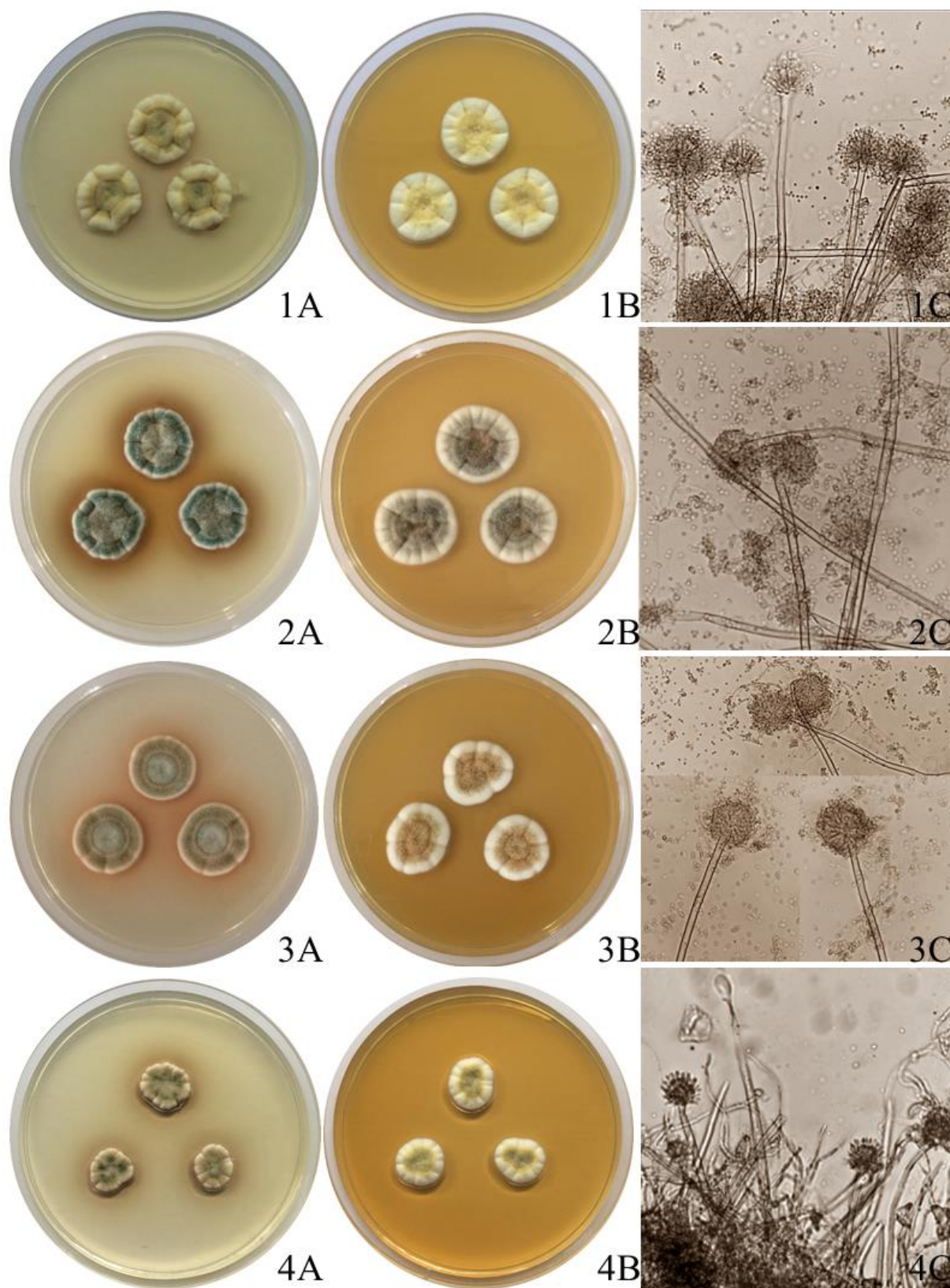
Među crnim aspergilima identificirane su tri različite vrste *A. tubingensis*, *A. uvarum* i *A. welwitschiae* vrlo sličnih morfoloških obilježja. Formiraju brzorastuće kolonije, crne ili smeđe-crne boje sa bijelim rubom. Vrste *A. tubingensis* na CYA agaru ima kolonije promjera 45 – 55 mm (slika 4, 1A), a na MEA agaru 20 – 23 mm (slika 4, 1B). Analizom mikromorfologije uočen je glatki konidiofor s okruglim vezikulom te konidijalna glavica građena od metula i fialida cilindričnog oblika (slika 4, 1C). Kolonija vrste *A. uvarum* na CYA agaru ima promjer 50 – 55 mm (slika 4, 2A), a na MEA agaru 40 – 45 mm (slika 4, 2B). Konidijalne glavice nešto su manje u odnosu na *A. tubingensis* (slika 4, 2C). Za *A. welwitschiae* na CYA agaru izmjeren je promjer 55 – 60 mm (slika 4, 3A). Na MEA agaru raste sporije pa je nakon jednakog perioda inkubacije izmjeren gotovo dvostruko manji promjer od 25 – 28 mm (slika 4, 3B). Konidijalne glavice slične su onima vrste *A. tubingensis* te ih karakteriziraju glatki konidiofori okruglih vezikula i glavice građene od metula i fialida oko kojih se nalaze smeđe-crne konidije (slika 4, 3C).



Slika 4. Morfologija kolonija *Aspergillus* vrsta iz sekcije *Nigri*: 1 *A. tubingensis*, 2 *A. uvarum*, 3 *A. welwitschiae* nakon uzgoja 7 dana pri 25 °C na hranjivim podlogama CYA (A) i MEA (B). Mikromorfologija konidijalnih glavica (C) nakon uzgoja 5 dana pri 25 °C na MEA.

