

# Bioraznolikost plijesni u prašini nakon poplave

---

Kovačević, Ivana

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:132616>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-26**



Repository / Repozitorij:

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



**Ivana Kovačević**

**Bioraznolikost plijesni u prašini nakon poplave**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Mikrobiologija s parazitologijom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za mikrobiologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Maje Šegvić Klarić te je dio znanstveno-istraživačkog projekta (MycotoxA IP-09-2014-5982) kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost (HRZZ).

Zahvaljujem se dragoj mentorici prof. dr. sc. Maji Šegvić Klarić, koja me svojim znanjem, vještinama i iskustvom vodila kroz izradu kako praktičnog, tako i pisanog dijela ovog rada. Također veliko hvala dragoj dr. sc. Danieli Jakšić na uloženom trudu, vremenu, strpljenju i na svakoj riječi podrške za vrijeme mog boravka na Zavodu. Hvala i ostalim članovima Zavoda za mikrobiologiju FBF-a na ugodnoj i prijateljskoj atmosferi.

Hvala mojim prijateljima i obitelji na podršci, razumijevanju, ljubavi, pomoći i na svim zajedničkim trenucima koji su obogatili moje studentske dane i učinili ih posebnima.

## **SADRŽAJ**

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. POZADINA ISTRAŽIVANJA .....	1
1.2. PLIJESNI U ZATVORENOM PROSTORU .....	1
1.3. PLIJESNI U ZATVORENOM PROSTORU NAKON POPLAVA.....	4
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	6
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	7
3.1. MATERIJALI .....	7
3.1.1. KEMIKALIJE I HRANJIVE PODLOGE.....	7
3.1.2. UREĐAJI .....	7
3.2. METODE .....	8
3.2.1. UZORKOVANJE.....	8
3.2.2. MIKOLOŠKA ANALIZA .....	8
<b>4. REZULTATI</b> .....	9
<b>5. RASPRAVA</b> .....	14
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	17
<b>7. LITERATURA</b> .....	18
<b>8. SAŽETAK</b> .....	23
<b>SUMMARY</b> .....	24
<b>Temeljna dokumentacijska kartica</b> .....	25
<b>Basic documentation card</b> .....	26

## 1. UVOD

### 1.1. POZADINA ISTRAŽIVANJA

Povećanje srednjih dnevnih temperatura u cijelome svijetu uz povećanu koncentraciju tzv. stakleničkih plinova (plinovi koji uzrokuju efekt staklenika) uzrok su povećanoj vlažnosti i učestalosti prirodnih katastrofa (Bates i sur., 2008). Tako je i poplava koja je zahvatila općinu Gunja te istočne krajeve Hrvatske u svibnju 2014. godine, kao posljedica višednevnog utjecaja ciklone Donat i sekundarne ciklone Donat, nažalost samo jedna u nizu mnogih. 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 ([www.crometeo.hr](http://www.crometeo.hr)). Voda se zadržala i do nekoliko tjedana u ovom području, što je stvorilo okruženje pogodno za rast kako mikroorganizama, tako i plijesni. Nadalje, postavlja se pitanje kako će se to odraziti na zdravlje izloženih ljudi.

### 1.2. PLIJESNI U ZATVORENOM PROSTORU

Plijesni su prisutne u svim zatvorenim prostorima i nemoguće ih je u potpunosti ukloniti, a i nepotrebno. Budući da je što sličniji sastav plijesni unutarnjeg i vanjskog prostora generalno prihvaćen kao siguran, potrebno je redovito provjetriti prostore i uklanjati vodu kada se nakupi ili kondenzira. Voda je kritični parametar za rast plijesni, kada je povećan aktivitet vode u supstratu ( $a_w$ ), povećan je i rast plijesni, što može biti posljedica utjecaja ljudi ili prirode, npr. curenje cijevi, kondenzacija vodene pare, poplave, uragani i sl. Ukoliko dođe do vidljivog porasta plijesni, ukloniti se mogu premazivanjem istih snažnim oksidansima na bazi klora (PAHO, 2000).

Sastav plijesni u zatvorenim prostorima vrlo je raznolik i promjenjiv ovisno o klimi podneblja i navikama ljudi koji u njima borave. Većina autora navodi *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. i *Cladosporium* spp. kao najčešće plijesni u zatvorenim prostorima, a prevlast određenih vrsta plijesni ovisna je mnogim faktorima, kao što su prisutnost kućnih ljubimaca, tepiha, biljaka, hrane i dr. (Jakšić Despot i Šegvić Klarić, 2014; Rojas i Aira, 2012; Samson i sur., 2010). Sindrom bolesne zgrade (eng. *Sick building syndrome*) povezan je s kvalitetom zraka

zatvorenih prostora, a ona s porastom plijesni ovisno o vlažnosti, tako da je od iznimne važnosti pravilno održavanje ventilacijskih i klima uređaja te radijatora, kako bi se spriječilo nakupljanje plijesni (Piecková, 2012). Posebno je važno provoditi mjere opreza 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 pronade 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).

Zdravstveni rizici koje plijesni nose su većinom povezani sa izazivanjem alergija, neki podaci govore kako je između 10 i 15 % respiratornih alergijskih bolesti uzrokovano plijesnima, a osobito oportunističkim patogenima kao što su *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* i *A. flavus* (Hedayati i sur., 2005). Naime, spore ovih aspergila vrlo su sitne i lako se otpuštaju u zrak te se stoga jednostavno mogu inhalirati i uzrokovati ozbiljne bolesti kao što su plućna aspergiloza (Samson i sur., 2010). Osim alergija, plijesni koje rastu u vlažnim prostorima, bilo kuća, ureda ili obrazovnih ustanova, mogu uzrokovati učestalija respiratorna oboljenja, infekcije i egzacerbacije astme (WHO, 2009). Aspergili su također uzročnici invazivne aspergiloze koja je rijetka kod imunokompetentnih ljudi, ali značajno pridonosi morbiditetu imunokompromitiranih ljudi, a glavni je uzročnik *A. fumigatus*, te rjeđe *A. flavus*, *A. niger* i *A. terreus* (Krishnan i sur., 2009).

Nadalje, mnoge plijesni proizvode mikotoksine koji su toksični i karcinogeni spojevi te stoga mogu ozbiljno narušiti zdravlje pojedinca. Internacionalna organizacija za istraživanje raka, IARC većinu je mikotoksina svrstala u određenu skupinu s obzirom na karcinogenost ([www.iarc.fr](http://www.iarc.fr); Ostry i sur., 2017). U skupinu 1 ubrajaju se spojevi dokazane karcinogenosti za ljude, skupinu 2A vjerojatni karcinogeni za ljude, a skupinu 2B mogući karcinogeni za ljude. Također postoje skupine 3 i 4, gdje su u skupinu 3 svrstani spojevi koji se ne povezuju sa karcinogenošću kod ljudi, a u skupinu 4 spojevi koji vjerojatno nisu humani karcinogeni. Europska komisija donosi popis mikotoksina i njihove maksimalne dozvoljene koncentracije u hrani (Commission regulation, 2006).

Najznačajnije proizvođače mikotoksina pronalazimo među plijesnima iz roda *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* i *Stachybotrys*. Plijesni roda *Aspergillus* značajni su proizvođači mikotoksina kao što su okratoksin A (OTA), aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), fumonizini B<sub>2</sub>, B<sub>4</sub>, B<sub>6</sub> (FB)

i sterigmatocistin (STC). Mikotoksin OTA proizvode uglavnom vrste iz sekcije *Circumdati* (*A. ochraceus*), ali i neke vrste sekcije *Nigri* (*A. welwitschiae*) i drugih rodova plijesni (*Penicillium* spp.) (Samson i sur., 2010; Visagie i sur., 2014). OTA ima nefrotoksični, imunosupresivni, teratogeni i karcinogeni učinak, IARC 2B (IARC, 1993; Siqueira i sur., 2017) u čijoj pozadini je genotoksični učinak i oksidacijski stres (Šegvić Klarić i sur., 2007; 2010). Neke vrste iz sekcije *Flavi* (*A. flavus*) proizvođači su AFB<sub>1</sub> koji se smatra najtoksičnijim prirodnim spojem uopće te je karcinogen skupine 1, s obzirom na dokazani hepatokarcinogeni učinak kod ljudi (IARC, 2012; Samson i sur., 2010). Fumonizini se općenito smatraju negenotoksičnim karcinogenima, npr. FB<sub>1</sub> svrstan je u skupinu 2B (IARC, 2002), te se smatra da je oksidacijski stres glavni mehanizam koji dovodi do oštećenja DNA (Domijan i sur., 2015; Šegvić Klarić i sur., 2007). Proizvode ih plijesni iz sekcije *Nigri* (*A. tubingensis*) (Varga i sur., 2011). STC pokazuje različite toksične, mutagene i karcinogene učinke na životinje i proglašen je karcinogenom 2B kategorije (IARC, 1987), a proizvode ga vrste iz sekcije *Versicolores* (*A. versicolor*) (Jurjevic i sur., 2012). 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 i sur., 2016).

