

Anna Ławniczek-Wałczyk¹
Marcin Cyprowski¹
Małgorzata Gołofit-Szymczak¹
Angelina Wójcik-Fatla²
Violetta Zając²
Rafał L. Górny¹

OCENA NARAŻENIA NA AEROZOL GRZYBOWY NA WYBRANYCH STANOWISKACH PRACY ZANIECZYSZCZONYCH PYŁEM ORGANICZNYM O RÓŻNYM POCHODZENIU

ASSESSMENT OF FUNGAL AEROSOL EXPOSURE AT SELECTED WORKPLACES
CONTAMINATED WITH ORGANIC DUST OF DIFFERENT ORIGIN

¹ Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy / Central Institute for Labour Protection – National Research Institute, Warszawa, Poland
Zakład Zagrożeń Chemicznych, Pyłowych i Biologicznych, Pracownia Zagrożeń Biologicznych / Department of Chemical, Aerosol and Biological Hazards, Biohazard Laboratory

² Instytut Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki / Witold Chodźko Institute of Rural Health, Lublin, Poland
Zakład Biologicznych Szkodliwości Zdrowotnych i Parazytologii / Department of Biological Health Hazards and Parasitology

STRESZCZENIE

Wstęp: W ostatnich latach obserwowany jest wzrost liczby osób cierpiących na choroby wywołane przez grzyby pleśniowe i drożdżopodobne. Mimo to wiedza na temat bioróżnorodności patogenów grzybowych w środowisku pracy jest ciągle niedostateczna. Celem pracy była ocena narażenia na grzyby rozprzestrzeniające się drogą powietrzną w środowisku pracy zanieczyszczonym pyłem organicznym pochodzenia roślinnego i zwierzęcego. **Materiał i metody:** Próbkę bioaerozolu pobrano w 3 zakładach pracy (ferma drobiu, elektrownia spalająca biomasę i oczyszczalnia ścieków) za pomocą zestawów pomiarowych złożonych z uniwersalnych aspiratorów i poborników guzikowych. Ilościową i jakościową analizę aerozolu grzybowego przeprowadzono metodą hodowlaną, opartą na analizie makro- i mikroskopowej. Wybrane szczepy poddano analizie genetycznej za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (polymerase chain reaction – PCR) z użyciem par pramerów do wewnętrznych regionów niekodujących (internal transcribed spacers – ITS): ITS1–ITS2, ITS3–ITS4 i ITS1–ITS4. **Wyniki:** Średnie stężenie aerozolu grzybowego na stanowiskach pracy wynosiło $1,2 \times 10^2$ – $2,1 \times 10^6$ jtk/m³. Najwyższe stężenie grzybów zaobserwowano na stanowiskach pracy na fermie drobiu, a najniższe w oczyszczalni ścieków. Analiza jakościowa wykazała, że na stanowiskach pracy w elektrowni i oczyszczalni ścieków dominującym gatunkiem w stosunku do całości izolowanej mykobioty był *Aspergillus fumigatus*. Zgodność wyników identyfikacji tego patogenu uzyskanych metodą hodowlaną i molekularną dotyczyła 100% badanych szczepów. **Wnioski:** Stężenie bioaerozoli zmierzone na stanowiskach pracy w fermach drobiu przekraczało polskie propozycje wartości dopuszczalnych dla grzybów, tj. 5×10^4 jtk/m³. Wykazano wysoką zgodność identyfikacji patogenu *A. fumigatus* przy użyciu metody tradycyjnej (hodowlanej) i metody genetycznej. Ponieważ długotrwałe narażenie w środowisku pracy na konidia *A. fumigatus* może prowadzić do wystąpienia u pracowników dolegliwości zdrowotnych, konieczne jest stosowanie przez nich odpowiednich środków ochronnych. Med. Pr. 2018;69(3):269–280

Słowa kluczowe: narażenie zawodowe, bioaerozol, grzyby, metody molekularne, *Aspergillus fumigatus*, metody hodowlane