Identificirane vrste iz sekcije *Versicolores* (*A. puulaauensis*, *A. sydowii*, *A. griseoaurantiacus* i *A. jensenii* prikazane su na slici 5. Kolonije rastu sporo i na CYA i na MEA agaru. Prvih su par dana bijele boje, a zatim postanu žute, narančaste, zelene, putenaste i sl. Promjeri kolonija vrste *A. puulaauensis* na CYA i MEA agaru su 17 – 20 mm (slika 5, 1A i 1B), a analizom mikromorfologije, uočeno je da su konidiofori glatki, bijelo-žute boje, vezikul je kruškolik, a konidijalna glavica građena od metula i fjalida (slika 5, 1C). Kolonije vrste *A. sydowii* na CYA agaru su promjera oko 20 mm (slika 5, 2A) i na MEA agaru 23 – 25 mm (slika 5, 2B). Konidiofori su glatki i bezbojni, vezikul je okrugao, a konidijalna glavica također građena od

metula i fialida (slika 5, 2C). Vrsta *A. griseoaurantiacus* ima kolonije promjera na 20 – 22 mm CYA i MEA agaru (slika 5, 3A i 3B). Konidiofori su glatki, smeđe boje, vezikul je izdužen, a konidijalne glavice slične su metlicama karakterističnim za plijesni roda *Penicilium* (slika 5, 3C). Promjeri kolonija vrste *A. jensenii* su i na CYA i na MEA agaru 13 – 15 mm (slika 5, 4A i 4B). Konidiofori su kratki, bijelo-žute boje, vezikul je kruškolik, a konidijalna glavica građena je od metula i fialida (slika 5, 4C). Često su prisutne metlice kao kod plijesni roda *Penicillium*.



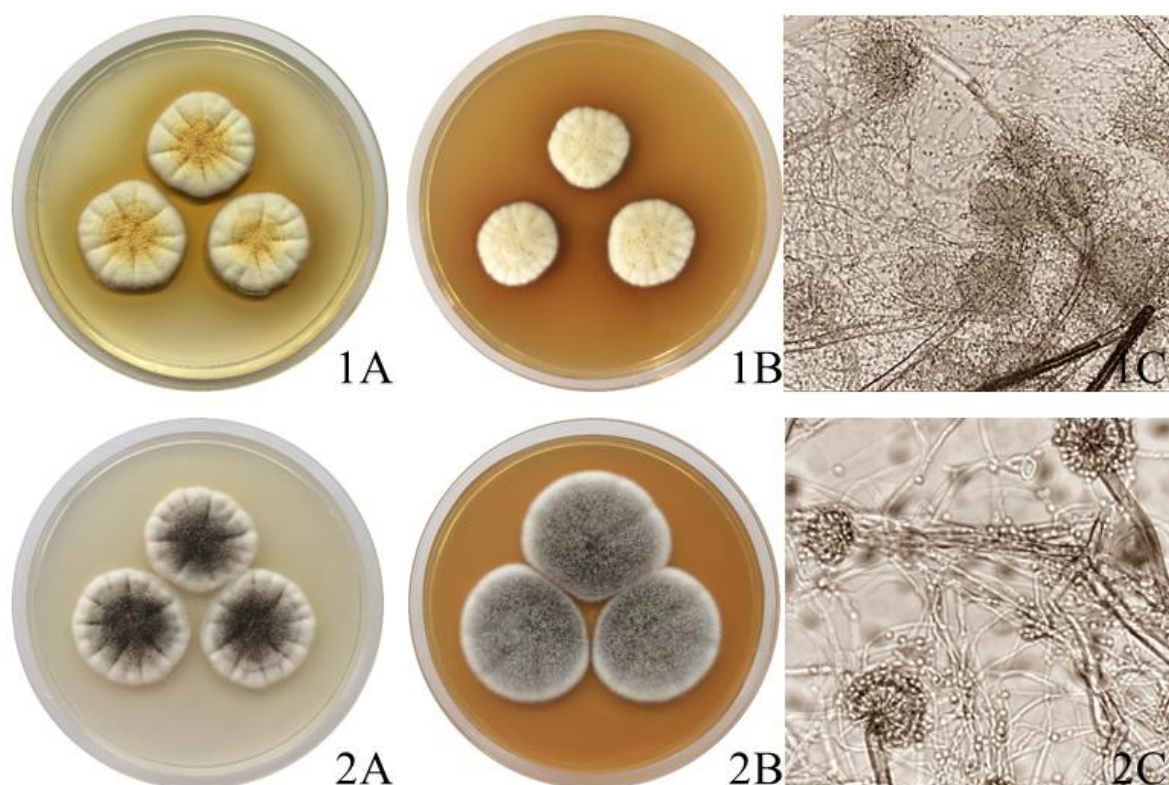
Slika 5. Morfologija kolonija *Aspergillus* vrsta iz sekcije *Versicolores*: 1 *A. puulaauensis*, 2 *A. sydowii*, 3 *A. griseoaurantiacus*, 4 *A. jensenii* nakon uzgoja 7 dana pri 25 °C na hranjivim

podlogama CYA (A) i MEA (B). Mikromorfologija konidijalnih glavica (C) nakon uzgoja 5 dana pri 25 °C na MEA.

Također su izolirane i analizirane vrste koje nisu pripadnici ni jedne od četiri sekcija od interesa, iako su po makroskopskim obilježjima (pigmentacija konidija, promjer) slični vrstama sekcije *Versicolores*. To su *A. iizukae* (N = 1) iz sekcije *Terrei* i *A. insuetus* (N = 1) iz sekcije *Usti*. (slika 5.

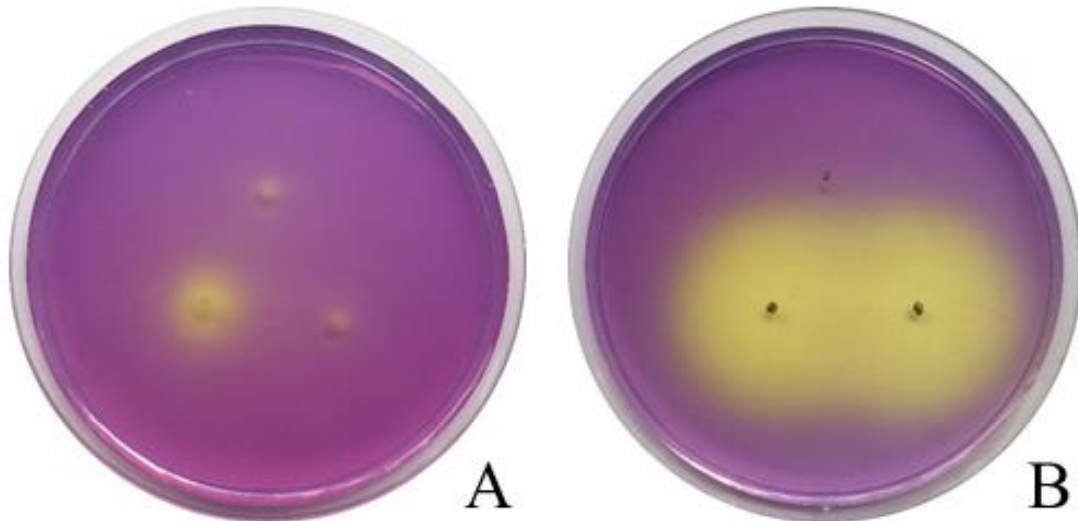
Kolonije vrste *A. iizukae* na CYA agaru žute su boje, promjera oko 25 mm (slika 6, 1A), a na MEA agaru bijele do žute boje i promjera oko 20 mm (slika 6, 1B). Konidiofori su glatki, vezikul je okrugao do kruškolik, a konidijalne glavice su građene od metula i fjalida (slika 6, 1C).