Mnoge vrste roda *Penicillium* proizvode jedan ili više mikotoksina, npr. citrinin (*P. citrinum*), patulin (*P. expansum*), OTA (*P. verrucosum*) i rokefortin (*P. chrysogenum*) (El-banna i sur., 1987; Sweeney i Dobson, 1998). Među njima su najznačajniji ranije opisani OTA i patulin koji je svrstan u karcinogene skupine 3 (IARC, 1986; Alshannaq i Yu, 2017).

Plijesni roda *Fusarium* poznati su proizvođači zearalenona koji je karcinogen skupine 3 (IARC, 1993) zbog jakog estrogenon učinka, te trihotecena, također karcinogen skupine 3 (IARC, 1987; Alshannaq i Yu, 2017).

Nakon slučajeva idiopatske plućne hemosideroze povezane sa *Stachybotrys chartarum*, ova se plijesan intenzivno istraživala (Etzell i sur., 1998), a najpoznatija je kao proizvođač citotoksičnih makrocikličkih trihotecena (MCT) koji inhibiraju sintezu proteina (npr. satratoksin H, G i F) (Bin-Umer i sur., 2011; Fog Nielsen, 2003; Rocha i sur., 2005).

### 1.3. PLIJESNI U ZATVORENOM PROSTORU NAKON POPLAVA

Poplave su prirodne katastrofe koje nose mnoge socioekonomske probleme, pa tako i promjenu sastava plijesni zbog povećane količine vode u supstratu. Mnoga su istraživanja provedena na poplavom pogođenim područjima, a većinom zbog identifikacije i kvantifikacije plijesni te isticanja važnosti pravilne obnove građevinskih objekata. Istraživanja provedena na poplavljenom području New Orleansa nakon uragana Katrina i Rita, pokazuju kako je u zahvaćenim kućama zabilježena povećana koncentracija plijesni, prije i tijekom obnavljanja kuća (Chew i sur., 2006; Rao i sur., 2007). Također, drugo istraživanje pokazalo je pogoršanje zdravlja ljudi koji borave u kućama koje prolaze renovaciju nakon poplave (izljev rijeke Cedar u SAD-u) u usporedbi s već obnovljenim kućama. Naime, ljudi su prijavljivali povećanu učestalost alergija i teškog disanja te upotrebe lijekova za probleme disanja poslije poplave u odnosu na razdoblje prije poplave (Hoppe i sur., 2012).

Plijesni roda *Penicillium*, *Aspergillus* i *Cladosporium*, prema nekoliko istraživanja, najčešći su u zatvorenim prostorima gdje je povećan  $a_w$  (Bloom i sur., 2009b; Gravesen i sur., 1999; Polizzi i sur., 2009). Podjela plijesni s obzirom na  $a_w$  optimalan za njihov rast je na primarne, sekundarne i tercijarne kolonizatore. Među primarne kolonizatore svrstane su plijesni kojima odgovara  $a_w$  manji od 0,8, a najčešći su *Penicillium chrysogenum* i *Aspergillus versicolor*. Neke vrste roda *Aspergillus* svrstane su i u sekundarne kolonizatore, npr. iz sekcije *Flavi*, a u ovu skupinu ubrajaju se i vrste roda *Alternaria*, *Cladosporium* i *Phoma*. U skupinu tercijarnih kolonizatora svrstane su neke od najtoksičnijih plijesni kojima za rast odgovara  $a_w$  veći od 0,9, a to su *Chaetomium globosum*, *Memnoniella echinata*, *Stachybotrys chartarum* i vrste roda *Trichoderma* (Grant i sur. 1989).

Mnoga su istraživanja provedena u svrhu određivanja koncentracije mikotoksina na poplavljenim lokacijama. Tako je ispitivanje na prisutnost makrocikličkih trihotecena (MCT), jednog od najpotentnijih mikotoksina u stanovima nakon poplave (N = 15), pokazalo pozitivne rezultate u svim stanovima (Charpin-Kadouch i sur., 2006). Također, da plijesni koje rastu na vlažnom građevinskom materijalu proizvode mikotoksine pokazalo je istraživanje u Švedskoj u zgradama oštećenim vodom. Analizirani su uzorci prašine u kojima su određene koncentracije mikotoksina trihoderbola, verukarola (nastali hidrolizom MCT i trihodermina) i sterigmatocistina (Bloom i sur., 2009a; Bloom i sur., 2009b).

Nasuprot toga, analizom plijesni stambenih prostora u kojima je prisutan vidljiv porast plijesni, a nisu bili poplavljeni, pokazao je prisutnost vrsta *Aspergillus versicolor* i



*Penicillium chrysogenum* koje su potencijalni producenti sterigmatocistina, odnosno rokefortina C. Dio izolata *A. versicolor* (8 od 13) i *P. chrysogenum* (4 od 10) proizvodili su mikotoksine, ali samo u laboratoriju. Naime, mikotoksini nisu detektirani izravno u prašini uzorkovanoj u stanovima (Ježak i sur., 2016).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Jedan od najznačajnijih faktora za rast plijesni predstavlja povećana dostupnost vode u supstratu,  $a_w$ . Iz tog se razloga 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*, *Penicillium* i *Cladosporium*. Pri tome su od posebnog javnozdravstvenog značaja aspergili s obzirom na alergijski i invazivni potencijal te mogućnost biosinteze sekundarnih toksičnih metabolita.

Specifični ciljevi ovog rada su:

- Na temelju morfoloških i mikromorfoloških obilježja identificirati plijesni porasle na odgovarajućim hranjivim podlogama do razine roda
- Odrediti koncentracije plijesni u prašini na pojedinim lokacijama, a ovisno o hranjivoj podlozi (CFU<sup>1</sup>/g)
- Procijeniti rizik za zdravlje ljudi koji borave u prostorima prevelike vlažnosti, s obzirom na sastav i koncentraciju 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. 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 polisorbitat 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).

##### 3.1.2. UREĐAJI

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

## 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). 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 su pojedine kolonije plijesni identificirane do razine roda na temelju morfologije i mikromorfologije usporedbom s odgovarajućom literaturom (Samson i sur., 2010). Zatim je na temelju broja poraslih kolonija određena koncentracija plijesni u prašini (CFU/g) prema formuli:

