Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

Četvrti simpozijum o mikotoksinima, Sarajevo, 14 juni 1991

Ožegović, Ladislav (urednik)

1996.

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/handle/123456789/824

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI
BOSNE I HERCEGOVINE

SPECIJALNA IZDANJA
VOL. CIII

Odjeljenje medicinskih nauka
Vol. 17

ČETVRTI SIMPOZIJUM O MIKOTOKSINIMA

(Sarajevo, 14 Juni 1991)

Redakcioni odbor
Seid Huković, Ladislav Ožegović, Džemal Rezaković

Glavni urednik
Ladislav Ožegović
Redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

SARAJEVO 1996

UČESTALOST I TOKSIKOGENOST SOJEVA *Aspergillus versicolor* NA PODRUČJU REPUBLIKE HRVATSKE

ZDENKA CVETNIĆ I STJEPAN PEPELJNJAK

Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Zavod za mikrobiologiju, Zagreb

Apstrakt. U toku osmogodišnjih mikoloških ispitivanja distribucije spora plijesni u zraku, u tlu, na bilju u vegetaciji te uzorcima uskladištenih žitarica i suhomesnatih proizvoda swakupljenih iz skladišta i smočnica individualnih domaćinstava na području R. Hrvatske pretraženo je 1295 uzoraka i utvrđeno je 5.7-46.3% uzoraka kontaminiranih plijesnima roda Aspergillus.

Vrsta *A. versicolor* u pretraženim uzorcima tla nije dokazana, dok se na bilju u vegetaciji javila u 0.3% (1/260), odnosno u 6.6 % (1/15) od ukupno utvrđenih Aspergillus vrsta. U zraku je ova vrsta bila prisutna u 4.9% (15/305), odnosno u 27.7% (15/54), u skladištima u 0.7% (2/285), odnosno 1.6% (2/124) i smočnicama u 3.8% (15/395), odnosno 8.2% (15/183) uzoraka. Intenzitet kontaminacije uzoraka sa *A. versicolor* bio je od 1-5 (maksim.5).

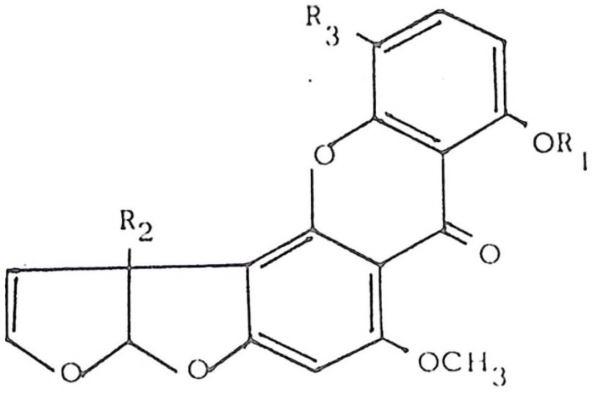
Biosintezom na vlažnoj pšeničnoj prekrupi ispitana je toksikogena sposobnost tvorbe sterigmatocistina (ST) i aflatoksina (AF) 25 sojeva *A. versicolor*.

Multitoksinskom TLC metodom utvrđeno je 32% (8/25) producenata sterigmatocistina u koncentracijama 4.0-480.0 mg ST/kg. Najtoksikogeniji soj izoliran je iz zraka. Nijedan ispitani soj nije tvorio aflatoksine.

UVOD

Među mnogobrojnim plijesnima koje svojim toksičnim metabolitima (mikotoksinima) mogu štetno djelovati na zdravlje ljudi i životinja vrsta *Aspergillus versicolor* iz roda Aspergillus posebno je zanimljiva zbog mogućnosti tvorbe sterigmatocistina (ST) i aflatoksina (AF).

Molekula sterigmatocistina sastoji se od ksantonske jezgre (dibenzopiran) na koju su vezana dva furanska prstena (slika 1) (1).



$C_{18}H_{12}O_6$

R_1 –H

R_2 –H

R_3 –H

Slika 1. Kemijska struktura sterigmatocistina

Postoji sličnost u kemijskoj građi molekula sterigmatocistina i aflatoksina B_1, a visoka reaktivna bifuranska struktura odgovorna je za mnoga farmakološka svojstva obaju toksina.

Sterigmatocistin je toksična supstancija sa karcinogenim i mutagenim svojstvima, koja su dokazana na brojnim pokusnim životinjama (2, 3). Njegova toksikogenost slična je učincima koje izazivaju aflatoksini, samo manje izražena. Prema navodima autora Schroeder i Kelton (4), srednja letalna doza (LD_{50}) intraperitonealno) sterigmatocistina za štakore iznosila je 60 mg/kg tjelesne težine, a LD_{50} aflatoksina B_1 bila je 6 mg/kg tjelesne težine. U pokusima na pačićima aflatoksin B_1 se pokazao više od 100 puta djelotvorniji od sterigmatocistina u nastajanju hiperplazije žučnih kanalića (1, 4). Međutim, tvorba sterigmatocistina u odnosu na tvorbu aflatoksina je znatno kvantitativno veća, pa se u literaturi navode podaci o prinosu sterigmatocistina i do 12 g/kg supstrata (5, 6).