Kolonije vrste *A. insuetus* sive su boje i na CYA agaru promjera 30 mm (slika 6, 2A), a na MEA 35 – 40 mm (slika 6, 2B), a analizom mikromorfologije uočeno je da je konidiofor grubih stijenki i različito obojen (zeleno do žuto-sivo), a vezikul gotovo okrugao (slika 6, 2C). Konidijalne su glavice građene od metula i fjalida te su lagano izdužene (slika 6, 2C).



Slika 5. Morfologija kolonija *Aspergillus* vrsta iz sekcije *Terrei*: 1 *A. iizukae* i sekcije *Usti*: 2 *A. insuetus*, nakon uzgoja 7 dana pri 25 °C na hranjivim podlogama CYA (A) i MEA (B). Mikromorfologija konidijalnih glavica (C) nakon uzgoja 5 dana pri 25 °C na MEA.

Među svim isptanim vrstama samo su vrste *A. flavus* (slika 7 A) i *A. welwitschiae* (slika 7 B) pokazale slab porast na CREA agaru. Pri tome je intenzivnije izlučivanje kiseline uočeno kod vrste *A. welwitschiae* (slika 7 B).



Slika 6. Porast kolonija vrste *A. flavus* (A) i *A. welwitschiae* (B), nakon uzgoja 7 dana pri 25 °C na hranjivoj podlozi CREA.

## 5. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja pokazali su razlike u kvantitativnom i kvalitativnom sastavu prašine s obzirom na lokacije uzorkovanja. Pri tome su uočene neke razlike ovisno o odabranoj hranjivoj podlozi. DG-18 agar je podloga nižeg  $a_w$ , u odnosu na DRBC pa se mogu očekivati razlike u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu poraslih plijesni. Iako DG-18 i DRBC podjednako podržavaju rast aspergila iz sekcija od interesa (Samson i sur., 2010) podaci u tablicama 4 i 5 ukazuju na razlike u izračunatim koncentracijama. One proizlaze iz razloga što brzorastući kserofilni aspergili iz sekcije *Aspergillus* na DG-18 agaru često dominiraju i prerastu aspergile iz većine ostalih sekcija što se u konačnici odražava na njihove koncentracije. U uzorcima prašine iz obnovljenih kuća u Gunji, aspergili su bili prisutni u najvišim koncentracijama ( $8,3 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^5$  CFU/g) koje su bile 5 puta veće nego u neobnovljenim, odnosno oko 50 puta više u odnosu na kontrolne lokacije. Manji broj aspergila u prašini sa neobnovljenih lokacija proizlazi iz toga što se u ovoj prašini očekuje pojavnost plijesni karakterističnih za vanjski zrak u kojemu je općenito manje aspergila u odnosu na zatvorene prostore. Koncentracije aspergila iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* bile su višestruko veće u poplavom pogođenom području Gunje u odnosu na kontrolne lokacije. Pri tome aspergili iz sekcije *Flavi* nisu bili izolirani iz prašine s kontrolnih lokacija.

Mnoge vrste aspergila iz pojedinih sekcija ne mogu se razlikovati na temelju mikromorfologije i makroskopskih obilježja kolonija poraslih na različitim hranjivim podlogama. Iako je *ITS* tzv. *barcode* za aspergile, tek primjenom sekundarnih genskih markera kao što je *CaM* moguće je razlikovati vrste unutar pojedinih sekcija (Samson, 2014). Međutim, na temelju porasta na specifičnoj hranjivoj podlozi kao što je CREA agar moguće je detektirati vrste proizvođače organskih kiselina kao što je pokazano za *A. flavus* i *A. welwitschiae*. Vrsta *A. flavus* luči aspergiličnu, ciklopiazonsku, kojičnu i 3-nitropropionsku kiselinu, a vrsta *A. welwitschiae* luči tensiuičnu kiselinu A, B, C, D i F (Samson i sur., 2014; Lamboni i sur., 2016).

Aspergili izolirani iz kućne prašine koja je prikupljena na obnovljenim lokacijama u Gunji pokazali su najveću bioraznolikost te je među njima identificirano 7 različitih vrsta: *A. flavus*, *A. iizukae*, *A. ochraceus*, *A. puulaauensis*, *A. tubingensis*, *A. uvarum* i *A. welwitschiae*. Vrste iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* pokazale su se najučestalijim vrstama aspergila i u opsežnom istraživanju uzoraka prašine prikupljene iz 9 različitih zemalja svijeta (Australija, Indonezija, Meksiko, Mikronezija, Novi Zeland, Južna Afrika, Tajland, UK i Urugvaj) u kojemu je 1160/7904 izolata plijesni iz prašine pripadalo aspergilima (Visagie i sur., 2014). U

nedavno provedenom istraživanju nakon uragana Sandy koji je zahvatio područje istočne obale SAD-a među 36 prikupljenih izolata identificirano je samo 3 različite vrste aspergila među kojima se najtoksičnijim pokazao izolat *A. niger* (Zhao i sur., 2017). Prema rezultatima istraživanja bioraznolikosti plijesni koje koloniziraju vlažne zidove među najčešće izolirane vrste aspergila spadaju *A. versicolor*, *A. flavus*, *A. sydowii*, *A. ochraceus* te aspergili iz sekcije *Aspergillus* (Andersen i sur., 2011). Istraživanjem poplavljenog područja u New Orleansu, SAD, nakon uragana Katrina i Rita u neobnovljenim kućama ustanovljeno je kako je mikoflora poplavom zahvaćenih kuća drugačija nego neoštećenih kuća te kako je nakon obnavljanja kuća smanjena količina plijesni (Bloom i sur., 2009).

Ranije provedenim istraživanjima na ljudskim staničnim linijama ekstrakti aspergila iz sekcija *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores* izoliranih iz zraka radnih sredina i mlina žitarica pokazali su toksični (citotoksični i genotoksični) i imunomodulacijski potencijal na stanicama adenokarcinoma pluća (A549) i stanicama monocitne leukemije (THP-1) induciranim u makrofage (Jakšić Despot, 2016). S obzirom na to da su istraživanjem bioraznolikosti aspergila u uzorcima prašine iz poplavom pogođenog područja identificirane vrste aspergila poznatog potencijala toksičnosti (*A. flavus*, *A. welwitschiae*, *A. tubingensis*, *A. jensenii*) po inhalaciji kontaminirane prašine može doći do ispoljavanja njihovih toksičnih učinaka u dišnom sustavu kod izloženih ljudi.

