

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
KEEMIA INSTITUUT

Rain Laidma

**Musta hallituse (*Stachybotrys chartarum*) määramise võimalused
biosensoriga**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendajad:

Toonika Rinke, PhD

Leho Tedersoo, PhD

Kaitsmisele lubatud:

Juhendaja: _____

Tartu 2021

Musta hallituse (*Stachybotrys chartarum*) määramise võimalused biosensoriga

Käesolevas töös konstrueeriti antikeha – antigeen reaktsioonil põhinev biosensor musta hallituse (*Stachybotrys chartarum*) tuvastamiseks. Must hallitus on saprofüütiline organism, mis kasvab veekahjustusega ja kõrge tselluloosi sisaldusega materjalil, nagu kipsplaadi kattepaper ja puit ning on võimeline tootma inimestele kahjulikke mükotoksiine. Kujutades ohtu inimeste tervisele on oluline määrata musta hallituse olemasolu siseruumides, vältides seeläbi ohtu inimeste tervisele. Biosensorite kasutuselevõtt võimaldab tuvastada musta hallituse kiiresti ning selektiivselt, elimineerides aeganõudvate määramismeetodite kasutamise vajaduse.

Märksõnad: *biosensor, Stachybotrys chartarum, antikeha, antigeen.*

CERCS: T270, Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll.

Options for biosensing black mould (*Stachybotrys chartarum*)

The aim of this work was to utilise an antibody – antigen specific reaction for the detection of black mould (*Stachybotrys chartarum*). Black mould, which is a saprophytic organism, grows on materials with high cellulose content like drywall cover paper and wood, which have sustained water damage. It is important to identify black mould presence indoors, since it is able to produce harmful mycotoxins and therefore presents a threat to human health. The application of biosensors enables fast and selective detection of black mould, therefore eliminating the need for time consuming detection methods.

Keywords: *biosensor, Stachybotrys chartarum, antibody, antigen.*

CERCS: T270, Environmental technology, pollution control.

Sisukord	
Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1 Seeneliik <i>Stachybotrys chartarum</i>	7
1.1.1 Perekond <i>Stachybotrys</i>	7
1.1.2 Liik <i>Stachybotrys chartarum</i>	7
1.1.3 <i>Stachybotrys chartarum</i> morfoloogia	8
1.1.4 <i>Stachybotrys chartarum</i> ja teised hallitused	9
1.1.5 „Haige maja sündroom“	10
1.1.6 <i>Stachybotrys chartarum</i> esinemine ning piirmäärad	10
1.1.7 Toksiinide sattumine organismi	11
1.2 <i>Stachybotrys chartarum</i> toksiinid	11
1.2.1 Trihhotetseenid	12
1.2.2 Stahhüraas A	13
1.2.3 Mükotoksiinide poolt põhjustatud haigusnähud	13
1.3 Meetodid hallituste tuvastamiseks	13
1.3.1 Mikroskoopia	14
1.3.2 Hallituste tuvastamine geneetilise materjali alusel	14
1.3.3 Voolutsütomeetria	14
1.3.4 ELISA	15
1.3.5 Kromatograafilised analüüsid	16
1.4 Biosensorid <i>Stachybotrys chartarum</i> määramiseks	17
2. Eksperimentaalne osa	19
2.1 Kasutatud reagentid ja materjalid	19
2.2 Kasutatud aparatuur	19
2.3 Kasutatud meetodid	20
2.3.1 Seenekultuuride külv	20
2.3.2 Spooride kogumine	21
2.3.3 Spooride kontsentratsiooni määramine	21
2.3.4 Antikehade dialüüs ning immobiliseerimine graanulitele	22

2.3.5	Antikehade konjugeerimine fluorentsmarkeriga	23
2.3.6	Biosensoriga läbiviidavate mõõtmiste protokoll	23
2.3.7	Biosensori signaali määramine	24
3.	Tulemused ja arutelu	26
3.1	Musthallituse spooride kontsentratsioon kultuuris	26
3.2	Biosensorsüsteemi disain ja konstrueerimine <i>Stachybotrys chartarum</i> määramiseks....	28
3.3	Mõõteprotokolli optimeerimine	28
3.4	<i>Stachybotrys chartarum</i> kontsentratsiooni määramine	29
	Kokkuvõte	31
	Summary.....	32
	Kasutatud kirjandus.....	33
	Tänavaldused	41
	Lisa 1. Puhaskultuuri TCF202504 osakeste määramine.	42
	Lisa 2. Puhaskultuuri TFC202505 osakeste määramine.	43
	Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	44

Kasutatud lühendid

BIA – Graanulsisestusanalüüs (*Bead Injection Analysis*)

CD-ELISA – Konkureeriv ensüüm-immunosorptsioon analüüs (*Competitive-Direct Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

ELISA – Ensüüm-immunosorptsioon analüüs (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

FTIR-ATR – Nõrgendatud täielik sisepeegeldus - Fourieri teisendusega infrapunaspektroskoopia (*Fourier Transform Infrared-Attenuated Reflection*)

GC-MS – Gaaskromatograafia-massispektromeetria (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry*)

HPLC-MS – Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia – massispektromeetria (*High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*)

IgY – Immunoglobuliin Y (*Immunoglobulin Y*)

IMB-ELISA – Immunomagneetilistel graanulitel põhinev ensüüm-immunosorptsioon analüüs (*Immunomagnetic-bead based Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

LOD – Avastamispiir (*Limit of Detection*)

MEA – Linnaseekstraktiga agar (*Malt Extract Agar*)

PBS – Fosfaatpuhver NaCl lisandiga (*Phosphate-buffered saline*)

PCR – Polümeraasi ahelreaktsioon (*Polymerase Chain Reaction*)

qPCR – Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (*quantitative Polymerase Chain Reaction*)

rDNA – Ribosomaalne DNA (*Ribosomal DNA*)

rpm – pööret minutis (*Rotations per minute*)

TFC – Tartu Fungal Culture Collection

Sissejuhatus

Kuna järjest enam veedavad inimesed aega siseruumides, siis puhta ja kvaliteetse õhu tagamine siseruumides on vajalik terviseprobleemide vältimiseks. Selles tulenevalt on oluline välja arendada meetodikad, mis võimaldaksid kiiresti ja lihtsalt määrata õhus leiduvaid musta hallituse spore.

Must hallitus kasvab kõrge tselluloosi sisaldusega materjalidel, nagu puit ja kipsplaadi kattepaper, mis on omandanud veekahjustuse [1]. Musta hallituse spooride õhku sattumisel kujutavad need ohtu inimestele, kuna sisaldavad endas kahjulikke mükotoksiine, mis võivad põhjustada varieeruvaid terviseprobleeme.

Üks võimalusi praegusel ajal kasutatavate kallite ja aeganõudvate protseduuride asendamiseks on biosensorite kasutuselevõtt, mis võimaldab kiiresti ja lihtsalt määrata huvipakkuvaid ühendeid, tehes sellest atraktiivse meetodi keskkonnaseirete sooritamiseks.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on konstrueerida antikeha – antigeen reaktsioonil baseeruv biosensor musta hallituse (*Stachybotrys chartarum*) määramiseks kiirelt ja lihtsalt, ilma et oleks vaja rakendada kalleid ja aeganõudvaid meetodeid.

Eesmärkide saavutamiseks peab välja töötama meetodika, millega kogutakse musta hallituse spore ning sooritatakse mõõtmisi. See hõlmab endas musta hallituse puhaskultuuride kasvatamist ja katsete läbiviimist, mille abil oleks võimalik optimeerida edaspidised mõõteprotsessid.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Seeneliik *Stachybotrys chartarum*

1.1.1 Perekond *Stachybotrys*

Kaasaegse fülogeneetilise klassifikatsiooni järgi kuulub perekond *Stachybotrys* hõimkonda *Ascomycota*, klassi *Sordariomycetes*, ja seltsi *Hypocreales* ning on lähedalt suguluses perekonnaga *Memnoniella* [2,3]. Paljunedes aseksuaalselt, kasutades selleks mittesugulise paljunemise eoseid ehk koniide, võib perekonda *Stachybotrys* klassifitseerida ka deuteromütseedina. Deuteromütseedid hõlmavad endas mitmeid liike, mille üks tuntumatest esindajatest on must hallitus (*Stachybotrys chartarum*) [4,5].

Perekonna *Stachybotrys* tunneb ära tema iseloomuliku tahmase rohekas-musta värvuse järgi. Kasvamiseks eelistab *Stachybotrys* madalat lämmastiku kontsentratsiooni, kõrget niiskussisaldust ja tselluloosirikast surnud materjali [4].

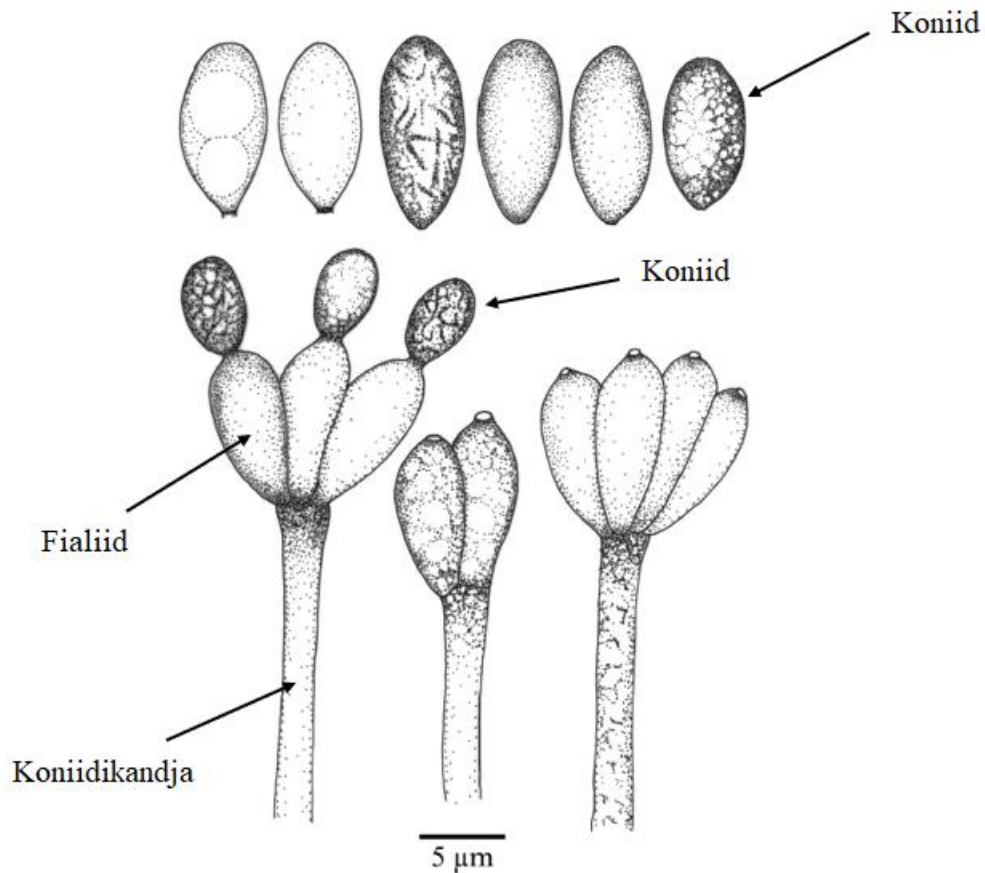
1.1.2 Liik *Stachybotrys chartarum*

Hallitused võivad esineda nii eostena kui ka idanenud niidistikuna. Elukeskkonnana eelistavad seened pinnast või taimset materjali [6]. Siseruumides loetakse hallituse esinemiseks ja levikuks soodustavateks teguriteks niiskust, veekahjustust ning halba ventilatsiooni [1].

Stachybotrys chartarum, tuntud ka *Stachybotrys atra* nime all ning üldlevinud nimetusega must hallitus, on globaalselt laialt levinud seeneliik. Olles saprofüütne organism, saab must hallitus oma elutegevuseks vajaliku energia surnud tselluloosirikka orgaanilise materjali lagundamisest. Lisaks võimaldab vähenõudlikkus temperatuuri suhtes mustal hallitusel kasvada vahemikus 15-37°C [1,7].

S. chartarum tekkeks peab substraadi niiskusesisaldus olema vähemalt 15% ning suhteline õhuniiskus jääma vahemikku 70 - 90%. Kasvusubstraatideks on kõrge tselluloosi sisaldusega materjalid nagu hein, põhk, puit ning isegi kipsplaadi kattepaber, kus liigniisked tingimused tagavad ideaalse olukorra *Stachybotrys chartarum* kasvuks [1].

1.1.3 *Stachybotrys chartarum* morfoloogia



Joonis 1. *Stachybotrys chartarum* morfoloogia [8].