Sposobnost tvorbe sterigmatocistina, uz *A. versicolor* vrstu, imaju brojne druge vrste unutar rodova Aspergillus (*A. glaucus gr.*, *A. flavus* i *A. parasiticus*, *A. nidulans*), Penicillium (*P. luteum*) i Bipolaris (*B. sorokiniana*) (4, 6).

Polazeći od saznanja mogućeg toksikogenog učinka sterigmatocistina, cilj našeg istraživanja je bio utvrditi učestalost *A. versicolor* vrste u uzorcima zemlje, zraka, bilja u vegetaciji, uskladištenih žitarica i suhomesnatih proizvoda, te utvrditi toksikogenost sojeva ove vrste u postupku biosinteze in vitro.

MATERIJAL I METODE

Tokom mikoloških ispitivanja distribucije spora plijesni na širem području Republike Hrvatske pretraženo je ukupno 1295 uzoraka. Ispitano je 50 uzoraka različitih vrsta tla sakupljenih sa livada, polja, vrtova i dvorišta. Na geografski različitim lokacijama sakupljeno je i mikološki pretraženo 305 uzoraka zraka.

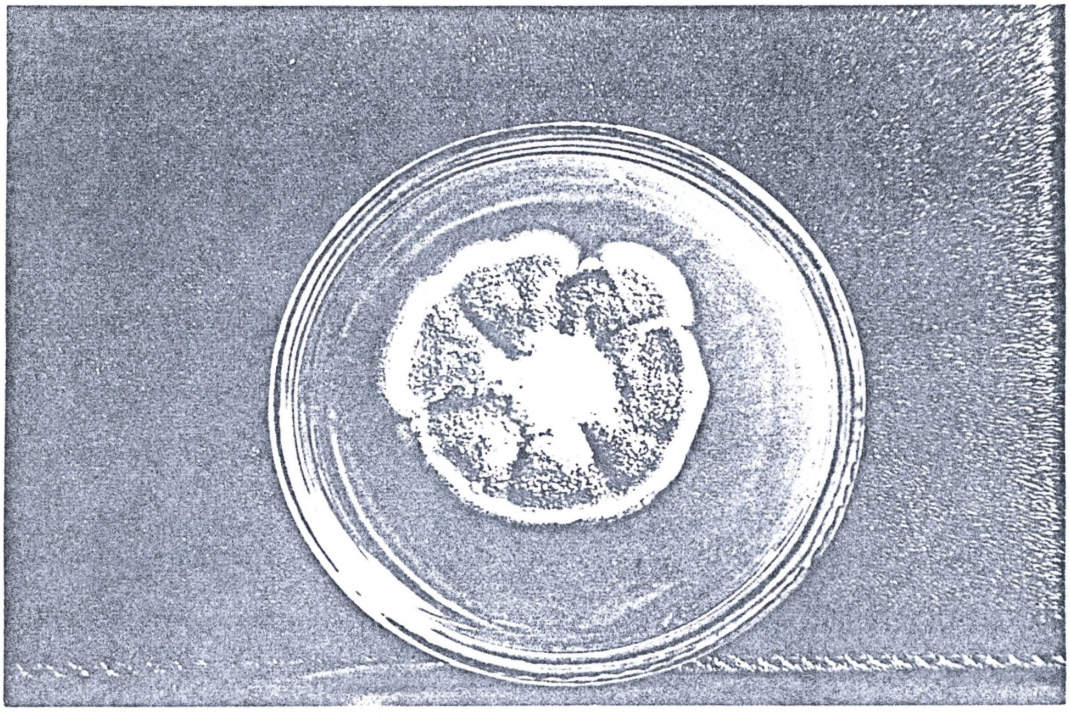
U razdoblju ljetnih mjeseci za mikološka ispitivanja bilja u vegetaciji sabrano je sa njiva 260 uzoraka klasja žitarica prije žetve, listova kukuruza, djeteline, raznog povrća, okolnog bilja i trava na kojima nije bilo vidljivih znakova kvarenja.

Biosintezom na vlažnoj pšeničnoj prekrupi (25 g, 40 % vlage u 250 ml Erlenmayer bocama) ispitana je sposobnost tvorbe sterigmatocistina (ST) i aflatoksina (AF) 25 sojeva *A. versicolor*. Sterilna pšenična prekrupa (121°C/1 sat) inokulirana je sa 1 ml suspenzije oko 10^6 spora.

Kvalitativna i polukvantitativna determinacija sterigmatocistina provedena je metodom tankoslojne kromatografije (TLC) prema Stack i Rodricks (9).