Među najtoksičnije sekundarne metabolite vrsta *A. welwitschiae* i *A. ochraceus* spada OTA. Dostupni podaci u literaturi upućuju na uzročno-posljedičnu vezu između inhalacije zraka opterećenog plijesnima proizvođačima OTA i glomeruloskleroze te akutnog zatajenja bubrega i inhalacije (Hope i Hope, 2012; Di Paolo i sur., 1994). Vrsta *A. flavus* proizvodi kancerogeni mikotoksin AFB<sub>1</sub>. Iako je toksični i kancerogeni učinak AFB<sub>1</sub> primarno usmjeren na jetru i povezuje se s ingestijom kontaminirane hrane, AFB<sub>1</sub> je detektiran i u krvi profesionalno izloženih radnika (Brera i sur., 2002; Selim i sur., 1998). Također je utvrđena i povezanost inhalacije AFB<sub>1</sub> i karcinoma pluća kod radnika zaposlenih u obradi kikirikija i sjemenki lana kontaminiranih aflatoksinogenim vrstama (Hayes i sur., 1984). Međutim, rezultati nedavno provedenog istraživanja na A549 stanicama i THP-1 stanicama induciranim u makrofage upućuju na toksičnost ekstrakata vrste *A. flavus* bez obzira radi li se o vrsti koja proizvodi AFB<sub>1</sub> ili ne (Jakšić Despot, 2016). Jedan od najtoksičnijih mikotoksina za stanice dišnog sustava je STC kojeg proizvode gotovo sve vrste iz sekcije *Versicolores* (Jurjević i sur., 2013; Jakšić Despot i sur., 2016), a među njima i ovdje identificirane vrste *A. jensenii*, *A. puulaauensis*, *A. sydowii* i *A. griseoaurantiacus*. U nedavnom istraživanju STC je detektiran u uzorcima prašine iz mlina žitarica u koncentraciji od 0,06-2,35 µg/g, a procijenjeno je da inhalacijom u dišni



sustav izloženih ljudi može dospjeti do 0,42 µg (Jakšić Despot i sur., 2016). S obzirom na to da je toksičnost ove koncentracije STC pokazana u uvjetima *in vitro* (Jakšić Despot i sur., 2016), pretpostavlja se da postoji značajan zdravstveni rizik izloženosti ljudi inhalabilnoj prašini koja je opterećena sa STC. U istraživanju obuhvaćenom ovim studentskim radom, utvrđene su visoke koncentracije aspergila proizvođača STC u uzorcima prašine iz obnovljenih kuća u Gunji ( $5,61 \times 10^4 \pm 1,16 \times 10^5$  CFU/g). Ove koncentracije su bile do 500 puta veće u odnosu na koncentracije u prašini iz kontrolnog područja. S obzirom na to da identificirane vrste aspergila imaju genetski potencijal biosinteze STC, po inhalaciji prašine opterećene visokom koncentracijom aspergila iz sekcije *Versicolores* može doći do ispoljavanja toksičnih učinaka u dišnom sustavu izloženih ljudi.

Osim toksičnih učinaka povezanih sa mikotoksinima, aspergili se često povezuju s alergijama (Shin i sur., 2004; Kurup i Banerjee, 2000). Ovi simptomi mogu biti osobito izraženi u uvjetima povećanih koncentracija aspergila u prašini kakve su detektirane u uzorcima prašine iz Gunje. Pored toga, ovisno o stanju imunosnog sustava izloženih ljudi, neke od identificiranih vrsta uzročnici su mikoza, primjerica *A. flavus* i aspergili iz sekcije *Nigri* (Hedayati i sur., 2007; Klich, 2006). Nepovoljne učinke po zdravlje ljudi moguće je prevenirati sanacijom poplavom pogođenih objekata te redovitim čišćenjem i provjetravanjem prostora u kojima ljudi svakodnevno borave.

Jedna od zanimljivost ovog istraživanja je identifikacija vrste *A. iizukae* izolirane iz prašine prikupljene na obnovljenoj lokaciji u Gunji. Prema dostupnim podacima o sekundarnim metabolitima koje proizvodi ova vrsta postoji opravdani potencijal primjene u farmaceutskoj industriji. Naime, *A. iizukae* izoliran je s površine biljke sikavica, *Silybum marianum* koja se već stoljećima koristi u liječenju jetrenih oboljenja, uključujući ciroze i hepatitisa. Sikavica proizvodi silimarin koji je mješavina najmanje sedam flavonolignana, kao što su silibin A i B, izosilibin A i B te flavonoida taksifolina (Kroll i sur., 2007). Istraživanje je pokazalo kako dodatak dijelova listova *S. marianum* stimulira plijesan *A. iizukae* na biosintezu flavonolignana silibina A i B (Kroll i sur., 2007). Prema dostupnim istraživanjima vrsta *A. iizukae* izolirana je iz zemlje i zraka (Hubka i sur., 2015), ali i kukca *Gryllus testaceus* (Li i sur., 2016). Po prvi put je ova vrsta izolirana iz kućne prašine i to u obnovljenim lokacijama u Gunji. Međutim, ova pojava nije neuobičajena s obzirom na to da ljudi, a pogotovo djeca, redovito unose određene količine zemlje izvana u kuću preko obuće, a i kućni ljubimci pridonose raznolikosti mikoflore u kućnoj prašini. Tijekom provođenja uzorkovanja stanovnici obnovljenih kuća u Gunji požalili su se na brojnost neuobičajenih kukaca koje su primijetili u svojim domovima nakon poplave.

Iako identifikacija kukaca izlazi iz okvira ovog istraživanja, može se pretpostaviti da oni svakako pridonose bioraznolikosti plijesni u kućnoj prašini.