Musta hallituse konidofoorid ehk koniidikandjad on välimuselt rohekas-musta värvi. Konidofoorid paiknevad püstisena kas üksikult või rühmiti ning on hargnemata või ebakorrapäraselt hargnenud. Koniide tekitavad rakud, teisisõnu fialiidid, on ellipsoidse kujuga, oliivjat värvi ning 9-14 μm pikad. Fialiidid on koniidikandjatele kinnitunud männasjalt, tekitades seetõttu silmapaistva krae-taolise moodustise. Koniidid tekivad ühekaupa fialiide ümbritsevasse limatilgakesse [9]. Musta hallituse koniidide suurused võivad olla varieeruvad, üldjuhul jäävad need suurusvahemikku 7-12 x 4-6 μm ja on välimuselt tumepruuni või musta värvi [2].

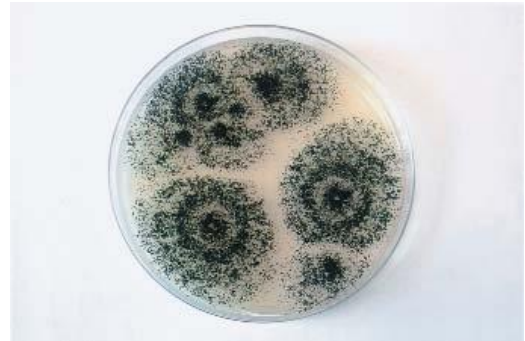
Stachybotrys chartarum spoorid vabanevad juhul kui neid mõjutatakse mehaaniliselt või juhtudel kus neid ümbritsev limakest on ära kuivanud ning spoorid kinnituvad tolmuosakestele [10]. *Stachybotrys chartarum* osad koos nimetustega on toodud joonisel 1.

1.1.4 *Stachybotrys chartarum* ja teised hallitused

Kõige sagedamini levivad hoonetes hallitused, mis kuuluvad perekondadesse *Cladosporium*, *Penicillium* ja *Aspergillus* [11]. Joonistel 2 – 4 on toodud hoonetes kõige sagedamini esinevad hallitused. Sobivate kasvutingimuste korral võib hoonetes samuti esineda perekonna *Stachybotrys* esindajad (joonis 5).



Joonis 2. *Cladosporium cladosporioides* [12]



Joonis 3. *Aspergillus niger* [13]



Joonis 4. *Penicillium chrysogenum* [14]



Joonis 5. *Stachybotrys chartarum*

S. chartarum esineb peamiselt koos teiste hallitusseente perekondade esindajatega nagu *Cladosporium*, *Aspergillus* ja *Penicillium*, mis eelistavad kasvupinnana samuti tselluloosirikast substraati. *S. chartarum* tuvastamist raskendab selle liigi aeglane kasvukiirus. Võrreldes *Cladosporium*, *Aspergillus* ja *Penicillium* esindajatega, mis on primaarsed ja sekundaarsed

koloniseerijad, on *S. chartarum* tertsiaarne koloniseerija, st hallituse kasvu alustamiseks on vaja spetsiifilisemaid tingimusi. Tertsiaarsete koloniseerijate kasv sõltub vaba vee olemasolust keskkonnas ehk vee aktiivsusest, mida defineeritakse kui vee osalise aururõhu ja vee normaalse aururõhu jagatist [15]. *S. chartarum* kasvu aktiveerimiseks peab peale sobiliku substraadi ja õhuniiskuse olema vee aktiivsuse väärtus suurem kui 0,9 [16,17].

1.1.5 „Haige maja sündroom“

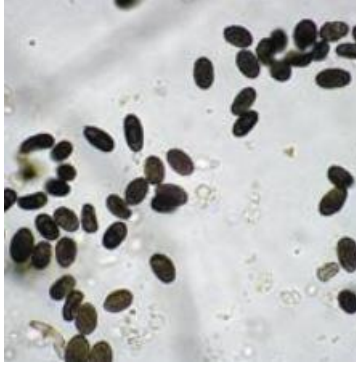
Veekahjustustega hoonetes, kus on intensiivne hallitusseente kasv võivad tekkida bio-aerosoolid, mis võivad mõjutada elanike tervist [18]. Lisaks otsesele mükotoksikoosile on tähendatud hallituste negatiivset mõju tervisele ka läbi mittespetsiifiliste sümptomite [19] mis mõjutavad nende tervist või mugavustunnet ja mida tuntakse kui „haige maja sündroomi“. Sümptomiteks loetakse peavalu, uimasust, iiveldust, ärritust silmades või hingamisteedes ning kuiva ja sügelevat nahka. Ebamugavustunne või sümptomid ei teki ühe spetsiifilise teguri tõttu, vaid mitme erineva teguri koosmõjul [20].

1.1.6 *Stachybotrys chartarum* esinemine ning piirmäärad

S. chartarum spoorid satuvad hoonetesse peamiselt läbi avatud akende ja uste või kantakse siseruumidesse koos riietega [7]. Lisaks on võimalikud mehhanismid spooride sattumiseks siseruumidesse üleujutuste ajal pinnasest väljauhtumine, tolmu ja mustuse kanne või spooridega saastunud ehitusmaterjalide paigaldamine. Hallituse kasvu aktiveerimiseks on vaja liigniiskeid tingimusi, mille põhjused võivad olla üleujutused, katkine veetorustik, kondensatsioon või lekked seintes ja katustes. Lisaks on kasvu soodustavateks teguriteks vigased ventilatsiooniseadmed ja küttesüsteemid [21]. Spooride emissiooni määravateks keskkonnatingimusteks peetakse nii suhtelist niiskust kui ka ventileeritava õhu kiirust [22-24].

Hallitusseente piirmäärad siseruumide õhus sõltuvad hallitusseente liigist. Piirmäärade kehtestamisel võetakse arvesse hallitusseente poolt toodetavaid toksine ning nende spooride suurust ja kaalu.

Õhus leiduvatele *S. chartarum* spooride kontsentratsioonile otsest piirmäära ei ole. Mõnede allikate alusel loetakse ebatavaliselt kõrgeks kontsentratsiooniks juba 48 spoori/m³ kuna *S. chartarum* spooridele pole omane õhku sattumine [22]. Teiste allikate alusel on lubatud piiriks 413 spoori/m³, erinedes eelnevalt mainitud piirmäärast ligi 9 korda [23]. Musta hallituse spoorid on kujutatud joonisel 6.



Joonis 6. *Stachybotrys chartarum* koniidid [25].

1.1.7 Toksiinide sattumine organismi

S. chartarum-i poolt toodetavaid mükotoksiine on tuvastatud kõikides hallitusseente osades [26,27]. Mükotoksiini kõrgemat kontsentratsiooni on täheldatud hallituse spoorides, mis satuvad organismi peamiselt saastunud põllumajandustoodete tarbimisel, ehkki toksiinide sattumine organismi ei ole välistatud sissehingamisel ja ka nahaga kokkupuutel [24,28,29].

Tänapäeval on tuvastatud 300-400 erinevat mükotoksiini, mis erinevad oma struktuurilt ning toksilisuselt. Enamiku toksiinide mõju organismile on kas olematu või minimaalne, mistõttu ei pöörata neile erilist tähelepanu. Põhjalikumalt on uuritud kantserogeenset või immunosupressiivset mõju omavaid toksiine [28,29].

1.2 *Stachybotrys chartarum* toksiinid

S. chartarum on võimeline tootma mitmeid erinevaid mükotoksiine, mis põhjustavad varieeruvaid sümptomeid [23,30]. Hoonetest on eraldatud viis erinevat *S. chartarum* poolt toodetavat toksiini, milleks on: roridiin E; satratoksiin H; sporidesmin G; trihhoveriinid ja verrukariin [16]. Satratoksiin, roridiin E ja verrukariin kuuluvad trihhotetseenide hulka [31].

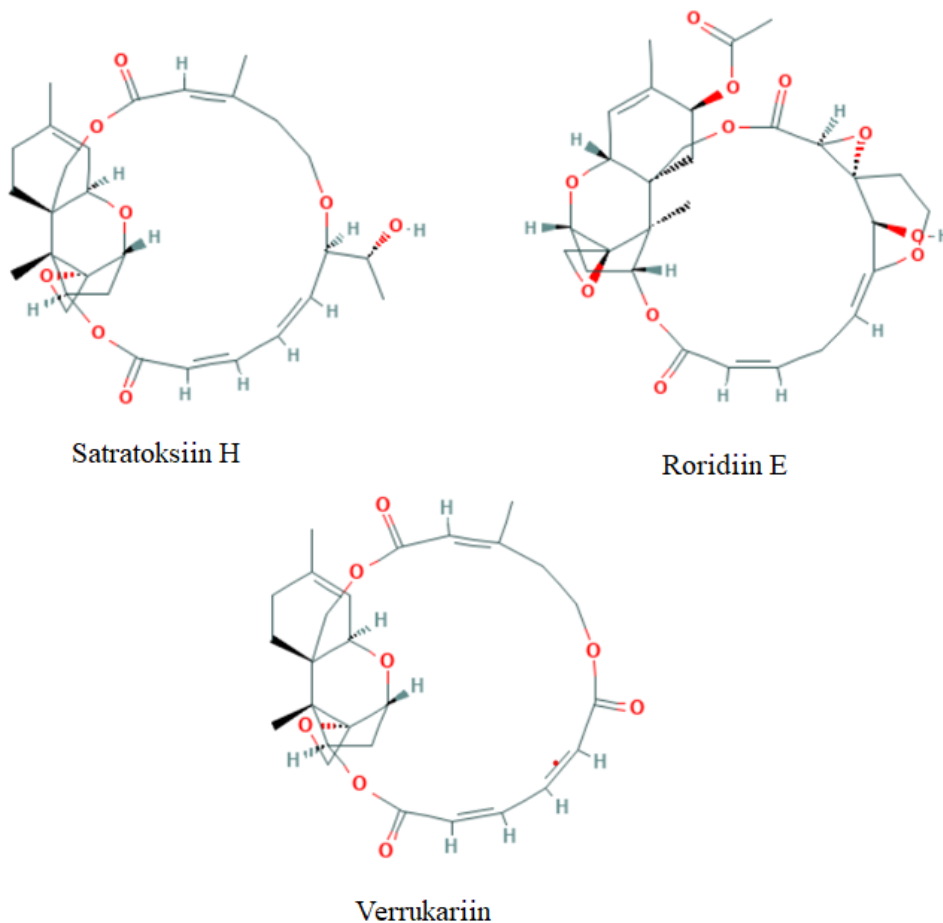
Mükotoksiinid on sekundaarsed metaboliidid, sest need ei ole otseselt seotud seente kasvamisega paljunemisega [32,33]. Mükotoksiinide mõju ulatus teistele organismidele nii inimestele kui ka loomadele sõltub nende vanusest, toitumisest, kokkupuute perioodist antud mükotoksiiniga ning erinevatest kemikaalidest millega antud organism kokku puutub [33].

Lisaks võivad mükotoksiinid inhibeerida teiste hallitusseente liikide kasvu, tagades endale seeläbi paremad võimalused kasvamiseks ja paljunemiseks [34].

1.2.1 Trihhotetseenid

Trihhotetseenid on mükotoksiinid hõlmates üle 150 analoogse toksiini [35]. Analoogia tuleneb nende molekulides paiknevast tri-tsüklilisest 12,13-epoksütrihotek-9-een põhistruktuurist. Struktuuriliselt võivad trihhotetseenid esineda nii lihtsate kui ka makrotsükliiliste molekulidena [36]. Lisaks mustale hallitusele võivad trihhotetseene sünteesida ka perekondade *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Trichodecium*, *Cephalosporium* ja *Verticimonosporium* esindajad [37]. Trihhotetseene on tuvastatud nii spooridel kui ka hallituse teistel osadel [26].

Trihhotetseenid on võimelised teistesse organismidesse absorbeeruma läbi naha, seedesüsteemi või läbi kopsude limaskestast. Metaboliseerimine toimub tsütokroom P-450 või trihhotetseenide-spetsiifilise karboksüülesteri abil peamiselt maksas, aga on täheldatud ka neerude, põrna ning soolestiku võimet trihhotetseene metaboliseerida [37]. Makrotsükliiliste trihhotetseenide hulka kuuluvate satratoksiin H, roridiin E ja verrukariini keemiline struktuur on toodud joonisel 7.



Joonis 7. Satratoksiin H [38], Rodriin E [39] ja Verrukariin [40] keemiline struktuur.

Trihhotetseenide peamine toimemehhanism seisneb proteiini sünteesi inhibeerimises, mille tõttu esinevad varieeruvad sekundaarsed mõjud, sealhulgas RNA ja DNA sünteesi inhibitsioon [41].

1.2.2 Stahhüraas A

Lisaks mükotoksiinidele, mis tekivad musta hallituse elutegevuse käigus, on leitud ka kümotrüpsiini sarnane proteolüütiline ensüüm stahhüraas A [42]. Antud proteaas on võimeline lõhkuma mitmeid bioloogiliselt aktiivseid valke, ja kollageeni [42,43]. Samuti on leitud, et stahhüraas A suudab lagundada ka mitmeid erinevaid kollageeni vorme, soodustades sellega hallituse kasvu kopsudes [42].