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

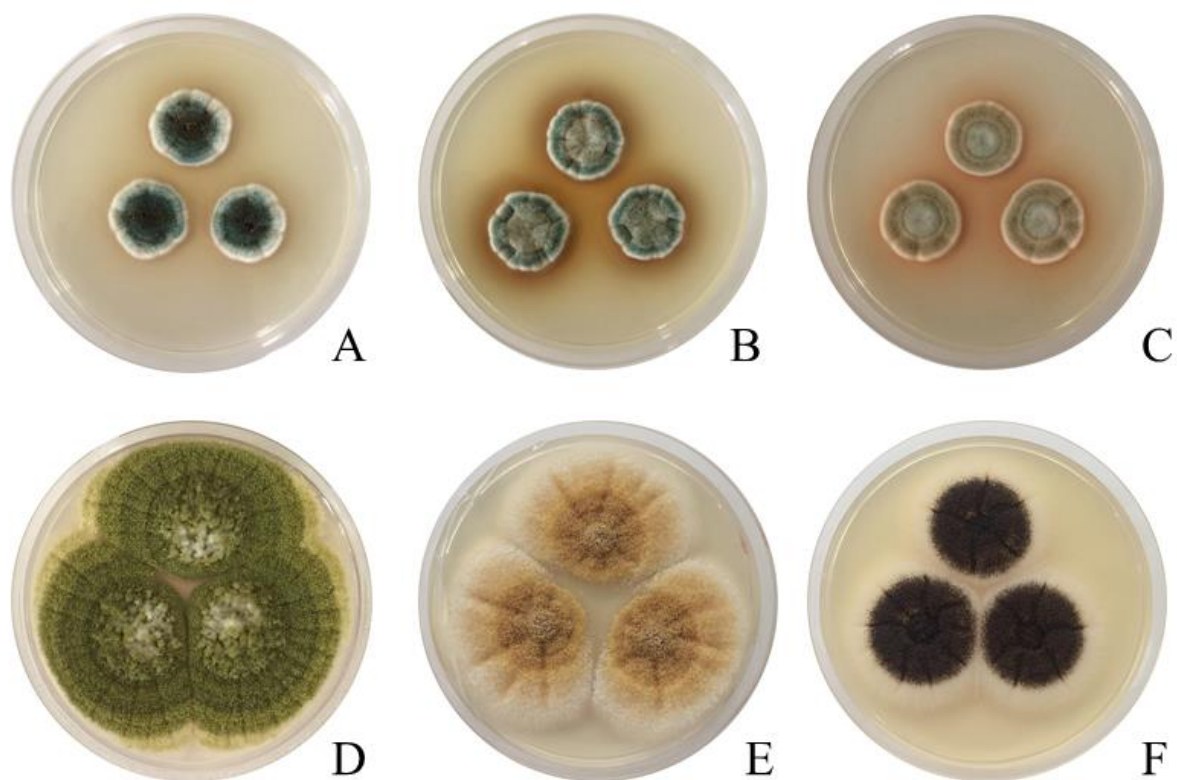
N	CFU/g; koncentracija vijabilnih plijesni po gramu prašine
$\sum C$	suma svih poraslih kolonija na DG-18 ili DRBC na dva uzastopna odgovarajuća razrjeđenja <sup>2</sup>
V	volumen inokuluma (mL) stavljenog na svaku hranjivu podlogu
n <sub>1</sub>	broj hranjivih podloga u prvom brojivom razrjeđenju
n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

---

<sup>2</sup> Odgovarajuće razrjeđenje podrazumijeva broj kolonija koji nije veći od 150

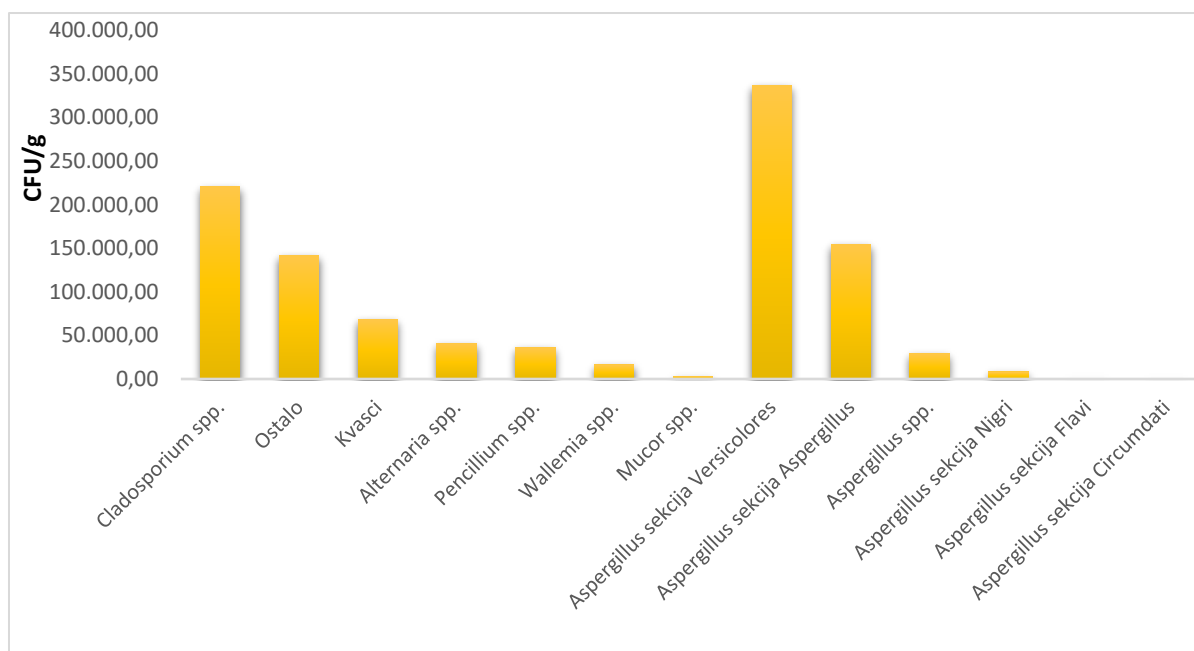
#### 4. REZULTATI

Identifikacija poraslih plijesni, kao i pripadajuće koncentracije, određenu su na temelju porasta na DG-18 odnosno DRBC agaru te su rezultati prikazani u obliku grafičkih prikaza na slikama 2 – 7. Također su pri tome izdvojeni aspergili na CYA agar radi svrstavanja u pojedine sekcije, a neki od izdvojenih izolata prikazani su na slici 1.

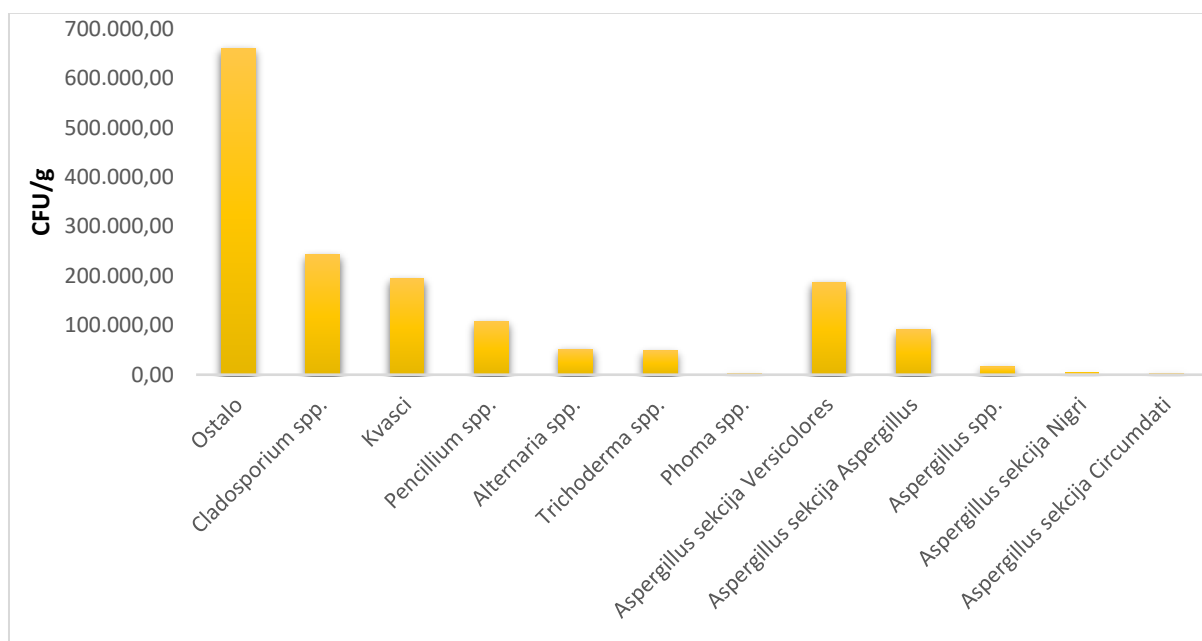


Slika 1. Morfologija kolonija *Aspergillus* vrsta iz sekcija *Versicolores* A, B i C, *Flavi* D, *Circumdati* E te *Nigri* F, nakon uzgoja 7 dana pri 25 °C na hranjivoj podlozi CYA.