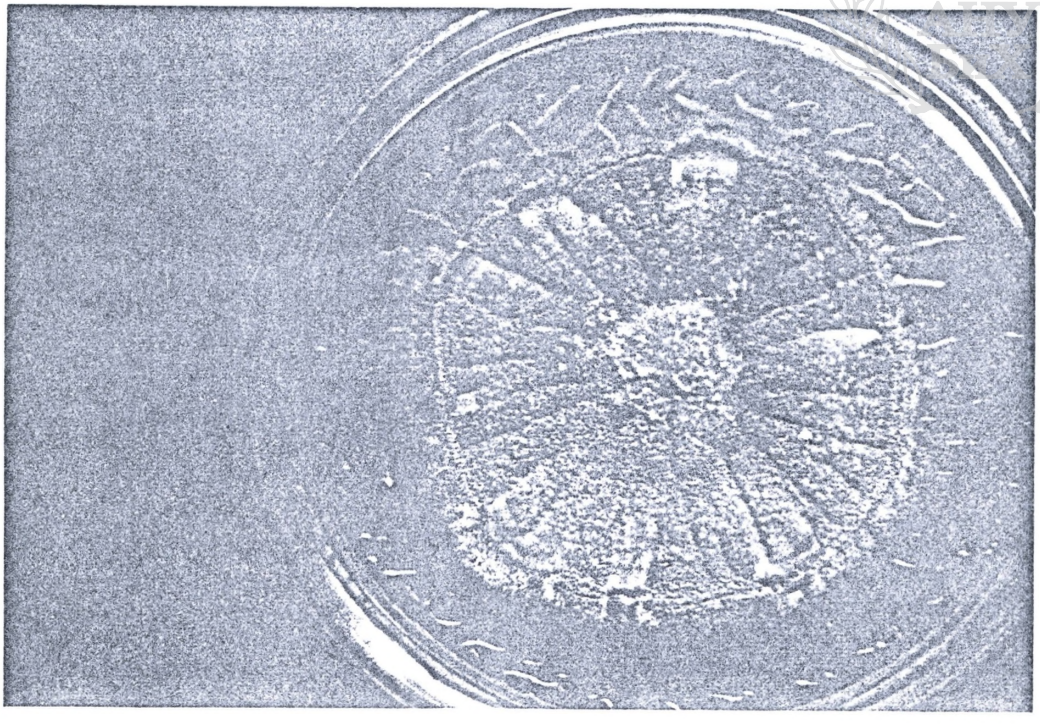
Kao test kultura plijesni uzet je soj *A. versicolor* T–37 dobiven od dr. P. Lepom (Acad. of Agricul. Sci. of Germany).

Ekstrakcija toksina iz biomase vršena je pomoću acetonitrila i otopine kalijeva klorida (9+1) te vode sa kloroformom. Kloroformski ekstrakti uzoraka upareni su do suha i resuspendirani u 0,2 ml klorofrma te nanešeni na silika gel H kromatografske ploče u količini 1 μl, 5 μl i 10 μl, te su uspoređivane Rf vrijednosti i svojstva fluoroscencije sa standardnom sterigmatocistina (ST Carol ROTH–D 75) u koncentraciji 50 μg/ml.



Sl. 1 – Kolonija A. versicolor producent sterigmatocistima (10 dana rasta na cropek podlozi na 27°C)

Sl. 2 – Karakterističan oblik kolonije A. versicolor: nepravilno, radijalna izbrazdana kolonija sa pahuljičastim centrom i baršunastim rubovima, nakon 20 dana na cropek podlozi



ANU BiH

Biosintezom na vlažnoj pšeničnoj prekrupi (25 g, 40% vlage u 250 ml Erlenmayer bocama) ispitana je sposobnost tvorbe sterigmatocistina (ST) i aflatoksina (AF) 25 sojeva *A. versicolor*. Sterilna pšenična prekrupa (121°C/1 sat) inokulirana je sa 1 ml suspenzije oko 10^6 spora.

Kvalitativna i pokukvantitativna determinacija sterigmatocistina provedena je metodom tankoslojne kromatografije (TLC) prema Stack i Rodricks (9).

Kao test kultura plijesni uzet je soj *A. versicolor* T-37, dobiven od dr. P. Lepom (Acad. of Agricul. Sci. of Germany).

Ekstrakcija toksina iz biomase vršena je pomoću acetonitrila i otopine kalijeva klorida (9+1) te vode sa kloroformom. Kloroformski ekstrakti uzoraka upareni su do suha i resuspendirani u 0,2 ml kloroforma, te nanešeni na silika gel H kromatografske ploče u količini 1 μl, 5 μl i 10 μl. Zatim su uspoređivane Rf vrijednosti i svojstva fluorescencije sa standardom sterigmatocistina (ST Carol ROTH-D 75) u koncentraciji 50 μg/ml.

Kao razvijač upotrebljen je sistem otapala kloroform : aceton : heksan (85+15+20).