1.2.3 Mükotoksiinide poolt põhjustatud haigusnähud

Mükotoksikoosi sümptomid võivad olla nii neuroloogilised kui ka seotud hingamissüsteemiga [44].

Neuroloogilisteks sümptomiteks peetakse uimasust, keskendumisvõime kadu, mäluprobleeme, magamisraskusi, tasakaaluprobleeme ja hallutsinatsioone [44]. Hingamissüsteemi sümptomiteks on ninakinnisus, ärritus ja põletustunne ninas, köha, vilistav hingamine ja pigistustunne rinnus [45]. Lisaks neuroloogilistele ja hingamissüsteemi sümptomitele võib mükotoksikoos põhjustada ka lööbeid ja põletikku nahal ning oksendamist [46].

Trihhotetseenide oraalsel manustamisel või kokkupuutel nahaga võib esineda kiiresti esinev naha või soolestiku limaskesta ärritus, sügelus ja põletustunne, paistetus või villid ning veritsemine [37]. Trihhotetseenide kokkupuutel silma limaskestaga võib järgneda valu või põletustunne silmas, konjunktiviit ning halvenenud nägemisvõime kuni üheks nädalaks [37]. Teised levinud sümptomid trihhotetseenide mürgituse korral on iiveldus, oksendamine, väsimus või šokk [37].

1.3 Meetodid hallitusseente tuvastamiseks

Mükotoksiinide poolt põhjustatud haiguste vältimiseks on vajalik hallitusseente varajane tuvastamine. Meetodid hallitusseente tuvastamiseks peaksid olema lihtsasti kasutatavad, kiired ja tundlikud. Meetodid hallitusseente tuvastamiseks võib jagada kaheks – mikroorganismide tuvastamine ja hallituse elutegevuse käigus tekkivate orgaaniliste ühendite tuvastamine. Enamik tänapäeval hallitusseente tuvastamiseks kasutatavaid meetodeid vajavad kallist aparatuuri, spetsiifilisi hoiustamistingimusi reagentidele ning kvalifitseeritud tööjõudu [47-49].

1.3.1 Mikroskoopia

Hallitusseente mikroskoopiliseks tuvastamiseks on vajalik uuritavat kultuuri eelnevalt kasvatada ja keemiliselt värvida, peale mida saab kasutada valgusmikroskoopi seenekultuuride morfoloogiliste tunnuste määramiseks. Hallitusseente proovide kogumiseks kasutatakse tavaliselt steriilseid vatitikke kui ka spetsiaalseid pumпасid [50]. Hallitusseene liigi tuvastamisel pööratakse tähelepanu koniidide või spooride kujule ning paiknemisele, seeneniidistiku paiknemisele ning suurusele [51].

Mikroskoopia eelisteks loetakse laialdast kasutust, odavust ja võimalust tuvastada üksikuid rakke. Puudusteks peetakse suurt ajakulu, töötajate pikaajalist väljaõpet ning ohtu sarnaste morfoloogiliste tunnustega liikide valesti identifitseerimiseks [51].

1.3.2 Hallitusseente tuvastamine geneetilise materjali alusel

PCR ehk polümeraasi ahelreaktsioon põhineb uuritava mikroorganismi tuvastamisel selle geneetilise materjali alusel [47]. Selle meetodi puhul paljundatakse uuritava organismi geneetilist materjali, mis võimaldab seda sekveneerida, geel-elektroforeesi abil visualiseerida või mingil muul meetodil tuvastada [52]. Hallitusseente identifitseerimiseks kasutatakse ribosomaalses DNA-s olevaid liigile unikaalseid regioone [51].

PCR eelisteks loetakse meetodika kiirust, kuna analüüsiks vajalik aeg on üldjuhul 3 – 4 tundi [49], kvantifitseerimisvõimet ning sensitiivsust (10 spoori /ml). Puudusteks saab pidada kalleid instrumente, vajadust väljaõppinud personali järele, keerulisi preparatiivseid protsesse ning võimalike PCR inhibiitorite olemasolu proovis [47,53].

1.3.3 Voolutsütomeetria

Voolutsütomeetria seisneb rakkude, molekulide või teiste osakeste tuvastamisel lahuses, kasutades selleks fluorestsentsi või hajutatud valgust [54]. Osakeste tuvastamine toimub voolurakus, kus fokuseeritud laserkiir tuvastab ükshaaval voolurakus liikuvaid osakesi ning selle käigus emiteeritud või hajutatud valgus registreeritakse. Fikseeritud valguse intensiivsuse abil on võimalik määrata proovi geomeetrilised (pindala, ruumala) ja füsioloogilised (rakumembraani potentsiaal) omadused [55].

Selle meetodi kasutamise eelisteks saab pidada madalat detekteerimispiiri (100 rakku/ml), kiirust ja erinevate parameetrite (pindala, ruumala, rakumembraani potentsiaal) üheaegset

registreerimist. Meetodi rakendamiseks on see-eest vaja kalleid instrumente ning kvalifitseeritud tööjõudu. Lisaks võib mõõtprotsessi ajal tekkida ummistusi, mis takistavad üksikute rakkude sattumist mõõtealasse [56].

Kokkuvõtlik ülevaade hallitussente tuvastamiseks kasutatavatest meetoditest on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Enamlevinud meetodid hallitussente tuvastamiseks

Meetod	Eelised	Puudused	Detekteerimis-piir	Viide
Mikroskoopia	Odav, laialdaselt kasutatav	Aeganõudev, kvalifitseeritud töötajad	1 rakk	[27,51]
PCR	Kiire, sensitiivne, hea kvantifitseerimisvõime	Kallid instrumendid, kvalifitseeritud töötajad, keerulised preparatiivsed protsessid, PCR inhibiitorite olemasolu võimalus	10 spoori/ml	[47,49,57]
Voolutsüto-meetria	Kiirus, üksikute osakeste tuvastamine, geomeetriliste ja füsioloogiliste omaduste samaaegne mõõtmine	Ummistused, kallid instrumendid	10 ² rakku/ml	[58]

1.3.4 ELISA

ELISA ehk ensüüm-immunosorptsioon analüüs põhineb spetsiifilisel antikeha-antigeen reaktsioonil. Antikeha-antigeen reaktsiooni spetsiifilisus võimaldab tuvastada huvipakkuvat analüüti bioloogilistes maatriksites, kartmata proovi maatriksi segavat mõju tulemusele [59]. ELISA saab jaotada neljaks peamiseks kategooriaks: otsene, kaudne, „sandwich“ ja konkureeriv [60].

Otsese meetodi puhul kasutatakse uuritava molekuli tuvastamiseks markeriga konjugeeritud antikeha. Kaudsel meetodil tuvastatakse pinnale immobiliseeritud analüüt kasutades selleks kahte erinevat antikeha. Esmalt analüüdile kinnituva primaarse antikeha külge seotakse markeriga antikeha, mida kasutatakse signaali tuvastamiseks. „Sandwich“ meetodi puhul paikneb uuritav analüüt primaarse markeriga konjugeerimata antikeha ja sekundaarse markeriga konjugeeritud antikeha vahel. Konkureerival ELISA meetodil konkureerivad uuritavad ja referentsmolekulid proovis leiduvate markeriga konjugeeritud antikehade sidumiskohtadele [60].

ELISA eelisteks loetakse kõrget spetsiifilisust, lihtsust, kvantitatiivsust ja võimalust mõõta proove erinevates maatriksites [59]. Puudusteks peetakse antikehade tootmise maksumust, meetodi töömahukust ning signaali stabiilsust [59,61].

1.3.5 Kromatograafilised analüüsid

Lisaks hallituseente otsesele määramisel kasutatakse nende tuvastamiseks ka nende poolt toodetud toksiine. Üheks olulisemaks toksiinide määramise meetodiks on kromatograafia. Kromatograafiline meetod põhineb proovi komponentide erineval interaktsioonil kromatograafilise kolonni statsionaarse faasiga, mis võimaldab eraldada proovis olevad komponendid ning need ükshaaval tuvastada [62]. Molekulaarmass, adsorptsioon ja afiinsus on vaid mõned faktorid mis mõjutavad ühendite eristamise efektiivsust [63].

Kromatograafiliste meetodite eelisteks peetakse võimet tuvastada väga madalaid kontsentratsioone [64], efektiivsust ja täpsust, puudusteks aga süsteemi kõrget maksumust ja kompleksust ning väljaõppega personali olemasolu vajadust [65]. Kokkuvõtte hallituseente tuvastamisest nende poolt toodetavate toksiinide alusel on toodud tabelis 2.

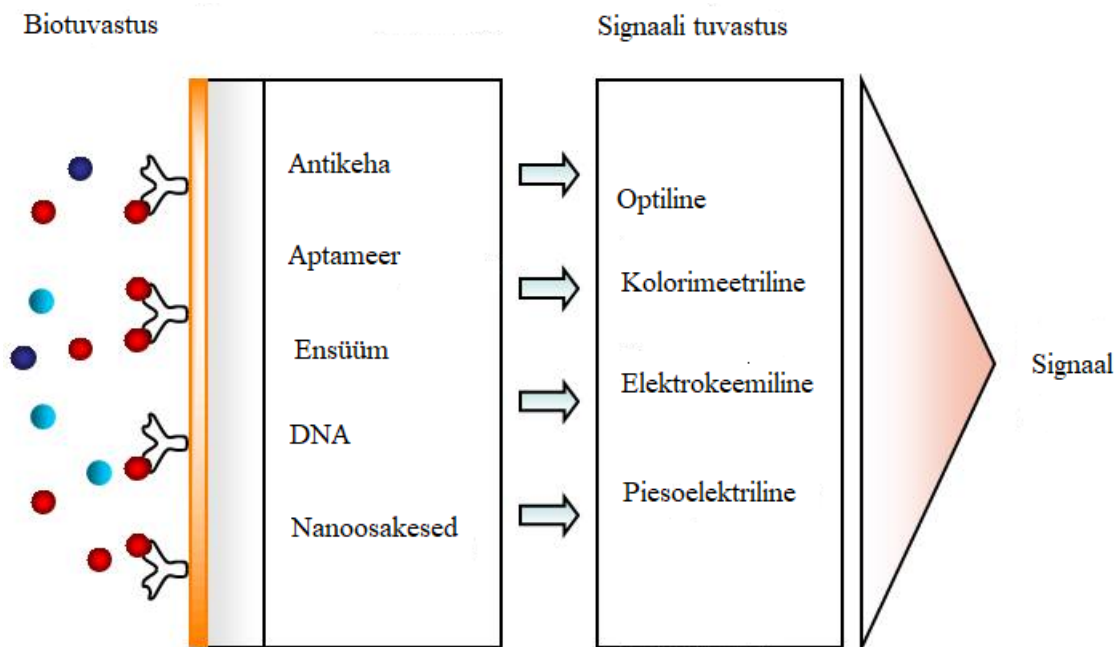
Tabel 2. Enimlevinud meetodid hallituseente tuvastamiseks nende poolt toodetud toksiinide alusel

Meetod	Eelised	Puudused	Detekteerimis-piir	Viide
ELISA	Spetsiifiline uuritava molekuli suhtes, lihtne, võimalik mõõta otse proovi maatriksist, kvantitatiivsus	Antikehade maksumus, töömahukas, signaali stabiilsus	Toksiine tuvastatud kontsentratsioonist alates 0,1 ng/ml	[48,66, 61]
Kromatograafia	Madal tuvastamispriir, järjestikused mõõtmised, varieeruvad meetodid, efektiivsus, kvantitatiivsus	Süsteemi maksumus, kompleksus, väljaõppega personal	Toksiine tuvastatud alates 0,1 ng/g	[64,67]

1.4 Biosensorid *Stachybotrys chartarum* määramiseks

Biosensorid on analüütilised seadmed, mis võimaldavad selektiivselt tuvastada ja kvantifitseerida erinevaid analüüte nende tavapärasel keskkonnas. Valdakondi, kus biosensoreid on võimalik rakendada on mitmeid, alates haiguste jälgimisest ning lõpetades keskkonnamonitooringute- ja seirete läbiviimisega [68].

Biosensor koosneb põhimõtteliselt kolmest erinevast komponendist: bioretseptorist, signaali detektorist ja signaali analüüsi süsteemist (joonis 8) [69]. Bioretseptor tunneb selektiivselt ära uuritava bioloogilise komponendi ning signaali detektor muudab selle bio-tuvastuse signaali mõõdetavaks füüsiliseks signaaliks [69]. Biosensori oluline element on ka signaali analüüs, mis võimaldab detektori signaali alusel määrata analüüdi kontsentratsiooni [69].



Joonis 8. Biosensori lihtsustatud skeem [70].