Na obnovljenim lokacijama u Gunji dominirale su plijesni roda *Aspergillus*. Ukupna je koncentracija aspergila ( $5,30 \times 10^5$  CFU/g) bila veće nego koncentracija svih ostalih plijesni zbrojeno ( $5,26 \times 10^5$  CFU/g), kada se gleda porast na DG-18 agaru. Porast plijesni na podlozi DRBC vrlo je sličan, aspergili su također najbrojniji ( $3,01 \times 10^5$  CFU/g) izuzme li se koncentracija neidentificiranih plijeni ( $6,61 \times 10^5$  CFU/g). Osim plijesni roda *Aspergillus*, na ovim su lokacijama također pronađene visoke koncentracije plijesni roda *Cladosporium* ( $2,21 \times 10^5$  CFU/g,  $2,44 \times 10^5$  CFU/g, redom DG-18, DRBC) i *Penicillium* ( $3,57 \times 10^4$  CFU/g,  $1,09 \times 10^5$  CFU/g, redom DG-18, DRBC) te kvasaca ( $6,82 \times 10^4$  CFU/g,  $1,95 \times 10^5$  CFU/g, redom DG-18, DRBC) (slike 2 i 3).

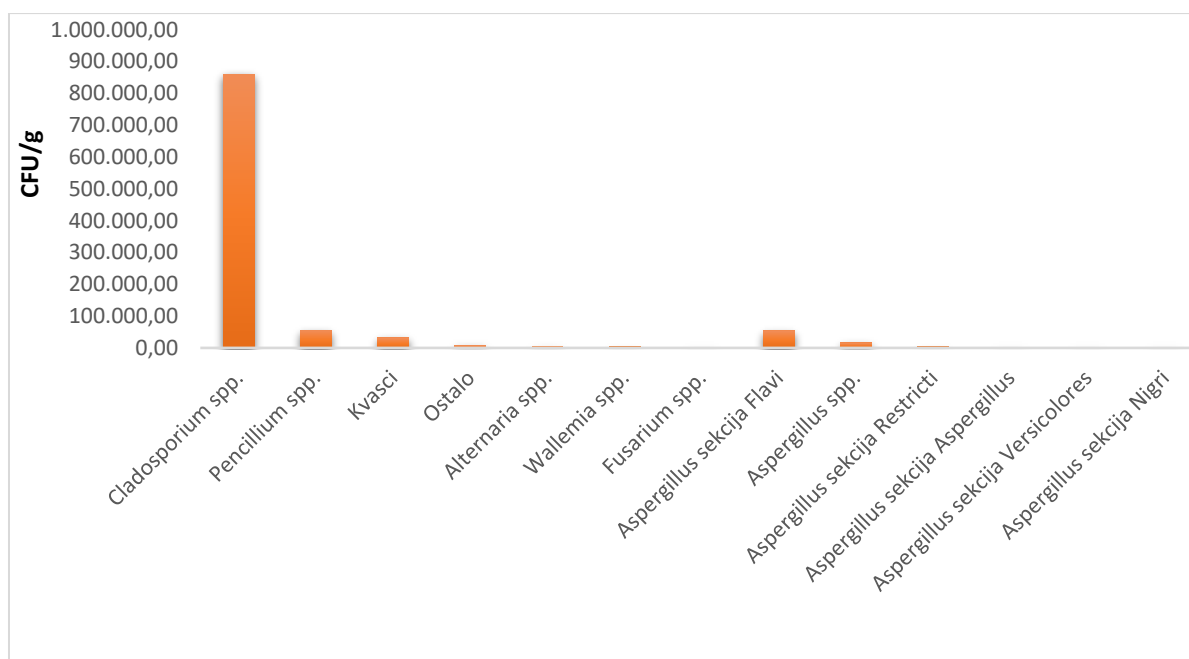


Slika 2. Grafički prikaz koncentracija identificiranih plijesni prema rodovima, a za rod *Aspergillus* i prema sekcijama poraslih na hranjivoj podlozi DG-18 iz uzoraka prašine prikupljenih na obnovljenim lokacijama u Gunji.

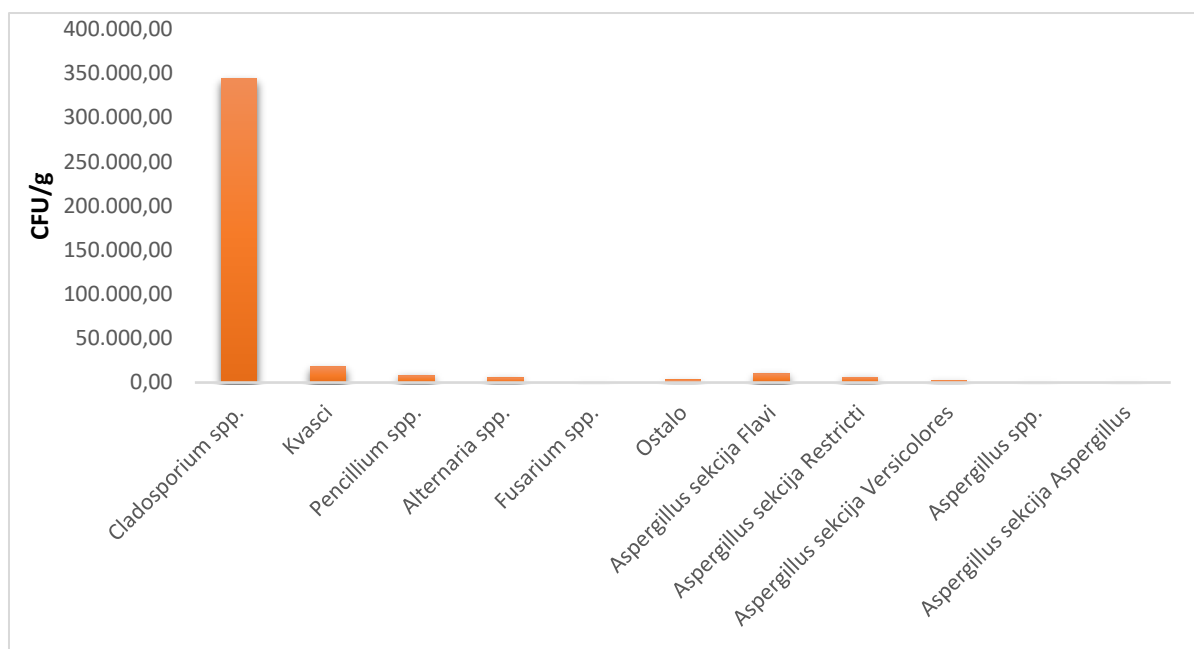


Slika 3. Grafički prikaz koncentracija identificiranih plijesni prema rodovima, a za rod *Aspergillus* i prema sekcijama poraslih na hranjivoj podlozi DRBC iz uzoraka prašine prikupljenih na obnovljenim lokacijama u Gunji.

Na neobnovljenim lokacijama u Gunji najbrojnije su bile plijesni roda *Cladosporium*, izolirane su u oko pet puta većim koncentracijama ( $8,6 \times 10^5$  CFU/g,  $3,44 \times 10^5$  CFU/g, redom DG-18, DRBC), nego plijesni svih ostalih rodova zbrojeno ( $1,79 \times 10^5$  CFU/G,  $5,36 \times 10^4$  CFU/g, redom DG-18, DRBC). Također su u visokim koncentracijama izolirane plijesni roda *Aspergillus* ( $7,51 \times 10^4$  CFU/g,  $1,9 \times 10^4$  CFU/g, redom DG-18, DRBC), a nakon njih po učestalosti bili su plijesni roda *Penicillium* ( $5,52 \times 10^4$  CFU/g,  $7,95 \times 10^3$  CFU/g, redom DG-18, DRBC) i kvasci ( $3,15 \times 10^4$  CFU/g,  $1,77 \times 10^4$  CFU/g, redom DG-18, DRBC), ovisno o agaru (slike 4 i 5).