Promatranjem kromatograma pod UV svjetlom valne dužine 365 nm, sterigmatocistin se pojavljuje kao cigla crvena fluorescentna točka kod Rf cca 0.6. Potvrdni test proveden je prskanjem kromatograma 20% etanolnom otopinom $AlCl_3$ i žarenjem ploče 10 min. na 100°C. Ponovnim promatranjem pod UV svjetlom sterigmatocistin daje svijetložutu fluorescenciju. Za svaki pozitivni nalaz uz ovaj test proveden je i postupak dvodimenzionalne kromatografije (10).

REZULTATI I DISKUSIJA

Utvrđivanjem distribucije spora plijesni roda Aspergillus s posebnim osvrtom na vrstu *A. versicolor* mikološkim pretragama većeg broja različitih uzoraka utvrđene su aspergile u 29.6% (384/1295) uzoraka. Od ukupnog broja izoliranih aspergila, *A. versicolor* vrsta činila je 8.5% (33/384), odnosno 2.5% (33/1295) u odnosu na broj pretraženih uzoraka.

U pretraženim uzorcima tla, iako su aspergile dokazane u 16.0% (8/50), vrsta *A. versicolor* nije utvrđena (tablica 1).

Aspergile nisu bile česte ni na uzorcima bilja u vegetaciji i javile su se u 5.7% (15/260) uzoraka, a *A. versicolor* vrsta u 6.6% (1/15), odnosno u 0.3% (1/260) od ukupno mikološki pretraženih uzoraka.

Spore aspergila u zraku činile su 17.7% (54/305) i zauzimale su peto mjesto po učestalosti iza rodova Cladosporium, Penicillium, Alternaria i Absidia. *A. versicolor* vrsta relativno je često izolirana iz zraka u 27.7% (15/54) odnosno u 4.9% (15/305) ukupnog broja uzoraka, a slijedila je plijesan *A. glaucus* (11/3%).

Tablica 1. NALAZ ASPERGILA U OKOLIŠU, SKLADIŠTIMA, SMOČNICAMA

Uzorci	Broj ispitanih uzoraka	Rod Aspergillus		Vrsta			
				Aspergillus		versicolor	
		n	%	n	%[1]	%[2]	IK
Tlo	50	8	16.0	-	-	-	-
Bilje u veget.	260	15	5.7	1	6.6	0.3	1
Zrak	305	54	17.7	15	27.7	4.9	1
Skladišta:							
Grah	65	40	61.5	2	5.0	3.0	1
Kukuruz	65	13	20.0	-	-	-	-
Pšenica, zob	85	33	38.8	-	-	-	-
Krmne smjese	35	14	40.0	-	-	-	-
Kikiriki	25	16	64.0	-	-	-	-
Soja	20	8	40.0	-	-	-	-
Ukupno:	285	124	43.5	2	1.6	0.7	1
Smočnice:							
Slanina	160	56	35.0	8	14.2	5.0	1-4
Šunka	130	72	55.3	5	6.9	3.8	1-5
Kobasice	80	37	46.2	2	5.4	2.5	1
Pršut	25	18	72.0	-	-	-	-
Ukupno	395	183	46.3	15	8.2	3.8	1-5
Ukupno svih uzoraka:	1295	384	29.6	33	8.5	2.5	1-5