Biosensorite eelisteks võrreldes traditsiooniliste meetoditega peetakse nende kõrget selektiivsust analüüdi suhtes, kiirust, odavust, stabiilsust ja aparatuuri kompaktsust [71]. Biosensorite laialdast rakendamist raskendavad proovide ettevalmistamise protsessid ning proovi maatriksi potentsiaalne mõju mõõtmistulemustele [72].

Musta hallituse ja selle poolt toodetud metaboliitide tuvastamiseks on loodud mitmeid biosensoreid, mis varieeruvad oma avastuspiiride poolest. Loetletud süsteemidega on saavutatud väga madalaid avastamispiire erinevate metaboliitide määramisel - 0,1 ng/ml satratoksiin G määramisel ning on ka suudetud tuvastada proovidest madalaid mikroorganismide kontsentratsioone - 10^2 spoor/ml. Samuti varieeruvad meetodid analüüsi- ja elutegevuse läbiviimise poolest, alates 5 tunnist ning lõpetades 1 minutiga on võimalik tuvastada musta hallituse metaboliite. Konstrueeritud biosensorite põhilised karakteristikud on toodud tabelis 3. Loetletud biosensorsüsteemid määravad erinevaid musta hallituse elutegevuse käigus tekkivaid metaboliite.

Tabel 3. Biosensorid *Stachybotrys chartarum* määramiseks.

Metaboliidi tuvastusmeetod	Proovi keskkond	Signaali detekteerimise meetod	Avastamispiir (LOD)	Analüüsi aeg (min)	Viide
<i>S. chartarum</i> proteaasi stahhüraas A spetsiifiline substraat	H ₂ O	Kolorimeetiline	10 ² spoori/ml	1	[53]
Polükloonaalne anti-satratoksiin G antikeha	PBS	Makrotsükliiliste trihotetseenide spetsiifiline ELISA	0,1 ng/ml	>180	[73]
Indium-tina oksiidiga kaetud klaaselektrood DNA järjestuse tuvastamiseks	NaCl/naatriumtsitraat	Elektrokeemiline	2*10 ⁻⁹ mol/ml	-	[74]
Monokloonaalne anti-verrukariin A antikeha	PBS	Konkureeriv - ELISA	7,43 ng/ml	300	[75]
Monokloonaalne anti-verrukariin A antikeha	PBS	FTIR-ATR	0,002 ng/ml	30	[75]
Polükloonaalne anti-T-2 mükotoksiin antikeha	MeOH/PBS	IMB-ELISA	2,53 ng/ml	>150	[76]
Anti-satratoksiin G hemisuktsinaat-albumiin konjugaadi antikeha	H ₂ O/MeOH	CD-ELISA	0,1 ng/ml	>60	[66]

2. Eksperimentaalne osa

2.1 Kasutatud reagentid ja materjalid

- 1) Naatriumhüdroksiid (NaOH) (AppliChem, min 99%)
- 2) Naatriumkloriid (NaCl) (Sigma-Aldrich, min 99,8%)
- 3) Naatriumkarbonaat (Na₂CO₃) (AppliChem, min 99,5%)
- 4) Sephadex G50 Medium geel (Pharmacia Fine Chemicals, Ø=50-150 µm)
- 5) Vesinikkloriidhape (HCl) (Sigma Aldrich, 30-50%)
- 6) Kaaliumdivesinikfosfaat (KH₂PO₄) (AppliChem, min 99.5%)
- 7) IgY polükloonaalne kana Anti-*Stachybotrys chartarum* antikeha (Antigenes, 1 mg, ABYM2000)
- 8) Etanoolamiin (C₂H₇NO) (Sigma-Aldrich, min 99.5%)
- 9) Epiklorohüdriin (C₃H₅ClO) (Acros Organics, 99%)
- 10) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, 99%)
- 11) *Stachybotrys chartarum* puhaskultuur TFC 202504
- 12) *Stachybotrys chartarum* puhaskultuur TFC 202505
- 13) *Stachybotrys chartarum* puhaskultuur TFC 202513
- 14) Kasvuplaat MEA 2% agar
- 15) Lightning-Link® Rapid Dylight 650 Labelling Kit 200 µg (Expedeon)
- 16) Spectra/Por dialüüsi membraan, 6-8 kDa (Spectrum Laboratories)
- 17) Linnaseekstrakt LP0039 20 g/L (Thermo Fisher Scientific)
- 18) Agar Bios Special LL 20g/L (Biolife)

2.2 Kasutatud aparatuur

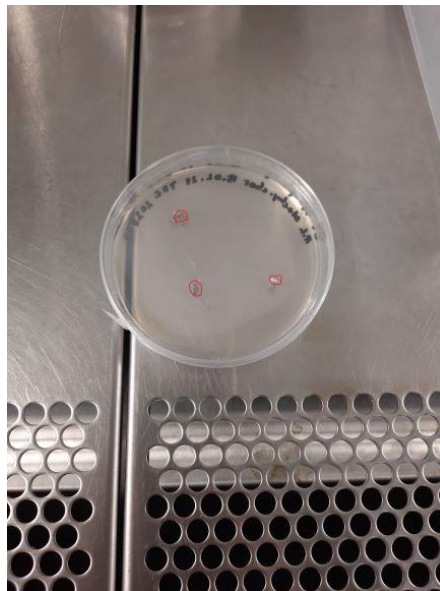
- 1) Voogsisestusanalüüsi süsteem FIALab 3500B (FIALab)
- 2) Spektrofotomeeter USB2000+ (Ocean Optics)
- 3) Valgusallikas DH-2000 UV-VIS-NIR (Ocean Optics)
- 4) Tsentrifuug Microfuge 16 (Beckman Coulter)
- 5) Analüütiline kaal XS105 Dual Range, täpsusega ±0,01mg (Mettler Toledo)
- 6) Analüütiline kaal PB602-S/FACT, täpsusega ±0,01g (Mettler Toledo)
- 7) pH-meeter, täpsusega 0,2 ühikut (Mettler Toledo)
- 8) Loksuti Orbital shaker DOS-20L (ELMI)

- 9) Soojakapp Cooled Incubator MIR-554 (Panasonic)
- 10) Laminaarkapp Biowizard (Kojair)
- 11) UV spektrofotomeeter UV-180 (Shimadzu)
- 12) Akustiline fokuseeriv tsütomeeter Attune NxT (Thermo Fisher Scientific)
- 13) Tsentrifuug Allegra X-15R (Beckman Coulter)

2.3 Kasutatud meetodikad

2.3.1 Seenekultuuride külv

Seenekultuuride külv sooritati laminaarkapis. Seenekultuuride külvamiseks kasutati MEA (malt extract agar) kasvuplaate 2% agari sisaldusega, mis olid eelnevalt valmistatud TÜ mükoloogia osakonnas. Kasvuplaatidele asetati kolm 1-3mm läbimõõduga puhta seenekultuuri tükki, initsieerimaks *S. chartarum* kasvu. Kasutatud kultuurid olid tähistatud TÜ mükoloogia osakonna seenekultuuride andmebaasis koodidega TFC 202504; TCF 202505 ning TFC 202513. Igast kultuurist valmistati kolm erinevat plaati, millele igähele pandi 3 külvipunkti (joonis 9). Puhaskultuurist tükkide lõikamiseks kasutati nõela, mida eelnevalt puhastati gaasipõletiga. Külvatud agarplaadid muudeti õhukindlaks kasutades parafiini. Kasvuplaadid paigaldati piiritusega puhastatud plastkarpi, mis asetati 45 päevaks soojakappi inkubeerima temperatuuril 23°C.

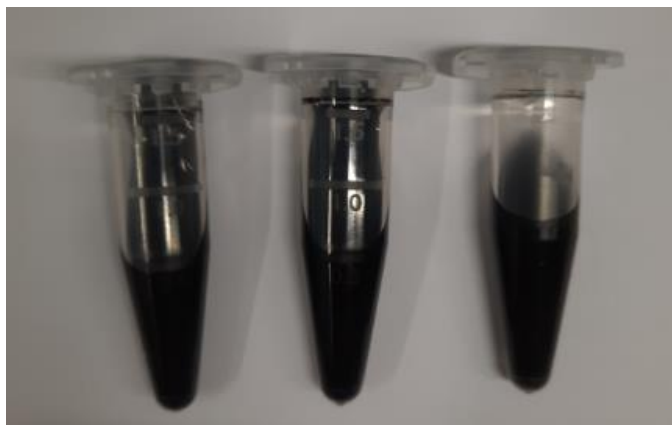


Joonis 9. Kasvuplaadile seenekultuuri külvamine.

2.3.2 Spooride kogumine

Spooride kogumine MEA 2% agarplaatidelt teostati eelnevalt välja töötatud juhendi järgi, mis kohendati antud töö tarbeks [77]. Spooride kogumiseks mõjutati neid mehhaaniliselt [10], kasutades selleks PBS puhverlahust (10mM; 0,15 M NaCl, pH 7,2).

Puhaskultuuride söödaplaate pesti 3x10 ml PBS puhvriga kogudes erinevate puhaskultuuride suspensioonid eraldi, saades 90 ml suspensiooni igast puhaskultuurist, mis jagati kahte 50 ml tsentrifuugi konteinerisse, mida tsentrifuugiti 5 min 4750 rpm (5250xG) juures eraldades tahke faasi suspensioonist. 35 ml supernatanti eemaldati konteinerist, sade ja 10 ml supernatanti jäeti konteinerisse, mida tsentrifuugiti 5 minutit 4750 rpm (5250xG) juures. Supernatant dekanteeriti ja spoorid suspendeeriti 6 ml PBS puhvriskoguti kokku 15 ml tsentrifuugi tuubidesse. Spooride eraldamiseks tsentrifuugiti spoore 5 minutit 4750 rpm (5250xG) juures, supernatant eemaldati ning spoorid suspendeeriti 1 ml PBS puhvriskoguti kokku 15 ml tsentrifuugi tuubidesse. Spooride kontsentratsioon lahuses määrati tsütomeetri abil. Spooride kogumise lõpp-produkt on toodud joonisel 10.



Joonis 10. *S. chartarum* spooride suspensioon.

2.3.3 Spooride kontsentratsiooni määramine

Spooride kontsentratsiooni määramiseks kasutati akustilist fokuseerivat tsütomeetrit Attune NxT. Kontsentratsiooni mõõtmiseks tehti algsest lahusest 100 kordne lahjendus. Enne määramist segati suspensiooni 10 sekundit kasutades selleks vortex segajat. Määramiseks võeti lahusest 150 µl, mis voolutati süsteemis kiirusega 100 µl/min, lugedes proovist 100 µl kontsentratsiooni määramiseks. Esmalt voolutatud 50 µl on vajalik süsteemi stabiliseerimiseks. Suspensioon asetati hoiustamiseks 4°C juurde. Osakeste määramise ning suuruste graafikud on toodud Lisades 1 – 2.

2.3.4 Antikehade dialüüs ning immobiliseerimine graanulitele

Antikehade immobiliseerimiseks kasutati eelnevalt välja töötatud meetodikat [78].

Esmalt kaaluti 47,3 mg Sephadex G50 Medium graanuleid 1,5 ml Eppendorfi tuubi, lisati 1 ml MilliQ vett ning jäeti graanulid punduma 24 tundi, 4 °C. Pundumise lõppedes lisati 400 µl NaOH (0,4 M), loksutati ettevaatlikult ja lisati 100 µl epiklorohürdiini (99%). Suspensioon asetati loksutile ja inkubeeriti 3 tundi, 300 rpm. Graanulite pesemiseks tsentrifugeeriti suspensiooni 5 minutit 2450xG juures, peale mida pesti kaks korda 685 µl MilliQ veega ning ühe korra 685 µl Na₂CO₃ puhvriga (0,5 M, pH 9,5). Graanulite eraldamiseks tsentrifugeeriti suspensiooni igakordselt peale lahuse lisamist (5 minutit, 2450xG).

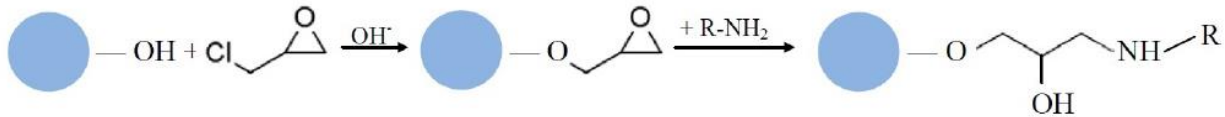
Enne antikehade immobiliseerimist viidi läbi dialüüs antikehade puhverlahuse vahetamiseks. Dialüüsi käigus asendati Tris (trisaminmetaan) puhverlahus Na₂CO₃ (0,5 M pH 9,5) puhverlahusega.

Immobiliseerimiseks mõeldud antikehad dialüüsiti kasutades Na₂CO₃ puhvrit. Dialüüsi membraanist (Spectra/Por 6-8 kD) lõigati 10 cm pikkune riba, mis asetati 40 ml Na₂CO₃ puhvrissse paisuma. 2 minuti möödumisel suleti membraani üks ots ning teisest osast sisestati 1500 µl antikeha, millest 1400 µl oli glütseroolis ning 100 µl PBS puhvriss. Membraani teine ots suleti klambriga ning dialüüsiti 3 tundi 8°C juures. Dialüüsi lõppedes kasutati spektrofotomeetrit antikehade kontsentratsiooni määramiseks 280 nm juures.