Na temelju genskog markera *CaM* izolat koji je morfološki pokazivao sličnost s aspergilima iz sekcije *Versicolores* identificiran je kao vrsta *A. insuetus* srodne sekcije *Usti* što je potvrđeno i filogenetičkom analizom među prikupljenim izolatima i standardnim identificiranim sojevima prikupljenim iz *online* dostupne baze NCBI. Vrste iz ove sekcije većinom su izolirane iz tla (Samson i sur., 2011), stoga ne čudi ni prisutnost vrste *A. insuetus* u uzorku kućne prašine iz kuće s kontrolne lokacije. Zanimljivo je kako je *A. insuetus* izoliran i iz mediteranske morske spužve (*Psammocinia sp.*), a od metabolita luči meroterpene insuetolide i seskviterpene (Houbraken i sur., 2007). Iako se ova vrsta ne povezuje s infekcijama kod ljudi, srodna vrsta, *A. ustus*, povezuje se s infekcijama slabog odgovora na antifungalnu terapiju kod imunokompromitiranih pacijenata (Panackal i sur., 2006).

## 6. ZAKLJUČCI

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

- Koncentracije aspergila u prašini ( $8,3 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^5$  CFU/g) iz poplavom pogođenog područja Gunje veće su 50 puta u odnosu na one u kontrolnim uzorcima.
- Aspergili iz sekcija *Circumdati*, *Nigri* i *Versicolores* učestaliji u prašini prikupljenoj na obnovljenim lokacijama u Gunji, a aspergili iz sekcije *Flavi* na neobnovljenim lokacijama.
- Osobito visoke koncentracije izmjerene su za aspergile iz sekcije *Versicolores* ( $5,61 \times 10^4 \pm 1,16 \times 10^5$  CFU/g) te su bile do 200 puta veće u odnosu na koncentracije izmjerene na kontrolnim lokacijama.
- Molekularna metoda identifikacije pomoću genskog markera *CaM* omogućila je razlikovanje 10 različitih vrsta raspoređenih u sekcije od interesa. Među njima su se najraznolikijima pokazali aspergili iz sekcije *Versicolores* koji su identificirani kao četiri različite vrste (*A. griseoaurantiacus*, *A. jensenii*, *A. puulaauensis* i *A. sydowii*). Među izolatima iz sekcije *Nigri* identificirane su tri različite vrste (*A. tubingensis*, *A. uvarum* i *A. welwitschiae*), dvije unutar sekcije *Circumdati* (*A. ochraceus* i *A. pallidofulvus*) te *A. flavus* kao jedina vrsta unutar sekcije *Flavi*.
- Najveća je bioraznolikost aspergila bila među prikupljenim izolatima (13/26) iz prašine iz obnovljenih lokacija te je identificirano 7 različitih vrsta iz sekcija *Circumdati* (*A. ochraceus*), *Flavi* (*A. flavus*), *Nigri* (*A. tubingensis*, *A. uvarum* i *A. welwitschiae*), *Terrei* (*A. iizukae*) i *Versicolores* (*A. puulaauensis*).
- Na neobnovljenim lokacijama prikupljeno je 5/26 izolata aspergila, a među njima su identificirane tri različite vrste iz sekcija *Flavi* (*A. flavus*), *Nigri* (*A. welwitschiae*) i *Versicolores* (*A. sydowii*).
- Među 8/26 izolata aspergila iz prašine s kontrolnih lokacija identificirano je pet različitih vrsta aspergila iz sekcije *Circumdati* (*A. pallidofulvus*), *Nigri* (*A. welwitschiae*), *Versicolores* (*A. griseoaurantiacus*) i *Usti* (*A. insuetus*).
- Inhalacijom prašine opterećene povećanom koncentracijom aspergila može doći do ispoljavanja njihovih štetnih učinaka u dišnom sustavu izloženih ljudi, a obzirom na mikotoksinogeni potencijal identificiranih vrsta
- Ovi rezultati upućuju na važnost temeljite sanacije građevinskih objekata nakon poplave, a s ciljem dugoročne prevencije zdravstvenih rizika.

## 7. LITERATURA

- Andersen B, Frisvad JC, Søndergaard I, Rasmussen IS, Larsen LS (2011) Associations between fungal species and water-damaged building materials. *Appl Environ Microbiol* **77**: 4180–4188.
- Bloom E, Grimsley LF, Pehrson C, Lewis J, Larsson L (2009) Molds and mycotoxins in dust from water-damaged homes in New Orleans after hurricane Katrina. *Indoor Air* **19**: 153–158.
- Brera C, Caputi R, Miraglia M, Iavicoli I, Salerno A, Carelli G (2002) Exposure assessment to mycotoxins in workplaces: aflatoxins and ochratoxin A occurrence in airborne dusts and human sera. *Microchem J* **73**: 167–173.
- Ciklona Donat u brojkama: koliko je kiše palo? (2014) <https://www.crometeo.hr/ciklona-donat-u-brojkama-koliko-je-kise-palo/>, pristupljeno 20.04.2018.
- Di Paolo N, Guarnieri A, Garosi G, Sacchi G, Mangiarotti AM, Di Paolo M (1994) Inhaled mycotoxins lead to acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* **9 Suppl 4**: 116–120.
- Domijan A-M, Gajski G, Novak Jovanović I, Gerić M, Garaj-Vrhovac V (2015) In vitro genotoxicity of mycotoxins ochratoxin A and fumonisin B(1) could be prevented by sodium copper chlorophyllin--implication to their genotoxic mechanism. *Food Chem* **170**: 455–462.
- Engelhart S, Loock A, Skutlarek D, Sagunski H, Lommel A, Färber H, Exner M (2002) Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3886–3890.
- Fog Nielsen K (2003) Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genet Biol* **39**: 103–117.
- Frisvad JC, Larsen TO, Thrane U, Meijer M, Varga J, Samson RA, Nielsen KF (2011) Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. *PLoS One* **6**: e23496.
- Fungaro MHP, Ferranti LS, Massi FP, Da Silva JJ, Sartori D, Taniwaki MH, Frisvad JC, Iamanaka BT (2017) *Aspergillus labruscus* sp. nov., a new species of *Aspergillus* section *Nigri* discovered in Brazil. *Sci Rep* **7**: 6203.