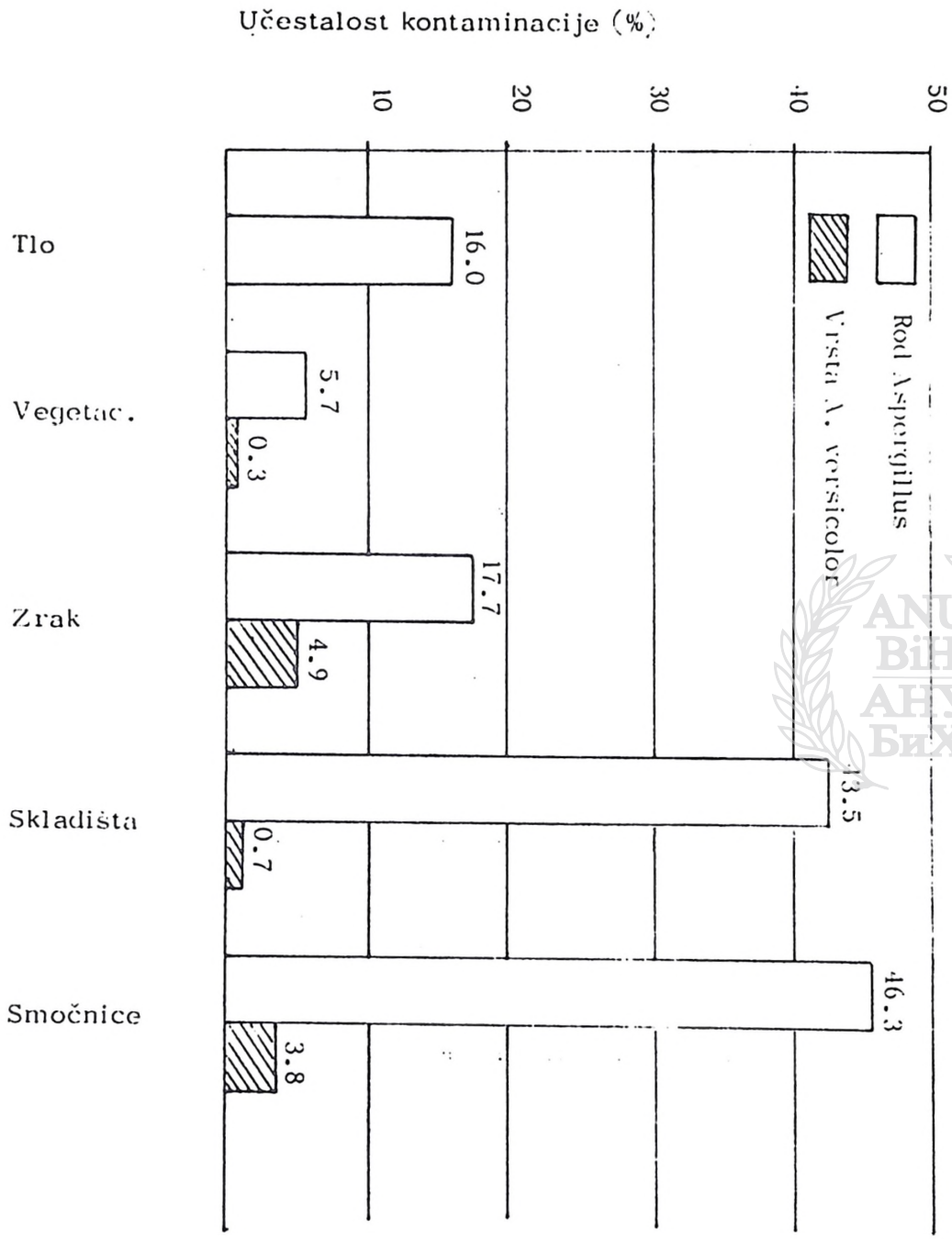
Učestalost pojavljivanja plijesni iz roda Aspergillus u skladištima iznosila je 43.5% (124/285) a najveća je bila na uzorcima graha 61.5% (40/65) i uzorcima kikirikija 64.0% (16/25) od sveg uskladištenog zrnevlja. Vrsta *A. versicolor* dokazana je samo na grahu u 5.0% (2/40), odnosno u 3.0% (2/65) od ukupno pretraženog uskladištenog graha.

Na uzorcima suhomesnatih prerađevina iz smočnica učestalost aspergila iznosila je 46.3% (183/395), a na uzorcima šunke 55.3% (72/130) i uzorcima pršuta 72.0% (18/25) aspergile su dominirale, međutim sa pršuta nije izoliran nijedan soj *A. versicolor* vrste. Na drugim uzorcima ova plijesan javila se u 8.2% (15/183) odnosno 3.8% (15/395).

Na graf. 1 prikazan je nalaz plijesni roda Aspergillus i vrste *A. versicolor* u odnosu na broj pretraženih uzoraka. Plijesni roda Aspergillus dominirale su u skladištima i smočnicama, a vrsta *A. versicolor* u zraku (graf. 1).

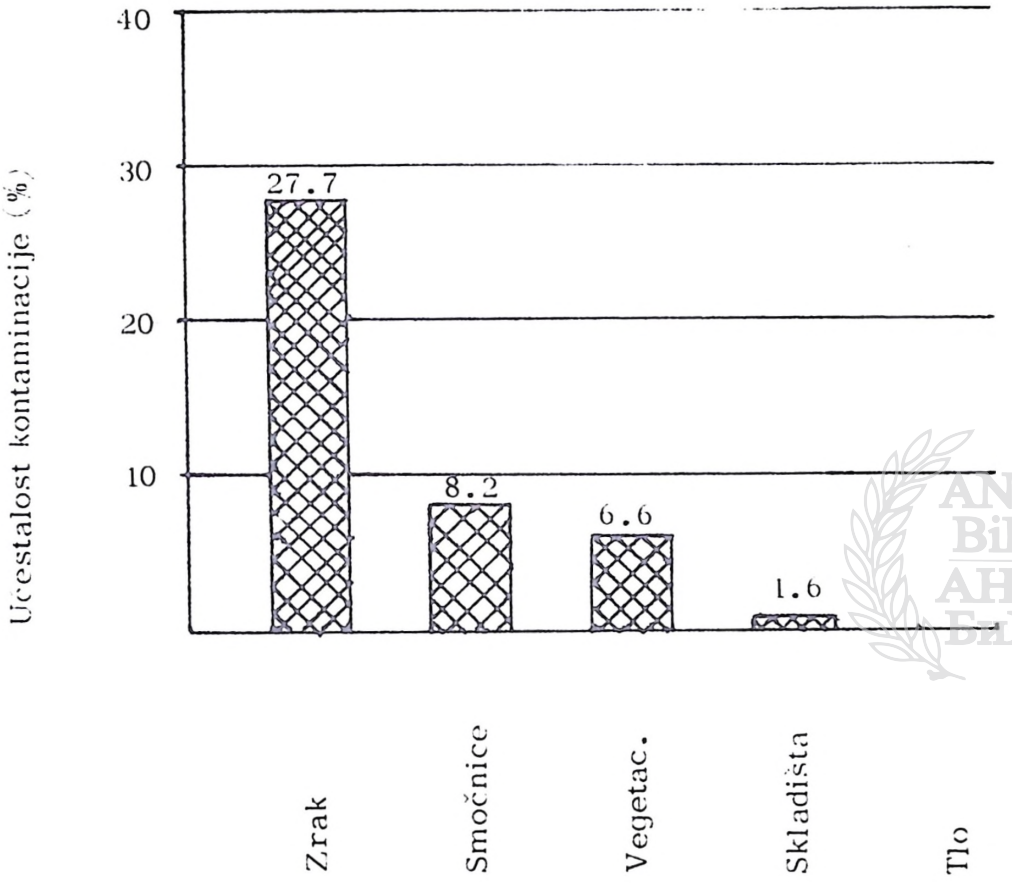
Učestalost *A. versicolor* vrste u odnosu na ukupan broj utvrđenih aspergila prikazana je na graf. 2.