Antikehade immobiliseerimiseks pipeteeriti graanulid 10 ml klaasnõusse, lisati 3.4 ml antikeha lahust (kontsentratsiooniga 0,42 mg/ml) Na₂CO₃ puhvriss, ja inkubeeriti 24 tundi toatemperatuuril, samal ajal loksutades 200 rpm. Inkubatsiooni lõppedes tsentrifugeeriti 5 minutit, 2450xG. Supernatandist võeti 100 µl lahust ning mõõdeti spektrofotomeetrit kasutades lahusesse jäänud antikehade kontsentratsioon 280 nm juures. Suspensioonil lasti settida, antikeha lahus eemaldati ning graanulid pesti 685 µl Na₂CO₃ puhvriga. Peale pesu lisati etanoolamiini ja Na₂CO₃ lahust (85 µl/ml) ning suspensiooni inkubeeriti 2 tundi toatemperatuuril. Seejärel lasti suspensioonil settida, eemaldati etanoolamiini lahus ning graanuleid pesti kaks korda 685 µl MilliQ veega. Peale teist MilliQ pesu pipeteeriti graanulite suspensioon 1,5 ml Eppendorf tuubi ning pesti suspensiooni kuus korda 685 µl PBS puhvriga. Iga pesukorra lõppedes tsentrifugeeriti suspensiooni (5 minutit, 2450xG) graanulite eraldamiseks ja supernatandi eemaldamiseks.

Pesutsükli lõppedes lisati graanulitele 685 µl PBS puhvrit ning asetati 4°C juurde hoiustamiseks.

Antikehade kinnitumine graanulitele toimub järgmise reaktsiooniskeemi alusel (joonis 11).



Joonis 11. Antikeha immobiliseerimine [78].

2.3.5 Antikehade konjugeerimine fluorentsmarkeriga

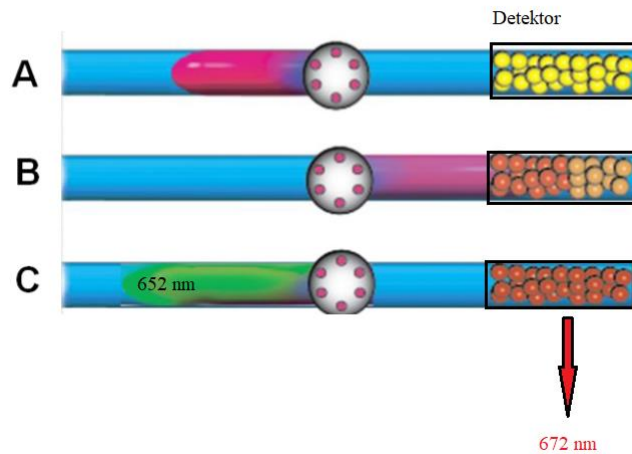
Märgistamiseks mõeldud antikehad (300 µl) dialüüsiti kasutades Spectra/Por dialüüsimembraani (6-8 kDa). Dialüüs viidi läbi 8°C juures 2 tunni jooksul PBS puhvril.

Detekteerimiseks kasutatud antikehad märgistati Lightning-Link® Rapid Dylight 650 Labeling Kit'i abil. Antikehade märgistamine viidi läbi vastavalt tootja poolt soovitatud protokollile.

200 µl antikeha lahusele PBS puhvril (1 mg/ml) lisati 20 µl Lightning-Link® Rapid Modifier lahust. Saadud lahus lisati Lightning-Link® Rapid Dylight 650 peale, mis oli piisav 200 µg antikeha märgistamiseks ning inkubeeriti toatemperatuuril 50 minutit. Inkubeerimise lõppedes lisati 20 µl Lightning-Link® Rapid Quencher lahust ja 120 µl glütserooli ning hoiustati -20°C juures.

2.3.6 Biosensoriga läbiviidavate mõõtmiste protokoll

Biosensoriga sooritavatel mõõtmistel rakendatakse BIA süsteemi põhimõtet, mille lihtsustatud skeem on toodud joonisel 12. Mikrokolonni moodustamise järgselt (A) sisestatakse süsteemi uuritav proov (B). Inkubeerimisaja lõppedes pestakse kinnitumata analüüt välja ning sisestatakse süsteemi fluorentsentsmarkeriga konjugeeritud antikeha, mida ergastatakse lainepikkusel 652 nm ning seejärel mõõdetakse signaali intensiivsus (C).



Joonis 12. Lihtsustatud BIA süsteemi ülevaade [79].

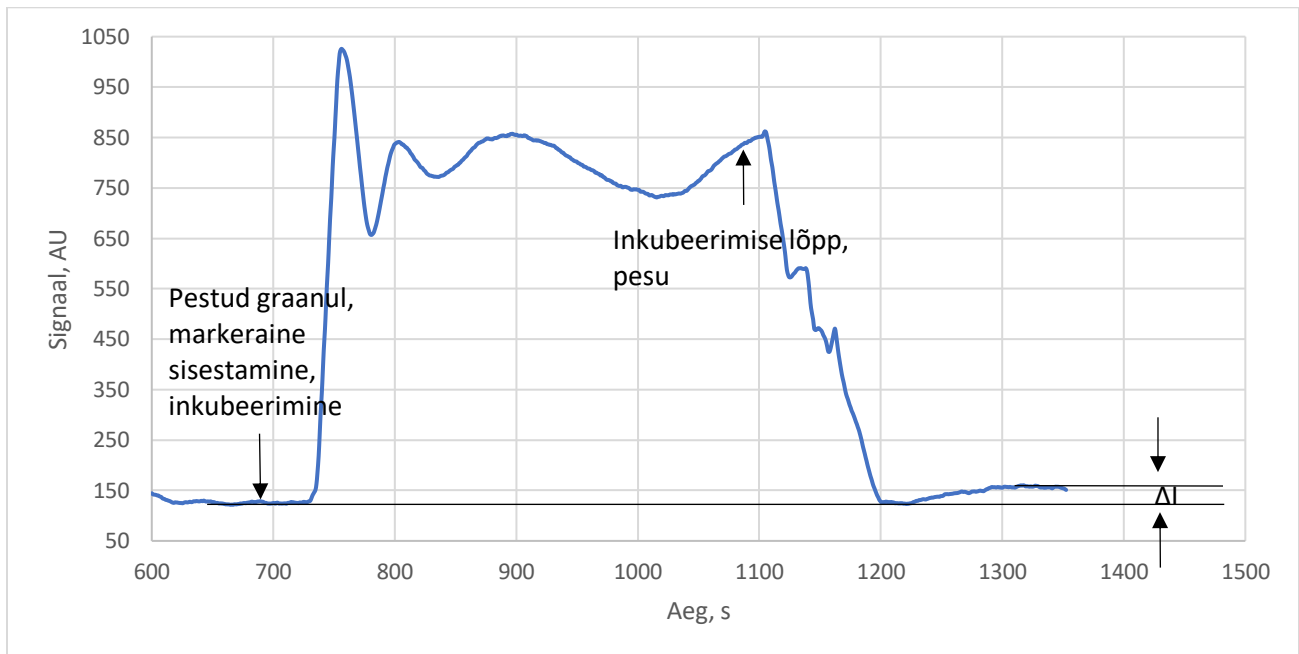
Mõõtmiseks sisestati mõõtealasse 30 μL bioaktiveeritud geeli kiirusega 2 $\mu\text{l/s}$. Enne graanulite sisestamist suleti osaliselt mõõteraku üks ots, et takistada graanulite läbipääsu mõõterakust. Järgnevalt sisestati mikrokoloni pakkimiseks 30 μl (2 $\mu\text{l/s}$) PBS puhvrit. Peale kolonni moodustumist lisati 150 μl *Stachybotrys chartarum* spooride lahust kiirusega 1 $\mu\text{l/s}$, seejärel vool peatati ning lahust inkubeeriti kolonnis (5 minutit), et tagada musta hallituse seondumine kolonnile. Inkubeerimise lõppedes pesti seondumata proov maha, kasutades selleks 150 μl PBS puhvrit kiirusega 2 $\mu\text{l/s}$. Seondunud musta hallituse detekteerimiseks sisestati 30 μl fluorestsentsmarkeriga konjugeeritud antikeha, (0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ning inkubeeriti 5 minutit. Spooridele mittekinnitunud materjal eemaldati süsteemist 150 μl (2 $\mu\text{l/s}$) PBS puhvri abil ning lasti signaalil 3 minutit stabiliseeruda.

Iga mõõtmise järel pesti mõõtekanal läbi kaks korda 1000 μl (100 $\mu\text{l/s}$) PBS puhvriga ning ühe korra 1000 μl 70% etanooli lahusega (50 $\mu\text{l/s}$). Etanooli jäägid kanalist puhastati kasutades 1000 μL PBS puhvrit (50 $\mu\text{l/s}$).

2.3.7 Biosensori signaali määramine

Fluorestsentssignaali saamiseks ergastati detekteeriva antikehaga konjugeeritud Dylight 650 markerit lainepikkusel 652 nm. Selle fluorestsentssignaali detekteeriti lainepikkusel 672 nm enne ja pärast fluorestsentsmarkeriga konjugeeritud antikeha lisamist ning biosensori signaal, mida kasutati süsteemi kalibreerimiseks, defineeriti kui nende intensiivsuste vahe. Näide biosensori väljundsignaali muutumisest mõõtmisprotsessi käigus on toodud joonisel 13.

Graanuli sisestamisel mõõterakku tekib signaali muutus, mis on põhjustatud graanulite pinnalt valguse peegeldumisest. Graanulite pakkimise tagajärjel baasjoon ühtlustub, sest graanulite liikumine on minimaalne. Proovi sisestamisel tekib samuti muutus signaali baasjoones, see on põhjustatud esmalt hüdraulilisest šokist, mis tekib vedeliku voolutamisel, aga ka proovis paiknevatest osakestest, mis mõjutavad valguse peegeldumist kanalis.



Joonis 13. Biosensori signaali muutumine mõõtmisprotsessi käigus.

Proovi inkubeerimisel 5 minuti jooksul moodustub antikeha – antigeen kompleks, peale mida pestakse seondumata materjal kolonnist välja. Markeraine inkubeerimine toimus 5 minuti jooksul, peale mida pesti seondumata markeraine mõõterakust välja. Markeraine väljapesu elimineerib olukorra, kus spooridele seondumata markeraine emiteerib signaali. Markeraine väljapesu lõppedes lastakse signaalil 3 minutit stabiliseeruda ning arvutatakse biosensori signaal kui väljundintensiivsuste vahe ΔI .

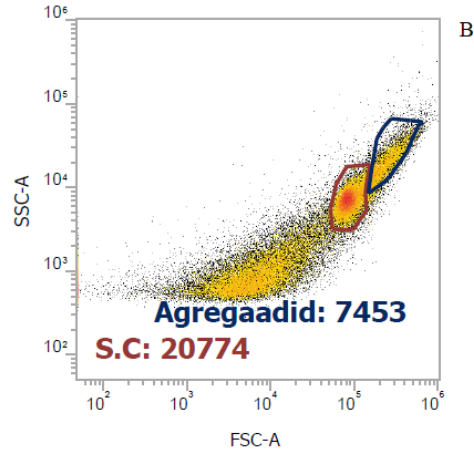
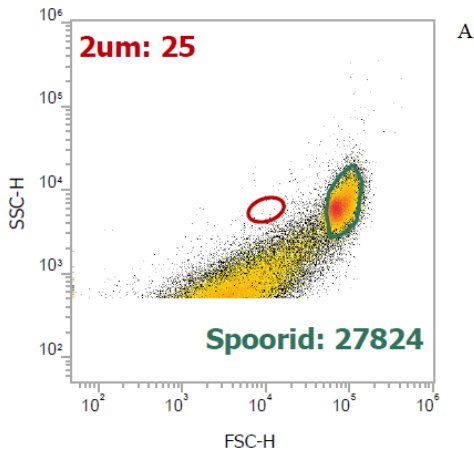
3. Tulemused ja arutelu

3.1 Musthallituse spooride kontsentratsioon kultuuris

Kasutades akustilist fokuseerivat tsütomeetrit Attune NxT saadi spooride kogumise käigus puhaskultuuride TFC202513 ning TFC202505 kontsentratsiooniks 10^7 spoori/ml ning 10^6 spoori/ml puhaskultuuri TFC202504 puhul. Lisaks spooridele võivad antigeenid esineda ka seeneniidistiku osadel [80], seetõttu võeti töös sooritatud katsete jaoks kasutusele puhaskultuur TFC202513. Antud puhaskultuuris oli summaarne osakeste kontsentratsioon suurim, mis suurendas antikeha – antigeen reaktsiooni tekkimise tõenäosust.