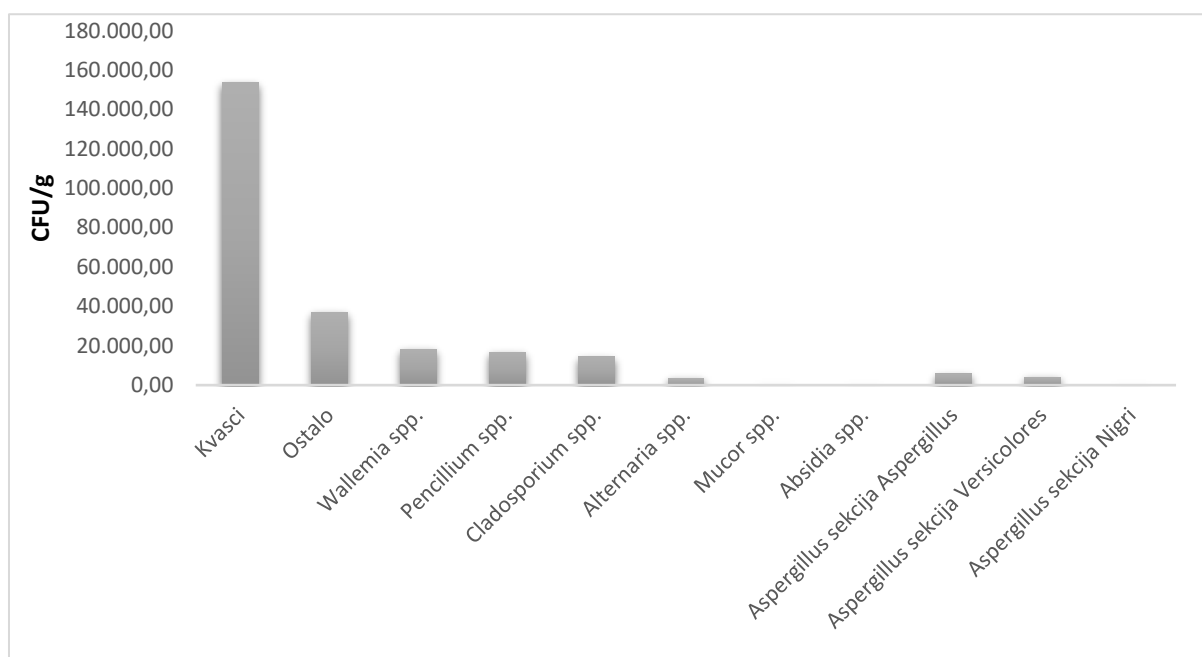
Slika 4. Grafički prikaz koncentracija identificiranih plijesni prema rodovima, a za rod *Aspergillus* i prema sekcijama poraslih na hranjivoj podlozi DG-18 iz uzoraka prašine prikupljenih na neobnovljenim lokacijama u Gunji.



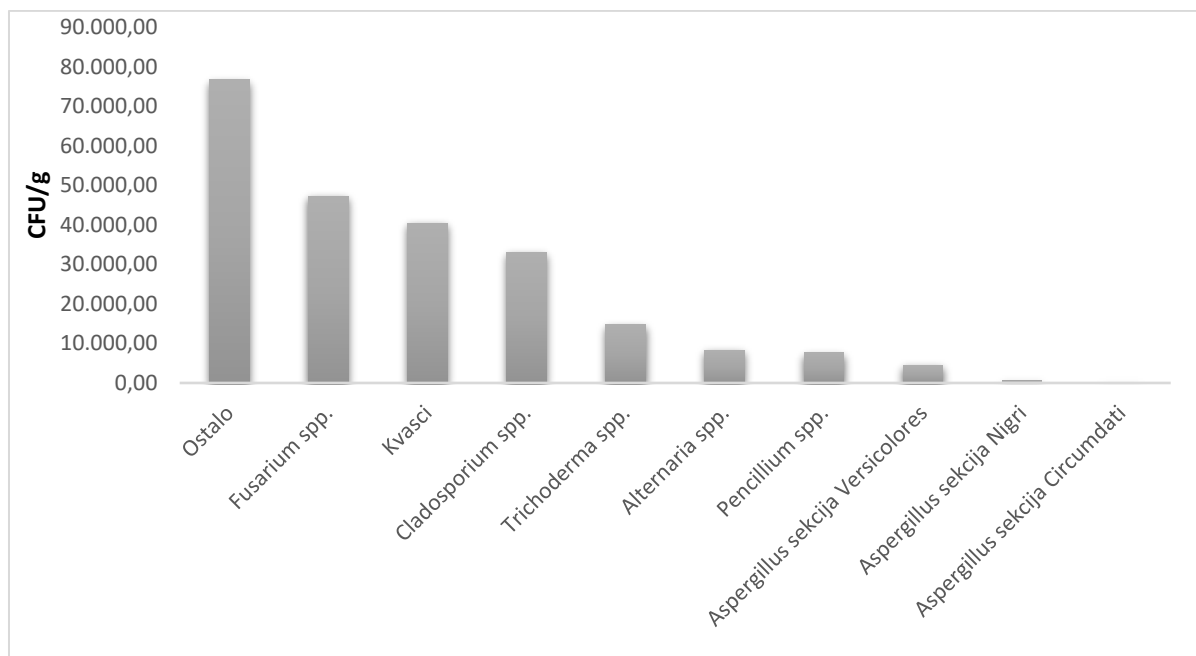
Slika 5. Grafički prikaz koncentracija identificiranih plijesni prema rodovima, a za rod *Aspergillus* i prema sekcijama poraslih na hranjivoj podlozi DRBC iz uzoraka prašine prikupljenih na neobnovljenim lokacijama u Gunji.

Na kontrolnim lokacijama u Gornjem Stupniku, najbrojniji su bili kvasci ( $1,54 \times 10^5$  CFU/g) i plijesni roda *Fusarium* ( $4,72 \times 10^4$  CFU/g), ovisno o tome gleda li se porast na DG-18 ili DRBC agaru i kada se izuzmu neidentificirane plijesni koje su bile najbrojnije na DRBC agaru ( $7,68 \times 10^4$  CFU/g). Nadalje, u visokim su koncentracijama izolirane i plijesni roda *Cladosporium* ( $1,44 \times 10^4$  CFU/g,  $3,31 \times 10^4$  CFU/g, redom DG-18, DRBC), *Wallemia* ( $1,82 \times 10^4$  CFU/g, DG-18), *Penicillium* ( $1,66 \times 10^4$  CFU/g,  $7,63 \times 10^3$  CFU/g, redom DG-18, DRBC) i *Trichoderma* ( $1,48 \times 10^4$  CFU/g, DRBC). Aspergili su bili manje brojni na ovim lokacijama ( $9,99 \times 10^3$  CFU/g,  $5,21 \times 10^3$  CFU/g, redom DG-18, DRBC) nego na poplavljenim lokacijama (slike 6 i 7).





Slika 6. Grafički prikaz koncentracija identificiranih plijesni prema rodovima, a za rod *Aspergillus* i prema sekcijama poraslih na hranjivoj podlozi DG-18 iz uzoraka prašine prikupljenih na kontrolnim lokacijama u Gornjem Stupniku.



Slika 7. Grafički prikaz koncentracija identificiranih plijesni prema rodovima, a za rod *Aspergillus* i prema sekcijama poraslih na hranjivoj podlozi DRBC iz uzoraka prašine prikupljenih na kontrolnim lokacijama u Gornjem Stupniku.

## 5. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja pokazali su razlike u kvantitativnom i kvalitativnom sastavu prašine s obzirom na lokacije uzorkovanja. Pri tome nije bilo značajnijih razlika u koncentracijama za većinu plijesni ovisno o odabranoj podlozi, osim za aspergile iz pojedinih sekcija. 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 identificiranih sekcija (Samson i sur., 2010) podaci na slikama 2 – 7 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. Plijesni iz pojedinih rodova izolirani su samo na jednoj od podloga, ali zbog malog broja uzoraka i velike koncentracije neidentificiranih plijesni, ne može se govoriti o selektivnosti plijesni iz tih rodova za određenu podlogu. Tako je npr. *Wallemia* spp. poznati kserofil (Zalar i sur., 2005), izolirana samo s podloge DG-18, a njen rast podržava i podloga DRBC, koja je nižeg  $a_w$ .