Vrsta *A. versicolor* dominirala je u zraku (27.7%), a najniža učestalost dokazana je u skladištima (1.6%), dok iz uzoraka tla nije izolirana.



Graf.1. Učestalost plijesni roda *Aspergillus* i vrste *A. versicolor* u odnosu na broj ispitanih uzoraka

ANU BiH
АНУ БиХ



Graf.2. Učestalost *A. versicolor* vrste u odnosu na ukupan broj izoliranih aspergila

Toksikogena sposobnost tvorbe sterigmatocistina i aflatoksina B_1 B_2 G_1 i G_2 provedena je na petnaest sojeva *A. versicolor* izoliranih iz zraka i deset sojeva izoliranih iz uzoraka slanine, šunke i kobasica. Sposobnost tvorbe sterigmatocistina (sterigmatocistinogenost) imalo je 32.0% (8/25) sojeva u rasponu koncentracije 4.0-480.0 mg ST/kg. Nijedan ispitani soj nije tvorio aflatoksine (tablica 2).

Tablica 2. STERIGMATOCISTOGENOST SOJEVA *Aspergillus versicolor*

Porijeklo sojeva	Broj ispitanih sojeva	Produkcija toksina		Broj i % toksikogenih sojeva		Sterigmatocistin
		ST	AF			mg/kg
Zrak	15	+	-	6	40.0	4.0-480.0
Slanina	5	+	-	1	20.0	16.0
Šunka	3	-	-	-	-	-
Kobasica	2	+	-	1	50.0	120.0
T-37	/	+	-	/	/	420.0
Ukupno	25	(+-)	-	8	32.0	4.0-480.0

T-37 referentni soj

Rezultati mikoloških pretraga uzoraka tla sa različitih i geografski udaljenih područja širom svijeta ukazuju na varijabilnost učestalosti plijesni u tlu.

U našim nalazima vrste rodova Rhizopus, Absidia, Mucor i Fusarium su najčešće izolirane plijesni. Najučestalije vrste roda Aspergillus su *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. nidulans* i *A. terreus*.

Na bilju u vegetaciji i raznim vrstama usjeva prije žetve dominiraju uglavnom "plijesni polja" sa rodovima Fusarium, Alternaria i Cladosporium.

Slične rezultate dobili smo u našim ranijim istraživanjima, gdje su ove plijesni bile zastupljene u uzorcima od 20.0-100.0% (5, 9). Aspergillus vrste u 5.7% i *A. versicolor* u 0.3% pokazuju da su one rijetko prisutne na bilju u vegetaciji, dok su učestalije u skladištima i smočnicama kao tzv. "skladišne plijesni".

Plijesni roda Aspergillus često su prisutne u zraku širom svijeta i mogu se smatrati tzv. "univerzalno dominantnim" vrstama uz vrste iz rodova Alternaria, Cladosporium, Penicillium, Fusarium i neke druge (11). Literaturni podaci ukazuju na relativno česti nalaz aspergila u zraku, od 2.8% u zraku Barcelone (12) do 79.0% u zraku Kartuma (Sudan) (13). Zanimljiv je nalaz učestalosti aspergila u 95.0% uzoraka zračne prašine u Taifu (Saud. Arabija), gdje je dokazano 13 vrsta, među kojima su dominirale *A. niger*, *A. flavus*, *A. sydowi* i *A. versicolor* (14).

Pojavljivanje spora plijesni u zraku ima sezonski karakter, pa je tako varijacija učestalosti nalaza aspergila češća u zimskom razdoblju (12, 15).

Naši nalazi aspergila u 17.7% ukazuju na osrednju učestalost spora ovih plijesni u zraku, a vrsta *A. versicolor* u 4.9% uzoraka zauzima prvo mjesto po učestalosti u odnosu na izolate sa bilja u vegetaciji, (0.3%) uskladištenih žitarica (0.7%) i uzoraka iz smočnica (3.8%).