Joonisel 14 on näitena toodud katseteks kasutatava puhaskultuuri TFC202513 spooride kontsentratsiooni määramise tulemused. Spooride kontsentratsiooni määramise tulemused kultuurides TFC202504 ja TFC202505 on toodud vastavalt Lisas 1 ja Lisas 2.

Referentsväärtusteks mõõdeti eelnevalt $2\ \mu\text{m}$ läbimõõduga osakesi sisaldavat lahust, mille tulemus on kujutletud graafikul A punase rõngaga. Proovi mõõtmisel registreeriti samaaegselt nii osakeste jaotumine signaali intensiivsuse kui ka pindala alusel. Signaali intensiivsus sõltub uuritava osakese kujust. Joonisel 14A on toodud laserkiire otse- ja külghajuvuse omavaheline sõltuvus proovis, kus x telg FSC-H iseloomustab laserkiire intensiivsuse otsehajuvust ning y telg SSC-H külghajuvust. Osakeste jaotumine pindala järgi on toodud joonisel 14 B. Graafiku teljed FSC-A ja SSC-A iseloomustavad osakeste pindalalist jaotumist otse ning külghajumise järgi.



Parameters: **FSC-A vs SSC-A**

Gate: **All Events**

Experiment: **R.Laidma S.chartarum**

Sample: **S.chartarum 513 100x**

Time Recorded: **11:44:10**

Name	Gate	Count	%Total	%Gated	X Mean	X Median
▢ All Events	All Events	63,014	100.000	100.000	N/A	N/A
▢ 2um	2um	25	0.040	0.040	11,234	11,256
▢ Sporid	Sporid	27,824	44.155	44.155	80,322	76,138
▢ S.C	S.C	20,774	32.967	32.967	91,089	86,811
▢ Agregaadid	Agregaadid	7,453	11.828	11.828	261,237	238,643

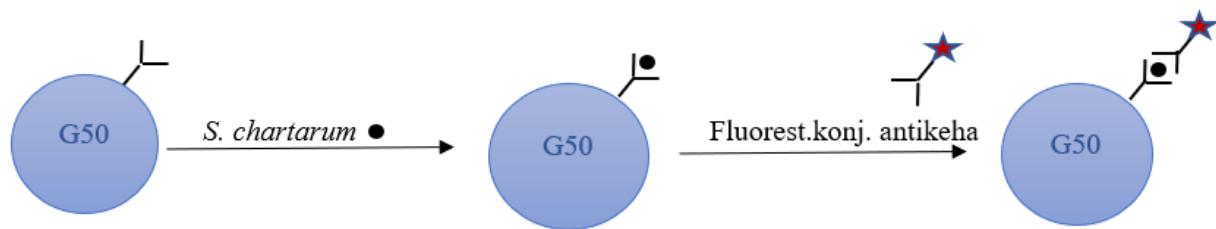
Joonis 14. Puhaskultuuri TFC202513 osakeste määramine.

Intensiivsuse graafikult (graafik A) selgub, et proovis olevad osakesed on jaotunud kahte suuremasse rühma. Roheliselt ümbritsetud tulemus võeti spooride kontsentratsiooni määramise aluseks, sest mõõdetud osakeste signaali intensiivsus oli kõrgem kui referentsväärusena mõõdetud 2 μ m läbimõõduga osakeste signaal². Osakesed mis jäid ümbritsetud alast välja ei loetud spooride kontsentratsiooni hulka, sest neid iseloomustav signaal on madalama intensiivsusega kui roheline joonega ümbritsetud ala. Sellest tulenevalt võib tegemist olla proovi kogumisel tekkinud seeneniidistiku tükkidega.

Pindala järgi (graafik B) signaali registreerimisest selgus, et roheline joonega ümbritsetud tulemus jagunes kaheks, sest sellel alal esines kaks erinevat kõrge intensiivsusega punkti. Graafikul B punase joonega tähistatud ala tulemus võeti üksikute spooride arvuks pindala signaali alusel. Sinise joonega tähistatud tulemusest järeldati, et kuna antud ala signaal on kõrgem üksikute spooride signaaliks võetud alast, siis võib tegemist olla lahuses agregeerunud spooridega.

3.2 Biosensorsüsteemi disain ja konstrueerimine *Stachybotrys chartarum* määramiseks

Antud töös loodud biosensorsüsteemis musta hallituse (*Stachybotrys chartarum*) määramiseks kasutati immunobioäratundmissüsteemi, kus musta hallituse tuvastamiseks kasutati fluorestsentsmarkeriga konjugeeritud anti-*Stachybotrys chartarum* antikeha. Konstrueeritavas biosensoris kasutatakse proovide voolutamiseks BIA süsteemi, kus mikrokoloni moodustamiseks kasutatavatele dekstraanist graanulitele immobiliseeriti IgY anti-*Stachybotrys chartarum* antikeha. Sisestades analüüdi mõõterakku tekib spetsiifiline antikeha – antigeen reaktsioon, mille käigus kinnitub uuritav analüüt proovist graanulitel oleva spetsiifilise antikeha külge. Seondunud analüüdi tuvastamiseks kasutatakse sama anti-*Stachybotrys chartarum* antikeha, mis on konjugeeritud fluorestsentsmarkeriga. Sooritades mõõtmisi erinevate *Stachybotrys chartarum* spooride kontsentratsioonidega on võimalik koostada kalibreerimisgraafik signaali intensiivsuste muudu alusel, võimaldades seeläbi määrata tundmatu kontsentratsiooniga proove. Biosensorsüsteemi disain on toodud joonisel 15.



Joonis 15. Biosensorsüsteemi disain.

3.3 Mõõteprotokolli optimeerimine

Sobivate mõõtingimuste, mille korral mõõdetav signaal oleks võimalikult suur, leidmiseks viidi esmalt läbi mõõteprotokolli optimeerimine.

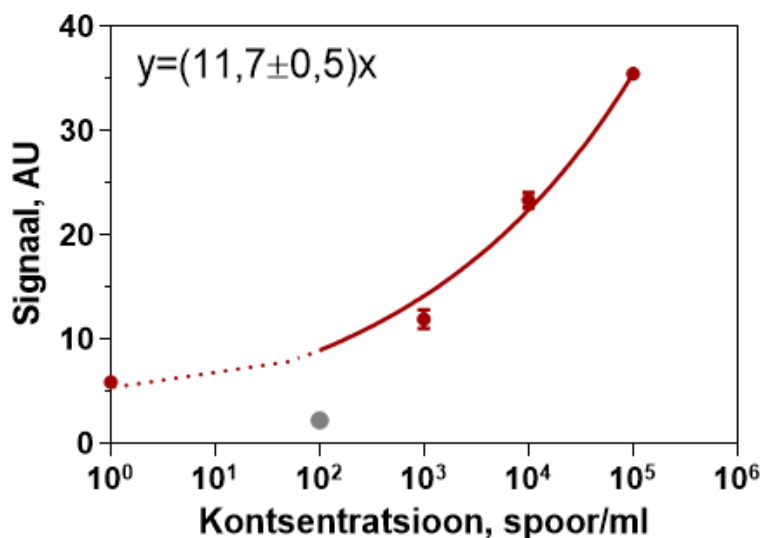
Esmalt kontrolliti signaali sõltuvust fluorestsentsmarkeriga konjugeeritud antikeha kontsentratsioonist, sooritades mõõtmised kahel erineval kontsentratsioonil – 0,02 µg/ml ja 0,05 µg/ml. Mõõtmistulemustest selgus, et kontsentratsioonil 0,02 µg/ml tekkinud 1000 ühikuline muutus signaalis on piisav mõõtmiste sooritamiseks.

Järgnevalt optimeeriti proovis sisalduva analüüdi sidumist kolonnile, inkubeerides proove 5, 15, 30 ja 60 minutit. Signaali intensiivsus ei muutunud, kui analüüti inkubeeriti 5 või 15 minutit, inkubeerides proovi 30 minutit oli signaali intensiivsus 3,6 ühikut kõrgem, võrreldes lühemate

inkubatsiooniaegadega. Inkubeerides proovi 60 minutit oli signaal algsest 5 minutilisest inkubeerimisajast 7,3 ühikut kõrgem. Nende tulemuste põhjal võeti edaspidi sooritavateks katseteks inkubatsiooniajaks 5 minutit, mis tagas musthallituse detekteerimiseks piisava signaali muutuse.

3.4 *Stachybotrys chartarum* kontsentratsiooni määramine

Disainitud biosensorsüsteemi kalibreerimiseks mõõdeti biosensori väljundsignaali *S. chartarum* kontsentratsioonidel 10^2 – 10^5 spoori/ml. Biosensori kalibreerimisgraafik koostati poollogaritmilises teljestikus (joonis 16). Madalamatel kontsentratsioonidel ei olnud mõõtmist võimalik teostada, sest kontsentratsioonil 10^2 spoori/ml saadud signaali väärtus ei erinenud süsteemi taustsignaalist. Mõõtes kõrgemaid kontsentratsioone tekkis olukord, kus kinnitumata analüüdi täielik eemaldamine ning tegelikult mikrokolonnile seondunud analüüdi osakaalu määramine ei olnud võimalik.



Joonis 16. Biosensori signaali sõltuvus *Stachybotrys chartarum* kontsentratsioonist.

Jooniselt 16 selgub, et *Stachybotrys chartarum* kontsentratsiooni ning signaali sõltuvus poollogaritmilises teljestikus on kontsentratsioonivahemikus 10^3 – 10^5 spoori/ml lineaarne. Biosensorsüsteemi tundlikkust iseloomustavaks kalibreerimisgraafiku tõusuks saadi $11,7 \pm 0,5$ AU, süsteemi taustsignaaliks saadi $5,9 \pm 3$ AU. Musta hallituse avastamispiir on kõrge, 10^3 spoori/ml ning samuti ka kvantifitseerimispiir – 10^4 spoori/ml. Süsteemi avastamispiiri

arvutamiseks liideti taustsignaalile kolmekordne tõusu standardhälbe väärtus. Süsteemi kvantifitseerimispiiriks liideti taustsignaalile kümnekordne tõusu standardhälbe väärtus. Nende tulemuste põhjal võib eeldada, et konstrueeritud biosensorsüsteemi, mis põhineb antikeha-antigeen interaktsioonidel on võimeline määrama musta hallitust, küll aga väga kõrgetes väärtusvahemikes.

Võrreldes kirjanduses toodud biosensorsüsteemidega, on antud töös konstrueeritud biosensori avastamispiir kõrgem ning analüüsi aeg pikem. Samas on vähe biosensoreid mis võimaldavad määrata musta hallitust terviklikuna, sest enamik süsteeme on loodud määrama musta hallituse poolt toodetud metaboliite.

Konstrueeritud biosensori määramispiir 10^3 spoori/ml tähendab seda, et kasutatud proovi ruumala 150 μ l korral on analüüsitavas proovis keskmiselt 150 spoori. Võrreldes seda spooride arvu õhus kehtestatud piirmääraga 413 spoori/m³ [23] on see ligikaudu 3 korda väiksem, mis tähendab et *S. chartarum* biosensoriga oleks mõõtmiseks vaja minimaalselt ligikaudu 300 liitrit uuritavat õhku, juhul kui musthallituse spooride kogumise efektiivsus õhuproovidest on 100%. Kui piirmäära väärtus on erinev, siis muutub vastavalt ka vajamineva õhuproovi suurus.

Uuritava biosensorsüsteemi korral on kõige lihtsam võimalus määramispiiri alandamiseks suurendada analüüsitavate proovide ruumala, mis tagab suurema hulga analüüdi seondumise kolonnile. Biosensori määramispiiri on võimalik alandada ka optimeerides mõõteprotokollis kinnitumata proovi ja fluorestsentsmarkeri väljapesu kogust ning kiirust, samuti sisestatava fluorestsentsmarkeri kogust. Süsteemi võimaldab muuta tundlikumaks lisaks inkubatsiooniaegades suurendamine proovi ja mikrokoloni ning proovi ja markeraine vahel tekkiva kompleksi moodustamiseks.

Musta hallituse määramiseks õhuproovidest on antud biosensorsüsteemi võimalik täiendada seadmega, mis võimaldab koguda õhust musta hallituse spore ning seeneniidistiku fragmente. Lisaks spooride kogumisele on tähtis tuvastada ka seeneniidistiku fragmendid, mis samuti võivad endas sisaldada tervisele kahjulikke mükotoksiine [27].

Kuna musta hallituse spooridele pole omane õhku sattumine [22], siis kindlasti on vajalik muuta antud meetod täpsemaks, et õhuproovides oleks võimalik mõõta ka madalamaid musta hallituse kontsentratsioone.

Kokkuvõte

Käesolevas magistritöös konstrueeriti musta hallituse (*Stachybotrys chartarum*) tuvastamiseks biosensorsüsteem, mille bioäratundmissüsteemina kasutati spetsiifilist antikeha – antigeen reaktsiooni ning proovide voolutamiseks graanulisestusanalüüsi platvormi.