ABSTRACT

Background: In recent years, the number of people suffering from diseases caused by fungi has been increasing. However, knowledge of the biodiversity of fungal pathogens in the work environment is still insufficient. The aim of this work was to evaluate the exposure to fungi being disseminated in the air of workplaces contaminated with organic dust of plant and animal origin. **Material and Methods:** Bioaerosol samples were collected at 3 occupational settings (poultry farm, biomass burning power plant and wastewater treatment plant) using button samplers. Quantitative and qualitative analysis of fungal aerosol was conducted by employing macro- and microscopic methods. Selected strains were then studied by polymerase chain reaction (PCR) using

internal transcribed spacers (ITS): ITS1–ITS2, ITS3–ITS4 and ITS1–ITS4 primer pairs. **Results:** Average concentrations of fungal aerosol at workplaces ranged 1.2×10^2 – 2.1×10^6 cfu/m³. The highest fungal concentrations were recorded in the poultry farm, while the lowest were noted at the wastewater treatment plant. *Aspergillus fumigatus* was a predominant component of the mycobiota in the power plant and wastewater treatment plant. Almost 100% identification agreement of this pathogen between the traditional and molecular method was noted. **Conclusions:** The fungal concentrations in poultry farms exceeded the Polish proposal for the threshold limit value (5×10^4 cfu/m³). The results of the study demonstrate a high compatibility of *A. fumigatus*' identification using the traditional and molecular methods. Taking into account the fact, that a long term exposure to *A. fumigatus* conidia at workplaces may result in numerous health complaints, the use of proper protective equipment by workers must be a standard procedure. Med Pr 2018;69(3):269–280

Key words: occupational exposure, bioaerosol, fungi, molecular methods, *Aspergillus fumigatus*, culture methods

Autorka do korespondencji / Corresponding author: Anna Ławniczek-Wałczyk, Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Zagrożeń Chemicznych, Pyłowych i Biologicznych, Pracownia Zagrożeń Biologicznych, ul. Czerniakowska 16, 00-701 Warszawa, e-mail: anlaw@ciop.pl
Nadesłano: 13 czerwca 2017, zatwierdzono: 16 listopada 2017

WSTĘP

Wiedza na temat bioróżnorodności patogenów grzybowych jest ciągle bardzo ograniczona. Obecnie znanych jest jedynie ok. 100 tys. gatunków grzybów. Szacuje się, że ich liczba może być znacznie większa i wynosić ponad 1,5 mln, co czyni grzyby jedną z najsłabiej zbadanych grup organizmów na świecie [1]. W ostatnich latach rośnie zachorowalność na układowe zakażenia grzybicze. Są one najczęściej powodowane przez patogeny z rodzaju *Aspergillus*, *Candida* oraz coraz częściej przez grzyby z rodzajów *Fusarium*, *Trichosporon* i *Scedosporium* [2,3]. Chociaż uogólnione zakażenia grzybicze cechują się dużą śmiertelnością, są rozpoznawane tylko w niewielkim odsetku (do 30%). Jest to spowodowane przede wszystkim nieswoistymi objawami, podobnymi do infekcji bakteryjnych lub wirusowych [4,5].

Z danych piśmiennictwa wynika, że z ok. 200 znanych gatunków grzybów pleśniowych (strzępkowych) z rodzaju *Aspergillus* zagrożenie dla zdrowia człowieka może stanowić mniej niż 20 gatunków. Spośród nich *A. fumigatus* jest jednym z najczęściej izolowanych w środowisku pracy. Głównymi sposobami rozprzestrzeniania się tego patogenu są droga powietrzno-pyłowa i bezpośredni kontakt ze skażoną powierzchnią.

Wdychanie powietrza zanieczyszczonego przez konidia tego grzyba przez pracowników np. ferm zwierzęcych, gospodarstw rolnych i zakładów przetwarzających zboża, przedsiębiorstw przetwarzających biosurowce (w tym produkty i odpady przemysłu drzewnego, rolnego i spożywczego) może powodować m.in. alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych (AZPP), alergiczną aspergilozę oskrzelowo-płucną (allergic bronchopulmonary aspergillosis – ABPA), astmę, zespół

toksyczny wywołany pyłem organicznym (organic dust toxic syndrome – ODTS) i nieżyt nosa [6–10].