Mikološka ispitivanja uzoraka uskladištenih žitarica, krmnih smjesa za tov, zrna kikirikija i soje pokazuju visoku učestalost kontaminacije uzoraka tzv. "skladišnim plijesnima", prije svega vrstama roda Penicillium (78.0%) i Aspergillus (43.5%). Nalaz *A. versicolor* u 0.7% uzoraka ukazuje na relativno nisku učestalost

ove plijesni u skladištima. Od ukupno 285 raznih uskladištenih uzoraka, ova vrsta dokazana je u dva uzorka graha. Kontaminacija uzoraka iz skladišta češća je vrstama *A. flavus* (15.0%) i *A. ochraceus* (10.8%) (16).

Sličnu dominantnu mikrofloru "skladišnih plijesni" Penicillium (86.0%) i Aspergillus (70.0%) pokazala su naša ranija istraživanja mikološke kontaminacije uzoraka iz smočnica (17). Niža učestalost Aspergillus vrsta (46.3%) u ovom istraživanju ukazuje samo na varijabilnost pojavljivanja onih plijesni u smočnicama, a nalaz *A. versicolor* vrste u 3.8% uzoraka suhog mesa u odnosu na učestalost u skladištu (0.7%) ili na bilju u vegetaciji (0.3%) ukazuju da su suhomesnati proizvodi češće kontaminirani ovom vrstom plijesni, a što može biti od značaja s obzirom na moguću toksikogenost.

U literaturi nalazimo podatke o relativno visokom postotku toksikogenih sojeva. Lepom i Kloss (18) su izolirali sa uzoraka sijena i slame tokom zime *A. versicolor* u 14.5% uzoraka. Testiranjem 19 sojeva, svi su tvorili sterigmatocistin u koncentracijama većim od 500 mg/kg. Također Orth (19) nalazi 60.0% producenata sterigmatocistina od 90 ispitanih sojeva *A. versicolor* izoliranih iz stočne hrane.

Naši rezultati 32.0% toksikogenih sojeva ukazuju na široki raspon u stupnju toksikogenosti. Prema količinama stvorenog toksina možemo sojeve *A. versicolor* svrstati u slabe (4.0 mg ST/kg) i dobre (480.0 mg ST/kg) proizvođače sterigmatocistina.

Izvještaje o visokotoksikogenim sojevima i prinosu sterigmatocina od 5-12 g/kg supstrata iznose Steyn i Rabie (5) te Rabie i sur. (6). Postignuti prinos dobiven je biosintezom na cijelom zrnu kukuruza na 27°C kroz 22 dana.

Vlažna pšenična prekrupa kao kruti substrat u biosintezi sterigmatocistina također se u literaturi navodi kao vrlo pogodan substrat na kojem je dobiven prinos od 6267.0 μg ST/ g substrata. U odnosu na kukuruzno brašno, ječam, rižu i neke tekuće kemijski definirane hranjive podloge, veći prinos (9600.0 μg ST/g) postignut je na krušnim mrvicama (20). Svi dobiveni rezultati postignuti su u optimalnim laboratorijskim uvjetima.

S obzirom na moguću kontaminaciju hrane (ljudi i životinja) sa *A. versicolor* plijesni i poznatu patogenost sterigmatocistina, ovaj toksin spada u mogući rizični faktor za zdravlje ljudi i životinja.

ZAKLJUČAK

- Na osnovu provedenih mikoloških analiza 1295 uzoraka tla, bilja u vegetaciji, zraka, uskladištenih žitarica i suhomesnatih proizvoda, plijesni roda Aspergillus javile su se u rasponu 5.7-46.3%, a dominirale su na uzorcima iz skladišta (43.5%) i smočnica (46.3%).

- Vrsta *A. versicolor* sa 4.9% bila je najčešća u zraku, a nije izolirana ni iz jednog uzorka tla.

- Provedenom biosintezom utvrđeno je 32.0% (8/25) *A. versicolor* sojeva proizvođača sterigmatocistina. Sposobnost tvorbe ovog toksina različita je u pojedinih sojeva i kreće se od 4.0 mg-480.0 mg ST/kg pšenične prekrupe.

- Najbolji proizvođač sterigmatocistina izoliran je iz zraka i proizveo je 480.0 mg ST/kg, dok su sojevi iz suhomesnatih proizvoda tvorili između 16.0 i 120.0 mg ST/kg.

Nijedan soj *A. versicolor* nije dokazan kao producent aflatoksina.

FREQUENCY AND TOXICOGENICITY OF *Aspergillus versicolor* STRAINS ON THE AREA OF REPUBLIC CROATIA

S u m m a r y

Mycological analyses of 1295 samples of soil, plants in vegetation, air, stored grains and dried meat collected in R. Croatia showed 5.7-46.3% of samples to be contaminated by moulds of genus Aspergillus. The most frequently occurrence of Aspergillus spp were in the samples of stored grains (43.5%) and the samples of dried meat products (46.3%). *Aspergillus versicolor* species was predominant in the samples of air (4.9%) with contamination intensity of 1-5 (max.5).