- Ghosh SK, Desai MR, Pandya GL, Venkaiah K (1997) Airborne aflatoxin in the grain processing industries in India. *Am Ind Hyg Assoc J* **58**: 583–586.
- Gravesen S, Nielsen PA, Iversen R, Nielsen KF , 1999. Microfungal contamination of damp buildings - Examples of risk constructions and risk materialsU: Environmental Health Perspectives. str. 505–508.
- Harima N, Inoue T, Kubota T, Okada O, Ansai S, Manabe M, Ichinoe M, Kasai T (2004) A case of otomycosis caused by *Aspergillus sclerotiorum*. *J Dermatol* **31**: 949–950.
- Hayes RB, van Nieuwenhuize JP, Raatgever JW, Ten Kate FJW (1984) Aflatoxin exposures in the industrial setting: An epidemiological study of mortality. *Food Chem Toxicol* **22**: 39–43.
- Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW (2007) *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* **153**: 1677–1692.
- Hooper D, Bolton V, Guilford F, Straus D (2009) Mycotoxin detection in human samples from patients exposed to environmental molds. *Int J Mol Sci* **10**: 1465–1475.
- Hope JH, Hope BE (2012) A review of the diagnosis and treatment of ochratoxin a inhalational exposure associated with human illness and kidney disease including focal segmental glomerulosclerosis. *J Environ Public Health* **2012**: 1–10.
- IARC (1986) IARC monographs on the evaluation of cancerogenic risks to humans. Some naturally occurring and synthetic food components: furocournarins and ultraviolet radiation. *IARC Monogr* **40**: 66–77.
- IARC (2012) IARC monographs. A review of human cancerogens: Aflatoxins. *IARC Monogr Eval Carcinog risk to humans* **100B**: 225–248.
- Jakšić Despot D, Kocsubé S, Bencsik O, Kecskeméti A, Szekeres A, Vágvölgyi C, Varga J, Šegvić Klarić M (2016) Species diversity and cytotoxic potency of airborne sterigmatocystin-producing *Aspergilli* from the section *Versicolores*. *Sci Total Environ* **562**: 296–304.
- Jakšić Despot D, Kocsubé S, Bencsik O, Kecskeméti A, Szekeres A, Vágvölgyi C, Varga J, Šegvić Klarić M (2017) New sterigmatocystin-producing species of *Aspergillus* section

- Versicolores* from indoor air in Croatia. *Mycol Prog* **16**: 63–72.
- Jurjević Z, Peterson SW, Horn BW (2012a) *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. *IMA Fungus* **3**: 59–79.
- Jurjević Z, Peterson SW, Stea G, Solfrizzo M, Varga J, Hubka V, Perrone G (2012b) Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from indoor air. *IMA Fungus* **3**: 159–173.
- Jurjević Z, Peterson SW, Solfrizzo M, Peraica M (2013) Sterigmatocystin production by nine newly described *Aspergillus* species in section *Versicolores* grown on two different media. *Mycotoxin Res* **29**: 141–145.
- Klich MA (2006) Identification of clinically relevant *Aspergilli*. *Med Mycol* **44**: 127–131.
- Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH (2009) *Aspergillus flavus*: an emerging non-*fumigatus Aspergillus* species of significance. *Mycoses* **52**: 206–222.
- Kroll DJ, Shaw HS, Oberlies NH (2007) Milk thistle Nomenclature: Why it matters in cancer research and pharmacokinetic studies. *Integr Cancer Ther* **6**: 110–119.
- Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* **33**:1870-1874.
- Kurup VP, Banerjee B (2000) Fungal allergens and peptide epitopes. *Peptides* **21**: 589–599.
- Lamboni Y, Nielsen KF, Linnemann AR, Gezgin Y, Hell K, Nout MJR, Smid EJ, Tamo M, van Boekel MAJS, Hoof JB, Frisvad JC (2016) Diversity in secondary metabolites including mycotoxins from strains of *Aspergillus* section *Nigri* isolated from raw cashew nuts from Benin, West Africa. *PLoS One* **11**: e0164310.
- Li LJ, Li TX, Kong LY, Yang MH (2016) Antioxidant aromatic butenolides from an insect-associated *Aspergillus iizukae*. *Phytochem Lett* **16**: 134–140.
- Logrieco AF, Haidukowski M, Susca A, Mulè G, Munkvold GP, Moretti A (2014) *Aspergillus* section *Nigri* as contributor of fumonisin B(2) contamination in maize. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **31**: 149–155.
- Manikandan P, Varga J, Kocsubé S, Revathi R, Anita R, Dóczy I, Németh TM, Narendran V, Vágvölgyi C, Bhaskar M, Manoharan C, Samson RA, Kredics L (2010) Keratitis caused

- by the recently described new species *Aspergillus brasiliensis*: two case reports. *J Med Case Rep* **4**: 68.
- Mota IA, Borrego LM (2016) Allergic Response to Fungal ExposureU: Environmental Mycology in Public Health. Elsevier, str. 35–43.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, pristupljeno 07.04.2018.
- Novey HS, Wells ID (1978) Allergic bronchopulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus ochraceus*. *Am J Clin Pathol* **70**: 840–843.
- Panackal AA, Imhof A, Hanley EW, Marr KA (2006) *Aspergillus ustus* infections among transplant recipients. *Emerg Infect Dis* **12**: 403–408.
- Peterson SW (2008) Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* **100**: 205–226.
- Pitt JI, Hocking AD (2009) Fungi and food spoilage. Boston, MA, Springer US.
- Rojas TI, Aira MJ (2012) Fungal biodiversity in indoor environments in Havana, Cuba. *Aerobiologia (Bologna)* **28**: 367–374
- Samson R a., Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B (2010) Food and indoor fungi, CBS laboratory manual series.
- Samson RA, Varga J, Meijer M, Frisvad JC (2011) New taxa in *Aspergillus* section *Usti*. *Stud Mycol* **69**: 81–97.
- 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 (2014) Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol* **78**: 141–173.
- Selim MI, Juchems AM, Popenorf W (1998) Assessing airborne aflatoxin B1 during on-farm grain handling activities. *Am Ind Hyg Assoc J* **59**: 252–256.
- Shang Y-L, Chen L-L, Zhang Z-H, Lu J (2012) A comparative study on the fungal communities of wheat Qu for Qingshuang-type Chinese rice wine. *J Inst Brew* **118**: 243–248.