Sa sve tri skupine lokacija izolirane su plijesni roda *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria* i *Wallemia* te kvasci (slike 2 – 7). Aspergili su bili najrasprostranjeniji, te su izolirani sa čak 16 od ukupno 17 lokacija i to u 50 puta većim koncentracijama na poplavljenim lokacijama u Gunji, nego na kontrolnom području, a plijesni roda *Cladosporium* izolirane su u najvećoj koncentraciji  $8,6 \times 10^5$  CFU/g i to na neobnovljenim lokacijama u Gunji, na DG-18 agaru.

Plijesni roda *Cladosporium* i *Penicillium* izolirani su iz prašine s po 15 lokacija, dok su kladosporije bile u 15 puta većim koncentracijama na obnovljenim u odnosu na kontrolne lokacije, a oko 4 puta ih je više bilo na neobnovljenim nego obnovljenim lokacijama. Penicilije su izolirane u najvećim koncentracijama na obnovljenim lokacijama i to do 14 puta većim nego na neobnovljenim ili kontrolnim lokacijama (slike 2 – 7). Nalaz veće koncentracija kladosporija i penicilija u neobnovljenim kućama poplavljenog područja je očekivan jer se većinom radi o sekundarnim kolonizatorima koji u supstratu zahtijevaju veći aktivitet vode.

Po rasprostranjenosti iza ovih rodova plijesni slijede kvasci koji su izolirani sa 14 lokacija, dok su plijesni roda *Alternaria* pronađene na 10 lokacija. Kvasaca je bilo najviše na

obnovljenim lokacijama i to oko 5 puta više nego na neobnovljenim lokacijama, a za pola više nego na kontrolnom području. Plijesni roda *Alternaria* bile su najbrojnije na obnovljenim lokacijama gdje su izolirane u 10 puta većim koncentracijama nego na neobnovljenim ili kontrolnim lokacijama (slike 2 – 7).

Plijesni roda *Wallemia* izolirane su samo s DG-18 agara i to s jedne obnovljene, dvije neobnovljene i tri kontrolne lokacije, a plijesni roda *Mucor* izolirani su sa dvije obnovljene lokacije i samo još jedne lokacije kontrolnog područja, ali samo na DG-18 agaru. Nadalje, plijesni roda *Trichoderma* izolirani su s jedne obnovljene i još tri kontrolne lokacije i to samo na DRBC agaru, a plijesni roda *Fusarium* izolirani su iz prašine prikupljene na jednoj neobnovljenoj i tri kontrolne lokacije. *Phoma* spp. izolirana je iz prašine prikupljene na samo jednoj obnovljenoj lokaciji u Gunji, a nije je bilo na neobnovljenim ni kontrolnim lokacijama, slično kao što je *Absidia* spp. izolirana samo s jedne kontrolne lokacije i nigdje drugo (slike 2 – 7).

Istraživanje bioraznolikosti plijesni u zraku i prašini u stanovima u Francuskoj (N = 133), pokazalo je kako su najčešće bile plijesni rodova *Cladosporium* i *Penicillium*, izolirane iz 92% i 80% uzoraka po redu. Po učestalosti su slijedili aspergili te alternarije koji su izolirani iz 49% i 14% uzoraka po redu (Dallongeville i sur., 2015). Iako je poznato kako mnoge vrste plijesni iz ovih rodova proizvode mikotoksine, ranije navedeno istraživanje plijesni u stambenim prostorima pokazalo je kako u samim uzorcima nema mikotoksina, ali postoji potencijal lučenja koji je dokazan u laboratoriju (Ježak i sur., 2016).

Najučestalije plijesni na vlažnom građevinskom materijalu, prema jednom su istraživanju *Penicillium chrysogenum* i *Aspergillus versicolor*, a zatim plijesni iz rodova *Chaetomium* spp., *Acremonium* spp. i *Ulocladium* spp. (Andersen i sur., 2011), što se slaže s drugim ispitivanjem u zgradama oštećenim vodom koje je pokazalo da su najučestaliji izolirani mikotoksini rokefortin C, chaetoglobosin A i STC, ali i roridin E, OTA, AFB<sub>1</sub> te AFB<sub>2</sub>, koje po redu luče *Penicillium* spp., *Chaetomium* spp., *Aspergillus* spp., *Stachybotrys* spp. i zadnja tri *Aspergillus* spp. (Polizzi i sur., 2009). Nakon uragana Katrina koji je pogodio New Orleans, analizirano je pet kuća na prisutnost određenih mikotoksina te je iz tri izoliran verukarol, produkt hidrolize MCT koje proizvodi *Stachybotrys* spp., a iz dvije kuće izoliran je STC kojeg proizvode plijesni roda *Aspergillus* (Bloom i sur., 2009a). Iako mnoge plijesni pronađene u zatvorenom prostoru imaju potencijal proizvodnje mikotoksina, pregledni članak Kristiana Fog Nielsena govori o tome kako su to većinom male koncentracije, osim kad je u

pitanju STC koji može postići i 1% biomase plijesni koja ga luči. Također, proizvodnja mikotoksina započinje kada je  $a_w$  oko 0,9, a postane značajna tek kada je  $a_w > 0,95$  (Fog Nielsen, 2003).

Toksičnost plijesni osim zbog lučenja mikotoksina, proizlazi i zbog alergenosti. Jedno je ispitivanje alergijskog potencijala učestalih plijesni iz zraka na perifernim krvnim stanicama ljudi oboljelih od kroničnog rinosinitisa, pokazalo kako najveći alergeni potencijal imaju plijesni iz roda *Alternaria* i *Cladosporium* (Shin i sur., 2004). Nadalje, istraživanje toksičnosti plijesni na larvama *Drosophila melanogaster* izoliranih iz kuća nakon uragana Sandy, pokazalo je kako je *Aspergillus niger* najtoksičnija vrsta, a vrste roda *Penicillium* najučestalije (50 % identificiranih vrsta) (Zhao i sur., 2017).

Preporuča se napraviti kvalitativnu analizu plijesni u zgradama kojima predstoji renovacija iz bilo kojeg razloga, budući da je promjena sastava plijesni dobar pokazatelj je li renovacija dobro provedena (Andersen i sur., 2011).

## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja iz dobivenih rezultata mogu se izvući sljedeći zaključci:

- Plijesni rodova *Aspergillus*, *Cladosporium* i *Penicillium* izolirani su iz prašine u neobnovljenim i obnovljenim lokacijama u Gunji kao i u kontrolnim lokacijama Gornji Stupnik (N = 16, N = 15, N = 15).
- Plijesni roda *Cladosporium* izolirane su u najvećoj koncentraciji ( $8,6 \times 10^5$  CFU/g) i to na neobnovljenim lokacijama u Gunji, na DG-18 agaru.
- Aspergili su izolirani u 50 puta većim koncentracijama iz prašine s poplavljenog nego s kontrolnog područja, a kladosporije u 15 puta većim koncentracijama na obnovljenim nego na kontrolnim lokacijama te ih je 4 puta više bilo na neobnovljenim nego na obnovljenim lokacijama. Nadalje, penicilije su izolirane u najvećim koncentracijama na obnovljenim lokacijama i to do 14 puta većim nego na neobnovljenim ili kontrolnim lokacijama.
- Plijesni roda *Alternaria* i *Wallemia* te kvasci izolirani iz prašine sa sve tri skupine lokacija (N = 10, N = 6, N = 14). Pri tome je *Wallemia* spp. izolirana samo na DG-18 agaru.
- Plijesni roda *Phoma* i *Absidia* izolirane su s po jedne lokacije i to jedne obnovljene i jedne kontrolne, po redu.
- Inhalacijom prašine opterećene povećanom koncentracijom aspergila može doći do ispoljavanja njihovih štetnih učinaka u dišnom sustavu izloženih ljudi, s obzirom na mikotoksinogeni potencijal, kao što može doći do pogoršanja nekih kroničnih stanja inhalacijom prašine opterećenom povećanom koncentracijom plijesni iz roda *Alternaria* i *Cladosporium*, s obzirom na alergeni potencijal.