Töös konstrueeritud biosensorsüsteemiga tõestati, et *Stachybotrys chartarum* terviklik määramine, kasutades selleks antikeha – antigeen reaktsiooni, on võimalik. Selle süsteemi eeliseks saab pidada selektiivsemat musta hallituse määramist, kuna mükotoksiinide põhjal baseeruvad biosensorid ei suuda eristada erinevaid hallituse liike, mis toodavad samu toksiine. Selektiivsele määramisele aitab kaasa antigeenide olemasolu nii musta hallituse koniididel, kui ka seeneniidistikul [80].

Biosensori lineaarne tööpiirkond $10^3 - 10^5$ spoori/ml tõestab, et konstrueeritud biosensorsüsteemiga on musta hallituse määramine kõrgematel kontsentratsioonidel võimalik. Süsteemi avastamispiir ning kvantifitseerimispiir on kõrge, vastavalt 10^3 spoori/ml ja 10^4 spoori/ml. Antud meetodi eeliseks lisaks selektiivsele määramisele saab pidada musthallituse suhteliselt kiiret tuvastamist proovidest, sest biosensoriga analüüsi läbiviimise aeg oli ainult 20 minutit.

Kuna varem ei ole töögrupis hallituseente määramiseks kasutatavat biosensorsüsteemi uuritud, siis esines meetodi väljatöötamisel mitmeid väljakutseid. Väga oluline oli mõõteprotokoll optimeerimine. Biosensorsüsteemi suurimad väljundsignaalid saadi siis, kui inkubatsiooniaegadeks võeti 60 minutit. Analüüside kiirendamiseks valiti inkubatsiooniaegadeks 5 minutit, mis tagas piisava signaali muutuse. Edaspidi on oluline optimeerida spooride kogumise metoodikat õhust, et oleks võimalik määrata *S. chartarum* ka õhuproovidest.

Summary

Options for biosensing black mould (*Stachybotrys chartarum*)

Black mould grows on materials with high cellulose content, such as drywall and wood, which have sustained water damage. *Stachybotrys chartarum* can pose a threat to human health by producing mycotoxins, which can cause neurological and respiratory diseases. For the most part mycotoxicosis occurs through digestion, although obtaining it through inhalation or contact with bare skin is also possible. One of the families of mycotoxins are trichothecenes, which comprises over 150 mycotoxins, with a common tricyclic 12,13-epoxytrichothec-9-ene core structure.

The methods used for mould detection can be divided into two – identification of microorganisms, such as conidia or mycelium and identification of organic compounds, that are produced during the growth of the organism, such as mycotoxins.

The aim of this Master's thesis was to develop a biosensing system for the detection of black mould (*Stachybotrys chartarum*) by using specific antibody – antigen biorecognition reaction.

It was shown that the constructed biosensor was able to detect *Stachybotrys chartarum* using the specific antibody – antigen reaction. The advantage of this system is its selectivity towards black mould, since currently available biosensors detect mycotoxins and are not able to differentiate between the species that produce the mycotoxins. The presence of antigens on the conidia as well on the mycelium help with the selectivity of the system [80].

Another advantage besides the selectivity of the system is the duration, with which it is possible to detect the presence of the mould in the sample. Needing only 20 minutes, it is possible to obtain the result from the sample. The linear range of this biosensing system is high – 10^3 - 10^5 spores/ml, as is the limit of detection and the limit of quantification, respectively 10^3 and 10^4 spores/ml.

For the detection of black mould spores in air samples, the constructed biosensor can be additionally integrated with a sample collection system. In addition, for its practical applications, it is necessary to improve the sensor performance in terms of detection limits and sensitivity.

Kasutatud kirjandus

- [1] Bitnun, A.; Frcpc, R. M. N. Environment: Health Implications. **1999**, 4 (2), 5.
- [2] Miller, J. D.; Rand, T. G.; Jarvis, B. B. *Stachybotrys Chartarum* : Cause of Human Disease or Media Darling? *Med. Mycol.* **2003**, 41 (4), 271–291.
<https://doi.org/10.1080/1369378031000137350>.
- [3] Król, E. D.; Abramczyk, B. A.; Zalewska, E. D.; Zimowska, B. FUNGI INHABITING FRUIT TREE SHOOTS WITH SPECIAL REFERENCE TO THE DIAPORTHE (PHOMOPSIS) GENUS. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* **2017**, 16 (4), 113–126.
<https://doi.org/10.24326/asphc.2017.4.12>.
- [4] Terr, A. I. Stachybotrys: Relevance to Human Disease. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* **2001**, 87 (6), 57–63. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)62343-5](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)62343-5).
- [5] Definition of deuteromycete | Dictionary.com
<https://www.dictionary.com/browse/deuteromycete> (vaadatud Märts 12, 2021).
- [6] Society, M. Fungi | What is microbiology? <https://microbiologysociety.org/why-microbiology-matters/what-is-microbiology/fungi.html> (vaadatud Veebruar 15, 2020).
- [7] Frazer, S.; Magan, N.; Aldred, D. The Influence of Water Activity and Temperature on Germination, Growth and Sporulation of *Stachybotrys Chartarum* Strains. *Mycopathologia* **2011**, 172 (1), 17–23. <https://doi.org/10.1007/s11046-011-9394-x>.
- [8] Wang, Y.; Hyde, K. D.; McKenzie, E. H. C.; Jiang, Y.-L.; Li, D.-W.; Zhao, D.-G. Overview of *Stachybotrys* (Memnoniella) and Current Species Status. *Fungal Divers.* **2015**, 71 (1), 17–83. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0319-0>.
- [9] https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/stachybotrys_508.pdf, (vaadatud Aprill 18, 2021)
- [10] *Stachybotrys chartarum* <https://www.inspq.qc.ca/en/moulds/fact-sheets/stachybotrys-chartarum> (vaadatud Aprill 18, 2021).
- [11] CDC - Mold - General Information - Basic Facts <https://www.cdc.gov/mold/faqs.htm> (vaadatud Märts 12, 2021).
- [12] *cladospor-cult.jpg* (470×321) <https://mycology.adelaide.edu.au/images/cladospor-cult.jpg> (vaadatud Aprill 23, 2021).

- [13] FIG 5. *Aspergillus niger* is one of the common species of *Aspergillus*, a...
https://www.researchgate.net/figure/Aspergillus-niger-is-one-of-the-common-species-of-Aspergillus-a-genus-characterized-by_fig1_8883164 (vaadatud Aprill 23, 2021).
- [14] *Penicillium chrysogenum*- An Overview | Mycology <https://microbenotes.com/penicillium-chrysogenum/> (vaadatud Aprill 23, 2021).
- [15] Fernández, V. M. Water Activity. In *Encyclopedia of Astrobiology*; Gargaud, M., Amils, R., Quintanilla, J. C., Cleaves, H. J. (Jim), Irvine, W. M., Pinti, D. L., Viso, M., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2011; pp 1763–1764. https://doi.org/10.1007/978-3-642-11274-4_1678.
- [16] Kuhn, D. M.; Ghannoum, M. A. Indoor Mold, Toxigenic Fungi, and *Stachybotrys Chartarum*: Infectious Disease Perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16* (1), 144–172. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.1.144-172.2003>.
- [17] Water Damaged Homes: The Primary, Secondary and Tertiary Colonizers.
<http://www.moldbacteriaconsulting.com/fungi/water-damaged-homes-primary-secondary.html> (vaadatud Märts 14, 2021).
- [18] Johanning, E.; Biagini, R.; Hull, D.; Morey, P.; Jarvis, B.; Landsbergis, P. Health and Immunology Study Following Exposure to Toxigenic Fungi (*Stachybotrys Chartarum*) in a Water-Damaged Office Environment. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1996**, *68* (4), 207–218. <https://doi.org/10.1007/BF00381430>.
- [19] Mahmoudi, M.; Gershwin, M. E. Sick Building Syndrome. III. *Stachybotrys Chartarum*. *J. Asthma* **2000**, *37* (2), 191–198. <https://doi.org/10.3109/02770900009055442>.
- [20] Joshi, S. M. The Sick Building Syndrome. *Indian J. Occup. Environ. Med.* **2008**, *12* (2), 61–64. <https://doi.org/10.4103/0019-5278.43262>.
- [21] Feature, A.; Ristaino, J.; Information, N. M. *The Toxic Indoor Mold*; 2001.
- [22] Interpretation of Results - Air and Direct V1_11.2013.Pdf.
- [23] Sunger, N.; Prasad, B.; Morgan, P.; Lennon, E.; Haas, C. A Quantitative Risk Assessment for *Stachybotrys Chartarum*-Toxic Mold. *Clin. Toxicol.* **2017**, *2*.
<https://doi.org/10.23880/ACT-16000116>.
- [24] Foarde, K. K.; Menetrez, M. Y. FACTORS RELATING TO THE RELEASE OF STACHYBOTRYNS CHARTARUM SPORES FROM CONTAMINATED SOURCES. 7.

- [25] Black Mold Spores & Mycotoxins <https://moldpedia.com/black-mold-spores> (vaadatud Aprill 24, 2021).
- [26] Elansky, S. N.; Petrunina, Y. V.; Likhachev, A. N. GROWTH OF STACHYBOTRYS CHARTARUM STRAINS ON NATURAL AND ARTIFICIAL SUBSTRATES. 9.
- [27] Brasel, T. L.; Douglas, D. R.; Wilson, S. C.; Straus, D. C. Detection of Airborne Stachybotrys Chartarum Macrocylic Trichothecene Mycotoxins on Particulates Smaller than Conidia. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71* (1), 114–122. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.114-122.2005>.
- [28] Armendáriz, C. R.; Fernández, Á. J. G.; Gironés, M. C. L. R.; de la Torre, A. H. Mycotoxins. In *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*; Wexler, P., Ed.; Academic Press: Oxford, 2014; pp 424–427. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00519-4>.
- [29] Zain, M. E. Impact of Mycotoxins on Humans and Animals. *J. Saudi Chem. Soc.* **2011**, *15* (2), 129–144. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>.
- [30] Campbell, A. W.; Thrasher, J. D.; Gray, M. R.; Vojdani, A. Mold and Mycotoxins: Effects on the Neurological and Immune Systems in Humans. In *Advances in Applied Microbiology*; Elsevier, 2004; Vol. 55, pp 375–406. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(04\)55015-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(04)55015-3).
- [31] Dalefield, R. Chapter 21 - Mycotoxins and Mushrooms. In *Veterinary Toxicology for Australia and New Zealand*; Dalefield, R., Ed.; Elsevier: Oxford, 2017; pp 373–419. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420227-6.00020-7>.
- [32] Mosunova, O.; Navarro-Muñoz, J. C.; Collemare, J. The Biosynthesis of Fungal Secondary Metabolites: From Fundamentals to Biotechnological Applications. In *Reference Module in Life Sciences*; Elsevier, 2020; p B9780128096338210000. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21072-8>.
- [33] Peraica, M.; Radić, B.; Lucić, A.; Pavlović, M. Toxic Effects of Mycotoxins in Humans. *Bull. World Health Organ.* **1999**, *77* (9), 754–766.
- [34] Oakley, B. R. *Aspergillus Nidulans*☆. In *Reference Module in Life Sciences*; Elsevier, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.06093-3>.
- [35] Proctor, R. H.; McCormick, S. P.; Kim, H.-S.; Cardoza, R. E.; Stanley, A. M.; Lindo, L.; Kelly, A.; Brown, D. W.; Lee, T.; Vaughan, M. M.; Alexander, N. J.; Busman, M.; Gutiérrez, S. Evolution of Structural Diversity of Trichothecenes, a Family of Toxins

- Produced by Plant Pathogenic and Entomopathogenic Fungi. *PLOS Pathog.* **2018**, *14* (4), e1006946. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006946>.
- [36] McCormick, S. P.; Stanley, A. M.; Stover, N. A.; Alexander, N. J. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins* **2011**, *3* (7), 802–814. <https://doi.org/10.3390/toxins3070802>.
- [37] SelfDecode | Genome Analysis <https://selfdecode.com/chemical/roridin-e/#mechanism-of-action> (vaadatud Veebruar 9, 2021).
- [38] PubChem. Satratoxin H, 8-(acetyloxy)-6',7'-didehydro-6'-de(1-hydroxyethyl)-2',3'-epoxy-2',3',7',8'-tetrahydro- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135923497> (vaadatud Märts 15, 2021).
- [39] PubChem. Roridin E <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/44593339> (vaadatud Märts 15, 2021).
- [40] PubChem. Verrucarin A <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6326658> (vaadatud Märts 15, 2021).
- [41] Cope, R. B. Chapter 75 - Trichothecenes. In *Veterinary Toxicology (Third Edition)*; Gupta, R. C., Ed.; Academic Press, 2018; pp 1043–1053. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00075-1>.
- [42] Kordula, T.; Banbula, A.; Macomson, J.; Travis, J. Isolation and Properties of Stachyrase A, a Chymotrypsin-Like Serine Proteinase from *Stachybotrys Chartarum*. *Infect. Immun.* **2002**, *70* (1), 419–421. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.1.419-421.2002>.
- [43] Devoogdt, N.; Ghassabeh, G. H.; Zhang, J.; Brys, L.; Baetselier, P. D.; Revets, H. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Promotes the Tumorigenic and Metastatic Potential of Cancer Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (10), 5778–5782. <https://doi.org/10.1073/pnas.1037154100>.
- [44] Hyvonen, S. M.; Lohi, J. J.; Rasanen, L. A.; Heinonen, T.; Mannerstrom, M.; Vaali, K.; Tuuminen, T. Association of Toxic Indoor Air with Multi-Organ Symptoms in Pupils Attending a Moisture-Damaged School in Finland. *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* **2020**, *9* (5), 101–113.
- [45] Bitnun, A.; Nosal, R. M. *Stachybotrys Chartarum* (Atra) Contamination of the Indoor Environment: Health Implications. *Paediatr. Child Health* **1999**, *4* (2), 125–129.