- Shin S-H, Ponikau JU, Sherris DA, Congdon D, Frigas E, Homburger HA, Swanson MC, Gleich GJ, Kita H (2004) Chronic rhinosinusitis: an enhanced immune response to ubiquitous airborne fungi. *J Allergy Clin Immunol* **114**: 1369–1375.
- Silva DM, Batista LR, Rezende EF, Fungaro MHP, Sartori D, Alves E (2011) Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *nigri* using polyphasic taxonomy. *Brazilian J Microbiol* **42**: 761–773.
- Siqueira JPZ, Sutton DA, García D, Gené J, Thomson P, Wiederhold N, Guarro J (2016) Species diversity of *Aspergillus* section *Versicolores* in clinical samples and antifungal susceptibility. *Fungal Biol* **120**: 1458–1467.
- Siqueira JPZ, Sutton DA, Gené J, García D, Wiederhold N, Peterson SW, Guarro J (2017) Multilocus phylogeny and antifungal susceptibility of *Aspergillus* section *Circumdati* from clinical samples and description of *A. pseudosclerotiorum* sp. nov. *J Clin Microbiol* **55**: 947.
- Szigeti G, Kocsubé S, Dóczy I, Bereczki L, Vágvölgyi C, Varga J (2012) Molecular Identification and antifungal susceptibilities of black *Aspergillus* isolates from otomycosis cases in Hungary. *Mycopathologia* **174**: 143–147.
- Šegvić Klarić M, Daraboš D, Rozgaj R, Kašuba V, Pepeljnjak S (2010) Beauvericin and ochratoxin A genotoxicity evaluated using the alkaline comet assay: single and combined genotoxic action. *Arch Toxicol* **84**: 641–650.
- Šegvić Klarić M, Jakšić Despot D, Kopjar N, Rašić D, Kocsubé S, Varga J, Peraica M (2015) Cytotoxic and genotoxic potencies of single and combined spore extracts of airborne OTA-producing and OTA-non-producing *Aspergilli* in human lung A549 cells. *Ecotoxicol Environ Saf* **120**: 206–214.
- Šegvić Klarić M, Pepeljnjak S, Domijan A-M, Petrik J (2007) Lipid peroxidation and glutathione levels in porcine kidney PK15 cells after individual and combined treatment with fumonisin B(1), beauvericin and ochratoxin A. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **100**: 157–164.
- Tamura K i Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* **10**:512-526.



- Tochigi N, Okubo Y, Ando T, Wakayama M, Shinozaki M, Gocho K, Hata Y, Ishiwatari T, Nemoto T, Shibuya K (2013) Histopathological implications of *Aspergillus* infection in lung. *Mediators Inflamm* **2013**: 809798.
- Torres-Rodríguez JM, Madrenys-Brunet N, Siddat M, López-Jodra O, Jimenez T (1998) *Aspergillus versicolor* as cause of onychomycosis: report of 12 cases and susceptibility testing to antifungal drugs. *J Eur Acad Dermatology Venereol* **11**: 25–31.
- Tsang C-C, Hui TWS, Lee K-C, Chen JHK, Ngan AHY, Tam EWT, Chan JFW, Wu AL, Cheung M, Tse BPH, Wu AKL, Lai CKC, Tsang DNC, Que T-L, Lam C-W, Yuen K-Y, Lau SKP, Woo PCY (2016) Genetic diversity of *Aspergillus* species isolated from onychomycosis and *Aspergillus hongkongensis* sp. nov., with implications to antifungal susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis* **84**: 125–134.
- Varga J, Frisvad JC, Kocsubé S, Brankovics B, Tóth B, Szigeti G, Samson RA (2011a) New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud Mycol* **69**: 1–17.
- Varga J, Frisvad JC, Samson RA (2011b) Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Stud Mycol* **69**: 57–80.
- Visagie CM, Hirooka Y, Tanney JB, Whitfield E, Mwange K, Meijer M, Amend AS, Seifert KA, Samson RA (2014) *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world. *Stud Mycol* **78**: 63–139.
- Visagie CM, Varga J, Houbraken J, Meijer M, Kocsubé S, Yilmaz N, Fotedar R, Seifert KA, Frisvad JC, Samson RA (2014) Ochratoxin production and taxonomy of the yellow *Aspergilli* (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Stud Mycol* **78**: 1–61.
- Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill AH (1991) Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J Biol Chem* **266**: 14486–14490.
- Wani KA, Mamta K, Khan TA, Lone R (2014) Fungal contamination of carpet industry in Gwalior Madhya Pradesh (India). *Indoor Built Environ* **23**: 724–729.
- WHO, Natural disasters: protecting the public's health (2000) Washington, *Pan American Health Organization Scientific Publication* **575**.

- Zhang S, Corapi W, Quist E, Griffin S, Zhang M (2012) *Aspergillus versicolor*, a new causative agent of canine disseminated aspergillosis. *J Clin Microbiol* **50**: 187–191.
- Zhao G, Yin G, Inamdar AA, Luo J, Zhang N, Yang I, Buckley B, Bennett JW (2017) Volatile organic compounds emitted by filamentous fungi isolated from flooded homes after hurricane Sandy show toxicity in a *Drosophila* bioassay. *Indoor Air* **27**: 518–528.
- Zotti M, Machetti M, Perotti M, Barabino G, Persi A (2010) A new species, *Aspergillus persii* as an agent of onychomycosis. *Med Mycol* **48**: 656–660.

## 8. SAŽETAK

Poplava u općini Gunja u 2014. godini uništila je brojne domove te utjecala na promjene u koncentraciji i sastavu plijesni u različitim supstratima što se odrazilo i na sastav kućne prašine. Aspergili spadaju među najčešće vrste plijesni u okolišu čijem rastu pogoduju uvjeti povećane dostupnosti vode u supstratu. Zbog alergijskog i invazivnog potencijala te tvorbe mikotoksina (Klich, 2009) od osobite važnosti su vrste aspergila iz sekcija *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* i *Versicolores*.

Kako bi se utvrdio kvantitativni i kvalitativni sastav aspergila u prašini, u rujnu 2017. godini prikupljeni su uzorci prašine iz neobnovljenih (N = 5) i obnovljenih lokacija (N = 6) u Gunji uključujući obnovljene kuće i školu, kao i kuća i škole na kontrolnoj lokaciji u Gornjem Stupniku (N = 6). Na temelju makroskopskih obilježja kolonija poraslih na odgovarajućim hranjivim podlogama te mikromorfologije, a usporedbom s odgovarajućom literaturom izolirani su aspergili od interesa (N = 26). Identifikacija do razine vrste provedena je na temelju nukleotidnih slijedova dijela gena za kalmodulin (*CaM*).