## 7. LITERATURA

- Alshannaq A, Yu JH. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *Int J Environ Res Public Health*, 2017, 14, 632.
- Andersen B, Frisvad JC, Søndergaard I, Rasmussen IS, Larsen LS. Associations between fungal species and water-damaged building materials. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77, 4180–4188.
- Bates BC, Kundzewicz ZW, Wu S, Palutikof JP. Climate change and water. technical paper of the Intergovernmental Panel on Climate Change. 2008. Geneva, IPCC Secretariat, 210.
- Bin-Umer MA, McLaughlin JE, Basu D, McCormick S, Tumer NE. Trichothecene mycotoxins inhibit mitochondrial translation--implication for the mechanism of toxicity. *Toxins*, 2011, 3, 1484–1501.
- Bloom E, Grimsley LF, Pehrson C, Lewis J, Larsson L. Molds and mycotoxins in dust from water-damaged homes in New Orleans after hurricane Katrina. *Indoor Air*, 2009a, 19, 153–158.
- Bloom E, Nyman E, Must A, Pehrson C, Larsson L. Molds and mycotoxins in indoor environments — a survey in water-damaged buildings. *J Occup and Environ Hyg*, 2009b, 6, 671–678.
- Charpin-Kadouch C, Maurel G, Felipe R, Queralt J, Ramadour M, Dumon H, Garans M, Botta A, Charpin D. Mycotoxin identification in moldy dwellings. *J Appl Toxicol*, 2006, 26, 475–479.
- Chew GL, Wilson J, Rabito FA, Grimsley F, Iqbal S, Reponen T, Muilenberg ML, Thorne PS, Dearborn DG, Morley RL. Mold and endotoxin levels in the aftermath of Hurricane Katrina: a pilot project of homes in New Orleans undergoing renovation. *Environ Health Perspect*, 2006, 114, 1883–1889.
- Ciklona Donat u brojkama: Koliko je kiše palo?, 2014, <https://www.crometeo.hr/ciklona-donat-u-brojkama-koliko-je-kise-palo/>, pristupljeno 10.6.2018.

- Commission regulation (EC) Maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, 2006, EUR-lex. No 1881/2006.
- Dallongeville A, Le Cann P, Zmirou-Navier D, Chevrier C, Costet N, Annesi-Maesano I, Blanchard O. Concentration and determinants of molds and allergens in indoor air and house dust of French dwellings. *Sci Total Environ*, 2015, 536, 964–972.
- Domijan AM, Gajski G, Novak Jovanović I, Gerić M, Garaj-Vrhovac V. 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*, 2015, 170, 455–462.
- El-banna AA, Pitt JI, Leistner L. Production of mycotoxins by *Penicillium* species. *Syst Appl Microbiol*, 1987, 10, 42–46.
- Etzel RA, Montaña E, Sorenson WG, Kullman GJ, Allan TM, Dearborn DG, Olson DR, Jarvis BB, Miller JD. Acute pulmonary hemorrhage in infants associated with exposure to *Stachybotrys atra* and other fungi. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 1998, 152, 757–762.
- Fog Nielsen K. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genet Biol*, 2003, 39, 103–117.
- Grant C, Hunter CA, Flannigan B, Bravery AF. The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwellings. *Int Biodeterior*, 1989, 25, 259–84.
- Gravesen S, Nielsen PA, Iversen R, Nielsen KF. Microfungal contamination of damp buildings - Examples of risk constructions and risk materials. *Environ Health Perspect*, 1999, 107, 505–508.
- Hedayati MT, Mayahi S, Aghili R, Goharimoghadam K. Airborne fungi in indoor and outdoor of asthmatic patients' home, living in the city of Sari. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2005, 4, 189–191.
- Hoppe KA, Metwali N, Perry SS, Hart T, Kostle PA, Thorne PS. Assessment of airborne exposures and health in flooded homes undergoing renovation. *Indoor Air*, 2012, 22, 446–456.
- IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally

occurring and synthetic food components: furocounarins and ultraviolet radiation: Patulin. 1986, *IARC Monogr* 40: 83–99.

IARC supplement 7. Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of *IARC Monographs* volumes 1 to 42. 1987, Sterigmatocystin (1976). T<sub>2</sub>-trichothecene (1983) *IARC monogr* 10: 245–253. 31: 265–279.

IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins: Toxins Derived from *Fusarium Graminearum*, *F. Culmorum* and *F. Crookwellense*: Zearalenone, Deoxynivalenol, Nivalenol and Fusarenone X; Ochratoxin A. 1993, *IARC Monogr* 56: 397–444, 489–521.

IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene: Fumonisin B<sub>1</sub>. 2002, *IARC Monogr* 82: 301–366

IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Chemical agents and related occupations. A review of human carcinogens: Aflatoxins. 2012, *IARC Monogr* 100F: 225–248.

IARC Agents classified by the *IARC monographs*, volumes 1–121. 2018, <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>, pristupljeno 12.6.2018.

Jakšić Despot D, Šegvić Klarić M. A year-round investigation of indoor airborne fungi in Croatia. *Arch Ind Hyg Toxicol*, 2014, 65, 209–218.

Jakšić Despot D, Kocsubé S, Bencsik O, Kecskeméti A, Szekeres A, Vágvölgyi C, Varga J, Šegvić Klarić M. Species diversity and cytotoxic potency of airborne sterigmatocystin-producing Aspergilli from the section *Versicolores*. *Sci Total Environ*, 2016, 562, 296–304.

Ježak K, Kozajda A, Sowiak M, Brzeźnicki S, Bonczarowska M, Szadkowska-Stańczyk I. The capability of fungi isolated from moldy dwellings to produce toxins. *Int J Occup Med Environ Health*, 2016, 29, 823–836.



- Jurjevic Z, Peterson SW, Horn BW. *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. *IMA Fungus*, 2012, 3, 59–79.
- Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. *Mycoses*, 2009, 52, 206–222.
- Ostry V, Malir F, Toman J, Grosse Y. Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Res*, 2017, 33, 65–73.
- Pan American Health Organization. Natural Disasters – Protecting the Public's Health. Washington, 2000, World Health Organization, 130.
- Piecková E. Adverse health effects of indoor moulds. *Arch Ind Hyg Toxicol*, 2012, 63, 545–549.
- Polizzi V, Delmulle B, Adam A, Moretti A, Susca A, Picco AM, Rosseel Y, Kindt R, Van Bocxlaer J, De Kimpe N, Van Peteghem C De Saeger S. JEM Spotlight: Fungi, mycotoxins and microbial volatile organic compounds in mouldy interiors from water-damaged buildings. *J Environ Monit*, 2009, 11, 1849.
- Rao CY, Riggs MA, Chew GL, Muilenberg ML, Thorne PS, Van Sickle D, Dunn KH, Brown C. Characterization of airborne molds, endotoxins, and glucans in homes in New Orleans after Hurricanes Katrina and Rita. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73, 1630–1634.
- Rocha O, Ansari K, Doohan FM. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Addit Contam*, 2005, 22, 369–378.
- Rojas TI, Aira MJ. Fungal biodiversity in indoor environments in Havana, Cuba. *Aerobiologia*, 2012, 28, 367–374.
- Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B. Food and Indoor Fungi. 2010, CBS Laboratory Manual Series.
- Shin SH, Ponikau JU, Sherris DA, Congdon D, Frigas E, Homburger HA, Swanson MC, Gleich GJ, Kita H. Chronic rhinosinusitis: An enhanced immune response to ubiquitous airborne fungi. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 114, 1369–1375.