- [46] Bennett, J. W.; Klich, M. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16* (3), 497–516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>.
- [47] Cruz-Perez, P.; Buttner, M. P.; Stetzenbach, L. D. Specific Detection of *Stachybotrys Chartarum* in Pure Culture Using Quantitative Polymerase Chain Reaction. *Mol. Cell. Probes* **2001**, *15* (3), 129–138. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2001.0347>.
- [48] Van Emon, J. M.; Reed, A. W.; Yike, I.; Vesper, S. J. ELISA Measurement of StachylysinTM in Serum to Quantify Human Exposures to the Indoor Mold *Stachybotrys Chartarum*: *J. Occup. Environ. Med.* **2003**, *45* (6), 582–591. <https://doi.org/10.1097/01.jom.0000071503.96740.65>.
- [49] Keswani, J.; Kashon, M. L.; Chen, B. T. Evaluation of Interference to Conventional and Real-Time PCR for Detection and Quantification of Fungi in Dust. *J. Environ. Monit.* **2005**, *7* (4), 311. <https://doi.org/10.1039/b415498c>.
- [50] Foladi, S.; Hedayati, M. T.; Shokohi, T.; Mayahi, S. Study on Fungi in Archives of Offices, with a Particular Focus on *Stachybotrys Chartarum*. *J. Mycol. Médicale* **2013**, *23* (4), 242–246. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2013.09.003>.
- [51] Mohamad, Z. A. B. *Stachybotrys Chartarum*: Its Identification and Response to Antimicrobial Treatment and Prevention. 434.
- [52] Polymerase chain reaction (PCR) (article) <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr> (vaadatud Märts 16, 2021).
- [53] Suaifan, G. A. R. Y.; Zourob, M. Portable Paper-Based Colorimetric Nanoprobe for the Detection of *Stachybotrys Chartarum* Using Peptide Labeled Magnetic Nanoparticles. *Microchim. Acta* **2019**, *186* (4), 230. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3313-0>.
- [54] McKinnon, K. M. Flow Cytometry: An Overview. *Curr. Protoc. Immunol.* **2018**, *120*, 5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>.
- [55] Büscher, M. Flow Cytometry Instrumentation - An Overview. *Curr. Protoc. Cytom.* **2019**, *87* (1), e52. <https://doi.org/10.1002/cpcy.52>.
- [56] Advantages & Disadvantages <http://flowcytometry.weebly.com/advantages--disadvantages.html> (vaadatud Aprill 17, 2021).

- [57] Vanhee, L. M. E.; Nelis, H. J.; Coenye, T. Detection and Quantification of Viable Airborne Bacteria and Fungi Using Solid-Phase Cytometry. *Nat. Protoc.* **2009**, *4* (2), 224–231. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.228>.
- [58] Prigione, V.; Lingua, G.; Marchisio, V. F. Development and Use of Flow Cytometry for Detection of Airborne Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70* (3), 1360–1365. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1360-1365.2004>.
- [59] ELISA: basic principles and types of ELISA assay | Abcam <https://www.abcam.com/kits/elisa-principle> (vaadatud Aprill 17, 2021).
- [60] Bio-Rad. Types of ELISA <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html> (vaadatud Aprill 30, 2021).
- [61] https://resources.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/ABR_Eight_Limitations_of_ELISA.pdf (vaadatud 17 Aprill, 2021)
- [62] The principle and method of chromatography | MBL Life Science -JAPAN- <https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/chromatography.html> (vaadatud Mai 12, 2021).
- [63] Coskun, O. Separation Techniques: Chromatography. *North. Clin. Istanbul.* **2016**, *3* (2), 156–160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>.
- [64] Agriopoulou, S.; Stamatelopoulou, E.; Varzakas, T. Advances in Analysis and Detection of Major Mycotoxins in Foods. *Foods* **2020**, *9* (4), 518. <https://doi.org/10.3390/foods9040518>.
- [65] Pharma Information Zone: Advantages and Disadvantages of Chromatography. *Pharma information Zone*.
- [66] Chung, Y.-J.; Jarvis, B. B.; Tak, H.; Pestka, J. J. Immunochemical Assay for Satratoxin G and Other Macrocyclic Trichothecenes Associated with Indoor Air Contamination by *Stachybotrys Chartarum*. *Toxicol. Mech. Methods* **2003**, *13* (4), 247–252. <https://doi.org/10.1080/713857196>.
- [67] Kim, D.-H.; Hong, S.-Y.; Kang, J. W.; Cho, S. M.; Lee, K. R.; An, T. K.; Lee, C.; Chung, S. H. Simultaneous Determination of Multi-Mycotoxins in Cereal Grains Collected from South Korea by LC/MS/MS. *Toxins* **2017**, *9* (3), 106. <https://doi.org/10.3390/toxins9030106>.
- [68] Soleymani, L.; Li, F. Mechanistic Challenges and Advantages of Biosensor Miniaturization into the Nanoscale. *ACS Sens.* **2017**, *10*.

- [69] Dar, S. A.; Sofi, M. S.; Dar, S. A.; Nabi, M. Biosensors: Components and Applications-A Review. 7.
- [70] What Is a Biosensor? *Yıldız Uludağ*, 2009.
- [71] Table 9 : Advantages and disadvantages of biosensor systems
https://www.researchgate.net/figure/Advantages-and-disadvantages-of-biosensor-systems_tbl5_317213811 (vaadatud Märts 8, 2021).
- [72] Sin, M. L.; Mach, K. E.; Wong, P. K.; Liao, J. C. Advances and Challenges in Biosensor-Based Diagnosis of Infectious Diseases. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2014**, *14* (2), 225–244.
<https://doi.org/10.1586/14737159.2014.888313>.
- [73] Brasel, T. L.; Martin, J. M.; Carriker, C. G.; Wilson, S. C.; Straus, D. C. Detection of Airborne *Stachybotrys Chartarum* Macrocylic Trichothecene Mycotoxins in the Indoor Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71* (11), 7376–7388.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7376-7388.2005>.
- [74] Cai, H.; Shang, C.; Hsing, I.-M. Sequence-Specific Electrochemical Recognition of Multiple Species Using Nanoparticle Labels. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *523* (1), 61–68.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.06.072>.
- [75] Gosselin, E.; Denis, O.; Van Cauwenberge, A.; Conti, J.; Vanden Eynde, J. J.; Huygen, K.; De Coninck, J. Quantification of the Trichothecene Verrucaric-A in Environmental Samples Using an Antibody-Based Spectroscopic Biosensor. *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, *166–167*, 549–555. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.03.008>.
- [76] Deng, Q.; Qiu, M.; Wang, Y.; Lv, P.; Wu, C.; Sun, L.; Ye, R.; Xu, D.; Liu, Y.; Gooneratne, R. A Sensitive and Validated Immunomagnetic-Bead Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Analyzing Total T-2 (Free and Modified) Toxins in Shrimp Tissues. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2017**, *142*, 441–447.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.037>.
- [77] Karunasena, E, *Stachybotrys Chartarum* Mycotoxins and Growth Prevention, 2000
- [78] Kivirand, K, Labori eeskiri: "Immobilization of antibodies onto Sephadex gel", 2018, lubatud töögrupil kasutada.
- [79] Sequential Injection Chromatography <https://studylib.net/doc/13077937/sequential-injection-chromatography> (vaadatud Mai 13, 2021).

[80] Xu, J.; Jensen, J. T.; Liang, Y.; Belisle, D.; Miller, J. D. The Biology and Immunogenicity of a 34-KDa Antigen of *Stachybotrys Chartarum Sensu Lato*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2007**, *60* (4), 308–318. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.05.008>.

Tänavaldused

Autor soovib siiralt tänada järgmisi inimesi, kes olid abiks käesoleva magistritöö koostamisel:

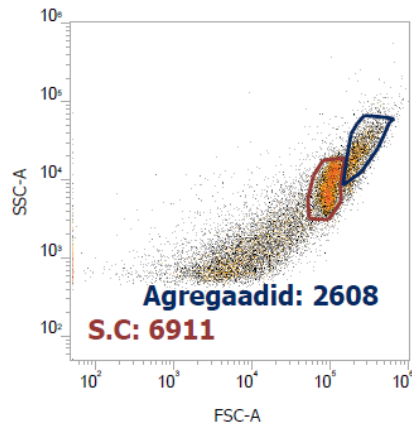
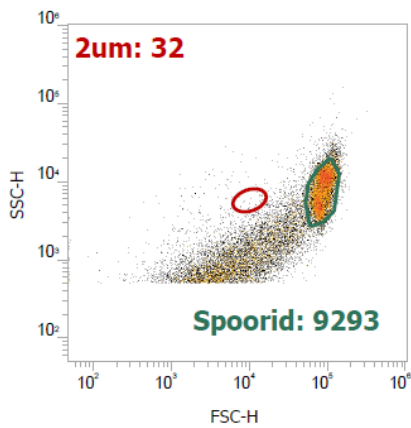
Toonika Rinke

Leho Tedersoo

Veljo Kisand

Irma Zettur

Lisa 1. Puhaskultuuri TCF202504 osakeste määramine.



Parameters: **FSC-A vs SSC-A**

Gate: **All Events**

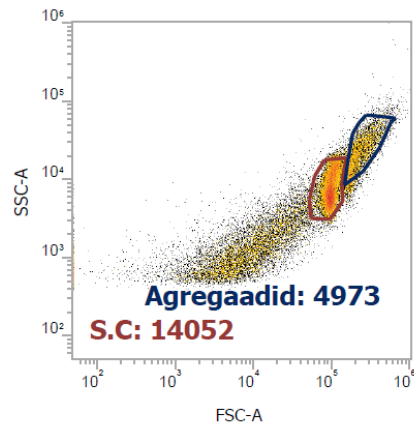
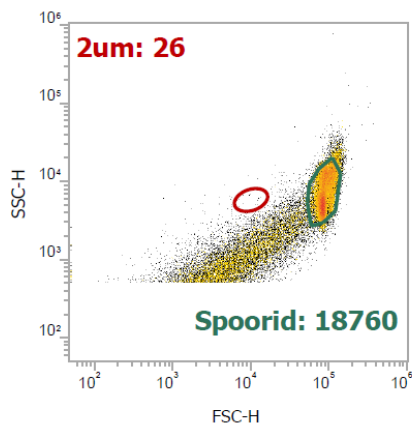
Experiment: **R.Laidma S.chartarum**

Sample: **S.chartarum 504 100x**

Time Recorded: **11:36:56**

Name	Gate	Count	%Total	%Gated	X Mean	X Median
All Events	All Events	19,213	100.000	100.000	N/A	N/A
2um	2um	32	0.167	0.167	11,687	12,067
Spoorid	Spoorid	9,293	48.368	48.368	91,714	89,438
S.C	S.C	6,911	35.970	35.970	101,205	100,113
Agregaadid	Agregaadid	2,608	13.574	13.574	255,471	233,185

Lisa 2. Puhaskultuuri TFC202505 osakeste määramine.



Parameters: **FSC-A vs SSC-A**

Gate: **All Events**

Experiment: **R.Laidma S.chartarum**

Sample: **S.chartarum 505 100x**

Time Recorded: **11:40:14**

Name	Gate	Count	%Total	%Gated	X Mean	X Median
All Events	All Events	33,586	100.000	100.000	N/A	N/A
2um	2um	26	0.077	0.077	10,797	11,410
Sporid	Sporid	18,760	55.857	55.857	90,762	87,325
S.C	S.C	14,052	41.839	41.839	99,997	99,016
Agregaadid	Agregaadid	4,973	14.807	14.807	257,549	231,609

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Rain Laidma,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Musta hallituse (*Stachybotrys chartarum*) määramise võimalused biosensoriga

mille juhendaja on Toonika Rinke ja Leho Tedersoo,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Rain Laidma

29.05.2021