Ukupne koncentracije aspergila u prašini bile su oko 50 puta veće u uzorcima prašine iz obnovljenih lokacija u Gunji u odnosu na kontrolno područje. Pri tome su koncentracije aspergila izmjerene u prašini iz obnovljenih lokacija bile 5 – 10 puta veće u odnosu na one iz neobnovljenih lokacija. Koncentracija aspergila iz sekcije *Versicolores* bila je 10 – 100 puta veća u odnosu na aspergile iz ostalih sekcija. Koncentracije u uzorcima prašine s obnovljenih lokacija u Gunji ( $5,61 \times 10^4 \pm 1,16 \times 10^5$  CFU/g) bile su do 200 puta više u odnosu na koncentracije u kontrolnim uzorcima. Aspergili iz sekcija *Circumdati* i *Nigri* u prašini s obnovljenih lokacija ( $1,12 \times 10^3 \pm 1,07 \times 10^3$  i  $1,32 \times 10^3 \pm 1,42 \times 10^3$  CFU/g) nalazili su se u 10 puta većim koncentracijama u odnosu na kontrolne lokacije, dok su aspergili iz sekcije *Flavi* izolirani samo iz prašine s obnovljenih i neobnovljenih lokacija u Gunji ( $3,43 \times 10^2 \pm 4,34 \times 10^2$  i  $3,36 \times 10^3 \pm 5,53 \times 10^3$  CFU/g). Na temelju genskog markera *CaM* identificirano je dvanaest različitih vrsta aspergila: *Circumdati* (*A. ochraceus*, N = 3; *A. pallidofulvus*, N = 1), *Flavi* (*A. flavus*, N = 4), *Nigri* (*A. tubingensis*, N = 3; *A. uvarum*, N = 1; i *A. welwitschiae*, N = 7), *Versicolores* (*A. griseoaurantiacus*, N = 1; *A. jensenii*, N = 1; *A. puulaauensis*, N = 2 i *A. sydowii*, N = 1), a dva izolata morfoloških sličnosti s aspergilima iz sekcija *Circumdati* odnosno *Versicolores* identificirani su kao vrste iz sekcije *Terrei* (*A. iizukae*, N = 1) i *Usti* (*A. insuetus*, N = 1). Rezultati analize upućuju na rizik za zdravlje izloženih ljudi osobito u uvjetima povećane koncentracije aspergila u prašini. S obzirom na njihov genski potencijal biosinteze

sekundarnih metabolita, po inhalaciji mikotoksinogenih čestica u dišnom sustavu izloženih ljudi mogu se ispoljiti toksični učinci.

**Ključne riječi:** poplava, aspergili u prašini, *CaM*, *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri*, *Versicolores*

## 9. SUMMARY

The flood in Gunja, village in Eastern Croatia, destroyed many homes and affected the change in concentrations and compositions of molds in different substrates, including dustborne molds. Because of their allergic and invasive potential and the secretion of micotoxins, the species from the sections *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri* and *Versicolores*, ubiquitous in water damaged environments, are important to investigate. To find out the qualitative and quantitative composition of Aspergilli in dust, in September 2017 several samples of house dust were collected from unrenovated (N = 5), renovated locations (N = 6) in Gunja (houses and a school) and from control locations in Gornji Stupnik (N = 6) (houses and schools). After the morphological analysis, twenty-six Aspergilli were isolated and selected for molecular-based identification based on partial calmodulin sequences (*CaM*).

The concentration of total dustborne Aspergilli were around 50 times higher in the samples collected from renovated locations in Gunja than in the control locations, while the concentrations measured in renovated locations in Gunja were around 5 – 10 times higher than in the unrenovated locations. The concentration of the Aspergilli from the section *Versicolores* were 10 to 100 times higher than the concentration of other species of interest. The concentration in the samples of dust from renovated locations in Gunja ( $5,61 \times 10^4 \pm 1,16 \times 10^5$  CFU/g) were 200 times higher than the concentrations in the control locations. Dustborne Aspergilli from sections *Circumdati* and *Nigri* from renovated locations ( $1,12 \times 10^3 \pm 1,07 \times 10^3$  and  $1,32 \times 10^3 \pm 1,42 \times 10^3$  CFU/g, respectively) were 10 times higher than at the control locations, while Aspergilli from the section *Flavi* were only isolated from the dust from renovated and unrenovated locations in Gunja ( $3,43 \times 10^2 \pm 4,34 \times 10^2$  and  $3,36 \times 10^3 \pm 5,53 \times 10^3$  CFU/g, respectively).

Partial *CaM* sequences resolved twenty-four Aspergilli isolates into twelve species from the sections of interest: *Circumdati* (*A. ochraceus*, N = 3; *A. pallidofulvus*, N = 1), *Flavi* (*A. flavus*, N = 4), *Nigri* (*A. tubingensis*, N = 3; *A. uvarum*, N = 1; i *A. welwitschiae*, N = 7), *Versicolores* (*A. griseoaurantiacus*, N = 1; *A. jensenii*, N = 1; *A. puulaauensis*, N = 2 and *A. sydowii*, N = 1), including two isolates that were identified to *A. iizukae* (N = 1) and *A. insuetus* (N = 1) from the sections *Terrei* and *Usti*, respectively.

These results point to the health risks of the exposed people followed by inhalation of mycotoxinogenic particles, especially in the conditions of increased concentration of dustborne Aspergilli.

**KEYWORDS:** flood, dustborne Aspergilli, *CaM*, *Circumdati*, *Flavi*, *Nigri*, *Versicolores*

## ZAHVALE

Zahvaljujem se dragoj mentorici dr. sc. Danieli Jakšić, koja me svojim znanjem, vještinama i iskustvom vodila kroz izradu kako praktičnog, tako i pisanog dijela ovog rada, na uloženom trudu, vremenu te na iskazanom povjerenju. Osobito se zahvaljujem prof. dr. sc. Maji Šegvić Klarić na svakom savjetu i prijedlogu koji su uvelike doprinijeli što boljoj realizaciji ovog istraživanja. Također se zahvaljujem i dr. sc. Sándoru Kocsubéu sa Sveučilišta u Szegedu na pomoći pri bioinformatičkim analizama. Ovim putem upućujem zahvale i ostalim članovima Zavoda za mikrobiologiju FBF-a na ugodnoj i prijateljskoj atmosferi.

## ŽIVOTOPIS

Rođena sam 3. veljače 1995. godine u Iserlohn u Njemačkoj. Osnovnu sam školu upisala i završila u Zagrebu te Opću gimnaziju također. Maturirala sam 2013. godine kada sam upisala Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu i trenutno sam apsolventica smjera farmacije. Osim studija, radila sam neke studentske poslove, te trenutno radim kao prevoditelj u tvrtki Labena, budući da imam B2 znanje Engleskog i C1 Njemačkog jezika. Također sam radila kao demonstrator na Zavodu za mikrobiologiju gdje sam se upoznala i zainteresirala za aktualni projekt.

### *Curriculum Vitae*

I was born in Iserlohn in Germany on February 3, 1995. I went to Elementary School in Zagreb, where I also finished my high school education. Since 2013 I am a student of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry on the University of Zagreb and now I am an advanced university student of Pharmacy. Besides studying, I had a few student jobs, so now I am working as a translator for the company Labena, since I am speaking English and German very well. Likewise, I was working on the Department for microbiology as an student-assistant where I got to know their current work.