- Siqueira JPZ, Sutton DA, Gené J, García D, Wiederhold N, Peterson SW, Guarro J. Multilocus phylogeny and antifungal susceptibility of *Aspergillus* section *Circumdati* from clinical samples and description of *A. pseudosclerotiorum* sp. nov. *J. Clin. Microbiol*, 2017, 55, 947.
- Sweeney MJ, Dobson AD. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int J Food Microbiol*, 1998, 43, 141–158.
- 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 B(1), beauvericin and ochratoxin A. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2007, 100, 157–164.
- Šegvić Klarić M, Daraboš D, Rozgaj R, Kašuba V, Pepeljnjak S. Beauvericin and ochratoxin A genotoxicity evaluated using the alkaline comet assay: single and combined genotoxic action. *Arch Toxicol*, 2010, 84, 641–650.
- Varga J, Frisvad JC, Kocsubé S, Brankovics B, Tóth B, Szigeti G, Samson RA. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud Mycol*, 2011, 69, 1–17.
- 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*). *Stud Mycol*, 2014, 78, 1–61.
- WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould. Copenhagen, 2009, WHO Regional Office for Europe, 248.
- Zalar P, Sybren de Hoog G, Schroers HJ, Frank JM, Gunde-Cimerman N. Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (Wallemiomycetes and Wallemiales, cl. et ord. nov.). *Antonie van Leeuwenhoek*, 2005, 87, 311–328.
- Zhao G, Yin G, Inamdar AA, Luo J, Zhang N, Yang I, Buckley B, Bennett JW. Volatile organic compounds emitted by filamentous fungi isolated from flooded homes after Hurricane Sandy show toxicity in a *Drosophila* bioassay. *Indoor Air*, 2017, 27, 518–528.

## 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. Kako bi se utvrdio kvantitativni i kvalitativni sastav plijesni 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, plijesni su identificirane do razine roda, te kvantificirane.

Plijesni rodova *Aspergillus*, *Cladosporium* i *Penicillium* izolirani su iz prašine s najvećeg broja lokacija (N = 16, N = 15, N = 15). Pri tome su plijesni roda *Cladosporium* izolirane u najvećoj koncentraciji ( $8,6 \times 10^5$  CFU/g) i to na neobnovljenim lokacijama u Gunji, na DG-18 agaru. Aspergili su izolirani u 50 puta većim koncentracijama iz prašine s poplavljenog nego s kontrolnog područja, a kladosporije u 15 puta većim koncentracijama na obnovljenim nego na kontrolnim lokacijama te ih je 4 puta više bilo na neobnovljenim nego na obnovljenim lokacijama. Nadalje, penicilije su izolirane u najvećim koncentracijama na obnovljenim lokacijama i to do 14 puta većim nego na neobnovljenim ili kontrolnim lokacijama. Plijesni roda *Alternaria* i *Wallemia* te kvasci izolirani su iz prašine sa sve tri skupine lokacija (N = 10, N = 6, N = 14, po redu). Pri tome je *Wallemia* spp. izolirana samo na DG-18 agaru. Plijesni roda *Phoma* i *Absidia* izolirane su s po jedne lokacije i to jedne obnovljene i jedne kontrolne, po redu.

Rezultati analize upućuju na rizik za zdravlje izloženih ljudi osobito u uvjetima povećane koncentracije plijesni 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.

## SUMMARY

The flood in Gunja village in Eastern Croatia in 2014, destroyed many homes and affected the changes in concentration and composition of moulds in different substrates, which also reflected on the composition of dustborne moulds. To determine the quantitative and qualitative composition of dustborne moulds, in September 2017 dust samples were collected from unrenovated (N = 5) and renovated sites (N = 6) in Gunja including renovated houses and schools as well as houses and schools at control locations in Gornji Stupnik (N = 6). Based on macroscopic characteristics of colonies growing on appropriate nutrients and their micromorphology by comparing with appropriate literature, moulds were identified to the level of genus and quantified.

*Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp. and *Penicillium* spp. were isolated from most locations (N = 16, N = 15, N = 15, respectively). In this case, *Cladosporium* spp. was isolated at the highest concentrations ( $8,6 \times 10^5$  CFU / g) from unrenovated locations in Gunji, on the DG-18 agar. The concentration of the Aspergilli were 50 times higher in flooded locations in Gunja than in the control area, and the concentration of *Cladosporium* spp. were 15 times higher in renovated locations than in control locations and were 4 times higher in unrenovated than in renovated locations. Furthermore, *Penicillium* spp. were isolated at the highest concentrations in renovated locations, up to 14 times higher than in unrenovated or control locations. The *Alternaria* spp., *Wallemia* spp. and yeasts were isolated from all three groups of sites (N = 10, N = 6, N = 14, respectively). In this case, *Wallemia* spp. was isolated only on the DG-18 agar. *Phoma* spp. was isolated from one renovated location and *Absidia* spp. was isolated from one control location.

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 fungi.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za Mikrobiologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### BIORAZNOLIKOST PLIJESNI U PRAŠINI NAKON POPLAVE

Ivana Kovačević

#### 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. Kako bi se utvrdio kvantitativni i kvalitativni sastav plijesni 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 plijesni su identificirane do razine roda, te kvantificirane.

Plijesni rodova *Aspergillus*, *Cladosporium* i *Penicillium* izolirani su iz prašine s najvećeg broja lokacija (N = 16, N = 15, N = 15). Pri tome su plijesni roda *Cladosporium* izolirane u najvećoj koncentraciji ( $8,6 \times 10^5$  CFU/g) i to na neobnovljenim lokacijama u Gunji, na DG-18 agaru. *Aspergili* su izolirani u 50 puta većim koncentracijama iz prašine s poplavljenog nego s kontrolnog područja, a *kladosporije* u 15 puta većim koncentracijama na obnovljenim nego na kontrolnim lokacijama te ih je 4 puta više bilo na neobnovljenim nego na obnovljenim lokacijama. Nadalje, penicilije su izolirane u najvećim koncentracijama na obnovljenim lokacijama i to do 14 puta većim nego na neobnovljenim ili kontrolnim lokacijama. Plijesni roda *Alternaria* i *Wallemia* te kvasci izolirani su iz prašine sa sve tri skupine lokacija (N = 10, N = 6, N = 14, po redu). Pri tome je *Wallemia* spp. izolirana samo na DG-18 agaru. Plijesni roda *Phoma* i *Absidia* izolirane su s po jedne lokacije i to jedne obnovljene i jedne kontrolne, po redu.

Rezultati analize upućuju na rizik za zdravlje izloženih ljudi osobito u uvjetima povećane koncentracije plijesni 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.

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

Rad sadrži: 29 stranica, 7 grafičkih prikaza, 0 tablica i 48 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: poplava, plijesni u prašini, mikotoksini, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*

Mentor: **Dr. sc. Maja Šegvić Klarić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

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

Rad prihvaćen: srpanj 2018.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Microbiology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### POST-FLOOD BIODIVERSITY OF DUSTBORNE FUNGI

Ivana Kovačević

#### SUMMARY

The flood in Gunja village in Eastern Croatia in 2014, destroyed many homes and affected the changes in concentration and composition of moulds in different substrates, which also reflected on the composition of dustborne moulds. To determine the quantitative and qualitative composition of dustborne moulds, in September 2017 dust samples were collected from unrenovated (N = 5) and renovated sites (N = 6) in Gunja including renovated houses and schools as well as houses and schools at control locations in Gornji Stupnik (N = 6). Based on macroscopic characteristics of colonies growing on appropriate nutrients and their micromorphology by comparing with appropriate literature, moulds were identified to the level of genus and quantified.

*Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp. and *Penicillium* spp. were isolated from most locations (N = 16, N = 15, N = 15, respectively). In this case, *Cladosporium* spp. was isolated at the highest concentrations ( $8,6 \times 10^5$  CFU/g) from unrenovated locations in Gunja, on the DG-18 agar. The concentration of the *Aspergilli* were 50 times higher in flooded locations in Gunja than in the control area, and the concentration of *Cladosporium* spp. were 15 times higher in renovated locations than in control locations and were 4 times higher in unrenovated than in renovated locations. Furthermore, *Penicillium* spp. were isolated at the highest concentrations in renovated locations, up to 14 times higher than in unrenovated or control locations. The *Alternaria* spp., *Wallemia* spp. and yeasts were isolated from all three groups of sites (N = 10, N = 6, N = 14, respectively). In this case, *Wallemia* spp. was isolated only on the DG-18 agar. *Phoma* spp. was isolated from one renovated location and *Absidia* spp. was isolated from one control location. 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 fungi.

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

Thesis includes: 29 pages, 7 figures, 0 tables and 48 references. Original is in Croatian language.

Keywords: flood, dustborne fungi, mycotoxins, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*

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

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

**Daniela Jakšić, Ph.D.** 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: July 2018.