A biosynthetic procedure on sterile moist crushed wheat was provided on 25 *A. versicolor* strains. The strains tested for sterigmatocystin and aflatoxin production were isolated from the air, bacon, smoked ham and sausages.

The identity and quantity of sterigmatocystin in the extracts were determined by thin-layer-chromatography (TLC).

Out of 25 *A. versicolor* strains 8/25 (32.0%) produced sterigmatocystin (conc.. ST 4.0-480.0 mg/kg). The strongest producer was isolated from the air.

Out of all examined strains no one produced aflatoxins.

L I T E R A T U R A

(1) Hamasaki, T., Yuichi, H. (1977): *Sterigmatocystin and related compounds*. In: Rodricks, J.V. et al. (eds). Mycotoxins in human and animal health, Pathotox Publishers, INC, Illinois, pp 597-607.

(2) Purchase, I. F. H., Van der Watt, J. J. (1970): *Carcinogenicity of sterigmatocystin*. Food Cosmetol. Toxicol., 8, 289-295.

(3) Van der Watt, J. J. (1974): *Sterigmatocystin*. In I.F.H. Purchase (ed), Mycotoxins, Elsevier, Amsterdam, p. 369-382.

(4) Schroeder, H. W., Kelton, W. H. (1975): *Production of sterigmatocystin by some species of the genus Aspergillus and its toxicity to chicken embryos.* Appl. Microbiol., 30, 589-591.

(5) Steyn, M., Rabie, C. J. (1975): *Production of sterigmatocystin.* J. of the AOAC, 58, 622-623.

(6) Rabie, C. J., Lübben, A., Steyn, M. (1976): *Production of sterigmatocystin by Aspergillus versicolor and Bipolaris sorokiniana on semisynthetic liquid and solid media.* Appl. Environ. Microbiol., 32, 206-208.

(7) Pepeljnjak, S., Cvetnić, Z. (1985): *Plijesni bilja u vegetaciji na nefropatičnom i anefropatičnim područjima SR Hrvatske.* Acta Biologica Iugoslavica, Ser. B, Mikrobiologija, 22, 51-57.

(8) Raper, K. B., Fennell, D. J. (1965): *The Genus Aspergillus.* The Will. and Wilk. Co., Baltimore.

(9) Stack, M., Rodricks, J. V. (1971): *Method for analysis and chemical confirmation of sterigmatocystin.* J. of the AOAC, 54, 86-90.

(10) Van Egmond, H. P., Paulsch, W. E., Deijll, E., Schuller, P. L. (1980): *Thin layer chromatographic method for analysis and chemical confirmation of sterigmatocystin in cheese.* J. of the AOAC, 63, 110-114.

(11) Al-Doory, Y., Domson, J. P., Howard, W. A., Sly, R. M. (1980): *Air borne fungi and pollens of the Washington, D.C., metropolitan area.* Ann. Allerg., 45, 360-367.

(12) Calvo, M. A., Guarro, J., Suarez, G., Ramirez, C. (1980): *Air borne fungi in Barcelona city (Spain).* III. The genus Aspergillus Link. Mycopathol., 71, 41-43.

(13) Abdalla, M. H. (1988): *Prevalence of airborne Aspergillus flavus in Kartoum (Sudan). Air spora with reference to dusty weather and inoculum survival in simulated summer conditions.* Mycopathol., 104, 137-141.

(14) Abdel-Hafez, S. I. I. (1985): *Survey of airborne fungus spores of Taif, Saudi Arabia.* Mycopathol., 88, 39-44.

(15) Larsen, L. S. (1981): *A three-year-survey of microfungi in the air of Copenhagen 1977-79.* Allerg., 36, 15-22.

(16) Cvetnić, Z. (1987): *Raširenost i toksogenost Aspergillus flavus i Aspergillus ochraceus vrsta na području SR Hrvatske.* Disertacija, Sveučilište u Zagrebu. Prirodoslovno-matematički fakultet.

(17) Cvetnić, Z., Pepeljnjak, S. (1986): *Distribucija i nalaz toksogenih vrsta plijesni na suhomesnatim proizvodima.* Vet. arhiv, 56, 75-82.

(18) Lepom, P., Kloss, H. (1988): *Production of sterigmatocystin by Aspergillus versicolor isolated from roughage.* Mycopathol., 101, 25-29.

(19) Orth, R. (1977): *Occurrence and estimation of sterigmatocystin producing strains of Aspergillus versicolor in foodstuffs.* Zesz. Probl. Postepow. Nauk Roln., 189, 25-33.

(20) Bennett, J. W., Henderberg, A., Grossman, K. (1989): *Sterigmatocystin production on complex and defined substrates.* Mycopathol., 105, 35-38.