Aspergillus fumigatus może wywoływać u ludzi ostre i przewlekłe zakażenia dróg oddechowych (aspergilozy). Nieleczona aspergiloza płuc może doprowadzić do zakażenia innych układów, np. układu krwionośnego, pokarmowego, płciowego, moczowego i nerwowego, a także mięśni szkieletowych, co w skrajnych przypadkach może prowadzić do śmierci. Szczególnie podatne na zakażenia grzybowe są osoby z osłabioną odpornością (po przebytej chorobie lub zabiegu medycznym), a także cierpiące na choroby układu oddechowego, np. przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP) [10,11].

Czynniki predysponującymi gatunek *A. fumigatus* do klasyfikowania go jako powszechny patogen są następujące cechy [12,13]:

- zdolność do przeżycia i wzrostu w różnych warunkach środowiskowych,
- zdolność do rozprzestrzenienia się drogą powietrzną,
- niewielkie rozmiary konidiów (średnica aerodynamiczna: 2,14–2,16 μm), pozwalające docierać i deponować się w układzie oddechowym człowieka w rejonie gardła, tchawicy i oskrzeli,
- obfite zarodnikowanie.

Należy podkreślić, że askospory *A. fumigatus* są znacznie odporniejsze na zmienne warunki środowiskowe niż innych gatunków z rodzaju *Aspergillus*. Grubsza ściana umożliwia im wzrost nawet po ogrzaniu do temperatury 75°C [5,13]. Obficie produkowane przez *A. fumigatus* konidia charakteryzują się także wysoką hydrofobowością (większą niż u innych pleśni), która sprzyja rozprzestrzenianiu się drogą powietrzno-pyłową. Badania dowodzą również, że obecność melaniny w strzępkach tego grzyba chroni nie tylko grzybnie przed niekorzystnym działaniem czynników środo-

wiskowych, ale również jego konidia przed działaniem makrofagów i neutrofilii. Ponadto konidia *A. fumigatus* zawierają znacznie więcej ujemnie naładowanych reszt kwasu sjałowego niż konidia pozostałych gatunków z rodzaju *Aspergillus*, co wspomaga proces adhezji tego patogenu do komórek nabłonkowych dróg oddechowych człowieka [5,13,14].

Celem niniejszej pracy była ocena narażenia pracowników na grzyby pleśniowe oraz drożdżopodobne, rozprzestrzeniające się drogą powietrzną w środowisku zanieczyszczonym pyłem organicznym pochodzenia roślinnego i zwierzęcego. Szczególną uwagę zwrócono na obecność patogenu grzybowego *A. fumigatus*. W ocenie wykorzystano hodowlane i molekularne metody analityczne.

MATERIAŁ I METODY

Pomiar bioaerozolu

Badania przeprowadzono w okresie letnim w 3 zakładach pracy zanieczyszczonych pyłem organicznym o różnym źródle pochodzenia:

- elektrowni z „zielonymi” blokami na biomasę (zanieczyszczenia pochodzenia roślinnego),
- fermie drobiu (zanieczyszczenia pochodzenia zwierzęcego i roślinnego),
- oczyszczalni ścieków (zanieczyszczenia pochodzenia ludzkiego i zwierzęcego).

Charakterystykę miejsc poboru w badanych zakładach i liczbę pobranych próbek podano w tabeli 1.

W celu oceny zanieczyszczenia badanych stanowisk pracy patogenami grzybowymi, stanowiącymi potencjalne zagrożenie dla zdrowia pracowników, próbki bioaerozolu pobierano metodą filtracyjną. Do pomiarów stężenia bioaerozolu wykorzystano zestawy pomiarowe składające się z uniwersalnych aspiratorów (prod. Casella CEL, Wielka Brytania) i poborników guzikowych (Button Personal Inhalable Aerosol Sampler, prod. SKC, Inc., USA). Pomiarów na stanowiskach pracy przeprowadzono 2-krotnie, w 2 powtórzeniach.

Podczas poboru przyrządy pomiarowe były umocowane na specjalnych szelkach, zakładanych pracownikowi tak, żeby głowica z filtrem (jako powierzchnią wychwyty cząstek biologicznych) znajdowała się na wysokości strefy oddechowej człowieka. Powierzchnię wychwyty stanowiły sterylne filtry teflonowe (politetrafluoroetylenowe – PTFE) o średnicy 25 mm i średnicy porów 2 µm (SKC, Inc.).

Prędkość przepływu strugi powietrza na wejściu do zestawu pomiarowego wynosiła 4 l/min. Próbkę

Tabela 1. Punkty pomiarowe powietrza w badaniu narażenia na aerozol grzybowy na wybranych stanowiskach pracy zanieczyszczonych pyłem organicznym o różnym pochodzeniu i w tle zewnętrznym

Table 1. Sampling points in the study of fungal aerosol exposure at the selected workplaces contaminated with organic dust of different origin and in the background

Miejsce pomiaru Sampling point	Opis stanowiska pomiarowego Description of sampling point	Pobrane próbki Collected samples [n]	Narażeni pracownicy Exposed workers [n]	Czas narażenia [godz./dzień] Time of exposure [h/day]
Ferma drobiu / Poultry farm	3 stanowiska zlokalizowane w kurniku, hodowla ściółkowa, liczba ptaków w stadzie: 8000 / 3 sampling points localized at the poultry house, deep litter system, the number of birds in the flock: 8000	12	3	2-5
Elektrownia spalająca biomasę / Power plant utilizing biomass	3 stanowiska związane z rozładunkiem, rozdrabnianiem i transportem biomasy na taśmociągach / 3 sampling points associated with unloading, processing and conveyor transport of biomass	12	3	4-6
Oczyszczalnia ścieków / Sewage plant	3 stanowiska zlokalizowane wzdłuż mechanicznej i biologicznej linii oczyszczania ścieków / 3 sampling points localized along the mechanical and biological sewage treatment line	12	3	5
Tło zewnętrzne / Background	3 stanowiska zlokalizowane wokół badanych obiektów / 3 sampling points localized outside the examined objects	12	-	-

pobierano przez 240 min. Prędkość przepływu strugi powietrza wymuszonego przez pompę kalibrowano zawsze przed pomiarem i po nim cyfrowym kalibratorem przepływu DryCal DC-Lite (prod. Bios International Corporation, USA) o zakresie wskazań 2–30 l/min. Po zakończeniu pomiaru filtry przekładano do sterylnych probówek i przewożono do laboratorium. Następnie filtry pomiarowe poddawano ekstrakcji w 10 ml soli fizjologicznej z 0,05-procentowym dodatkiem Tweenu 80 (prod. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Niemcy). Tak przygotowane próbki wytrząsano przez 15 min w temperaturze pokojowej na wytrząsarce laboratoryjnej Promax (model 1020, prod. Heidolph Instruments GmbH & Co., Niemcy), a następnie mieszano w łaźni ultradźwiękowej przez 10 min (Sonic 5, prod. Polsonic, Polska).

W celu zliczenia mikroorganizmów żywych dla każdej z badanych zawiesin wykonano szereg rozcieńczeń (10^{-1} – 10^{-5}), które następnie wysiewano (w 3 powtórzeniach) po 0,1 ml badanej próbki na płytki Petriego z agarem słodowym (malt extract agar – MEA) (prod. BTL, Polska). Podłoże MEA zawierało dodatek chloramfenikolu (100 mg/l, BTL) hamującego wzrost bakterii.

Po 7-dniowej inkubacji kolonii w ciemności (CLN53, prod. Pol-Eko Aparatura, Polska) w 25°C wyznaczano stężenie żywych drobnoustrojów w jednostkach tworzących kolonie w przeliczeniu na 1 m³ powietrza. Dodatkowo techniką stacjonarną pobrano próbki powietrza na zewnątrz zakładów w odległości ok. 80 m (tzw. tło zewnętrzne) w celu oceny stopnia migracji zanieczyszczeń mikrobiologicznych do środowiska badanych obiektów. W trakcie tych pomiarów zestawy pomiarowe umieszczano na statywach na wysokości 1,5 m nad podłożem w celu pobrania bioaerozolu ze strefy oddechowej człowieka.

Analiza grzybów metodą hodowlaną

Analizę jakościową aerozolu grzybowego przeprowadzono w oparciu o klucze do oznaczania grzybów pleśniowych (strzępkowych) i drożdżopodobnych – Klicha [15], Pitta [16] oraz Samsona i wsp. [17].

Analiza makroskopowa grzybów pleśniowych (strzępkowych) obejmowała określenie cech morfologicznych kolonii na odpowiednich podłożach mikrobiologicznych (BTL): MEA, Czapska i Doxa (Czapek-Dox agar – CZ), Czapska-Doxa z dodatkiem ekstraktu drożdżowego (yeast autolysate agar – CYA), agarze glukozy-ziemniaczanym (potato dextrose agar – PDA) i agarze z ekstraktem drożdżowym i sacharozą (yeast extract sucrose – YES). Analiza mikroskopowa polega-

ła na ocenie cech grzybni w preparatach kolonii barwionych laktofenolem (prod. Merck KGaA, Niemcy). Wytypowane patogeny z gatunku *A. fumigatus* zamrażano w celu późniejszej analizy metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (polymerase chain reaction – PCR).

W przypadku grzybów drożdżopodobnych dodatkowo określano zdolność do tworzenia chlamydospor, strzępek lub psudostrzępek metodą Dalmau na agarze kukurydzianym z Tweenem (Corn Meal Agar with Polysorbate 80 – CMA, prod. Oxoid Ltd., Wielka Brytania). Do identyfikacji cech biochemicznych grzybów drożdżopodobnych wykorzystano test API 20 C AUX (prod. bioMérieux SA, Francja), określający ich zdolność do enzymatycznego rozkładu związków organicznych.

Analiza molekularna grzybów *A. fumigatus*

Po rozmrożeniu szczepy grzybowe ponownie wysiewano na podłoże MEA (BTL) i inkubowano w ciemności przez 7 dni w temperaturze 25°C (Pol-Eko Aparatura) w warunkach tlenowych. Izolację genomowego DNA przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu QIAamp DNA Mini Kit według protokołu producenta dla izolacji kwasów nukleinowych z grzybów z użyciem litykazy (prod. Qiagen, Niemcy). Do identyfikacji DNA patogenów *Aspergillus* spp. wykorzystano łańcuchową reakcję polimerazy, PCR, z użyciem primerów komplementarnych do fragmentów wewnętrznych regionów niekodujących (internal transcribed spacer – ITS), według Kumara i Shukli [18].

Dla pierwszego regionu ITS1 wykorzystano parę primerów ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') i ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'), dla drugiego regionu ITSII – parę primerów ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') i ITS4 (5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3').

Dodatkowo przeprowadzono reakcję PCR z użyciem primerów ITS1 i ITS4 komplementarnych do obu regionów – ITS1 i ITSII. Mieszanina reakcyjna o objętości 25 µl zawierała:

- 1 U polimerazy Biotools (prod. Biotools B&M Labs, Hiszpania),
- 2,5 µl 10X stężonego buforu PCR zawierającego 15 mM MgCl₂ (prod. Thermo Scientific, Litwa),
- 1,25 µl 2 mM deoksynukleotydów (dNTP) (Thermo Scientific),
- po 0,25 µl każdego z pary primerów,
- 17,75 µl wody wolnej od nukleaz (prod. Applied Biosystems, USA),
- 2 µl matrycowego DNA.

Reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerze C1000 (prod. BioRad, USA). Amplifikację przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Kumara i Shuklę [18]. Produkty amplifikacji wykrywano w 2-procentowym żelu agarozowym (agarozą Basicą LE, prod. Prona, Hiszpania). Wyniki dodatnie w postaci prążków o długości: 200 par zasad (pz) dla ITS1–ITS2, 350 pz dla ITS3–ITS4 oraz 550 pz dla ITS1–ITS4 odczytywano za pomocą systemu do dokumentacji żeli In Genius LHR Bio Imagine (prod. Syngene, Wielka Brytania) w obecności markera pUC19 DNA/MspI oraz GeneRuler 100BZ DNA Ladder (Thermo Scientific).

W celu jakościowej identyfikacji próbeki dodatkowo sekwencjonowano metodą z wykorzystaniem zestawu BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, a następnie oczyszczano zestawem BigDye Xterminator Purification Kit (Applied Biosystems). Sekwencjonowanie przeprowadzono na aparacie ABI PRISM 310 (Applied Biosystems), a uzyskane sekwencje nukleotydowe badanych mikroorganizmów analizowano i porównywano z sekwencjami opublikowanymi w bazie danych National Center for Biotechnology Information (NCBI) za pomocą programu BLAST.

Pomiar wilgotności względnej i temperatury powietrza

W celu określenia wpływu parametrów mikroklimatycznych na poziom kontaminacji badanymi drobnoustrojami równoległe z pomiarami bioaerozoli w badanych obiektach i wokół nich (powietrze zewnętrzne) rejestrowano wartości wilgotności względnej oraz temperatury powietrza przy użyciu termohi-

grometru (Omniport, prod. E+E Elektronik GmbH, Austria).

Analiza statystyczna

Uzyskane dane pomiarowe poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem pakietu Statistica wersja 7.1 (prod. StatSoft, Inc., USA). W pierwszej fazie analizy zebrane dane pomiarowe poddano ocenie normalności rozkładów za pomocą testów Kołmogorowa–Smirnowa z poprawką Lillieforsa i Shapiro–Wilka. Uzyskane dane poddano dalszej analizie statystycznej z wykorzystaniem testu Kruskala–Wallisa wraz z testem Dunna (test wielokrotnych porównań średnich rang), testu Manna–Whitneya oraz korelacji Spearmana, przyjmując za znamienne statystycznie wartości $p < 0,05$.

WYNIKI

Analiza ilościowa aerozolu grzybowego

W tabeli 2. przedstawiono wartości stężeń aerozolu grzybowego na stanowiskach pracy w badanych zakładach i w tle zewnętrznym. Stężenia aerozolu grzybowego na stanowiskach pracy mieściły się w zakresie $1,2 \times 10^2$ – $2,1 \times 10^6$ jtk/m³, natomiast wyznaczone w tle zewnętrznym nie przekraczały wartości $2,6 \times 10^2$ jtk/m³. Stwierdzono występowanie istotnych statystycznie różnic w stężeniach grzybów między badanymi obiektami. Najwyższe stężenia grzybów zaobserwowano na stanowiskach pracy w fermie drobiu, a najniższe – w oczyszczalni ścieków (test Kruskala–Wallisa: $p < 0,05$, test Dunna: $p < 0,05$).

Badania wykazały również występowanie różnic stężeń zmierzonych na stanowiskach pracy z warto-

Tabela 2. Stężenie aerozolu grzybowego w powietrzu na badanych stanowiskach pracy i w tle zewnętrznym
Table 2. Fungal concentrations at the studied workplaces and in the background

Miejsce pomiaru Sampling point	Stężenie aerozolu grzybowego [jtk/m ³] Fungal concentration [cfu/m ³]	
	Me	zakres range
Ferma drobiu / Poultry farm	$6,5 \times 10^5$ ^{abc}	$2,7 \times 10^4$ – $2,1 \times 10^6$
tło zewnętrzne / background	$1,9 \times 10^2$ ^a	$1,8 \times 10^2$ – $2,1 \times 10^2$
Elektrownia spalająca biomasę / Power plant utilizing biomass	$1,5 \times 10^4$ ^{bd}	$7,5 \times 10^2$ – $3,0 \times 10^4$
tło zewnętrzne / background	$2,1 \times 10^2$ ^d	$2,0 \times 10^2$ – $2,6 \times 10^2$
Oczyszczalnia ścieków / Sewage plant	$1,5 \times 10^3$ ^{ce}	$1,2 \times 10^2$ – $1,8 \times 10^4$
tło zewnętrzne / background	$1,2 \times 10^2$ ^e	$5,6 \times 10^1$ – $2,6 \times 10^2$

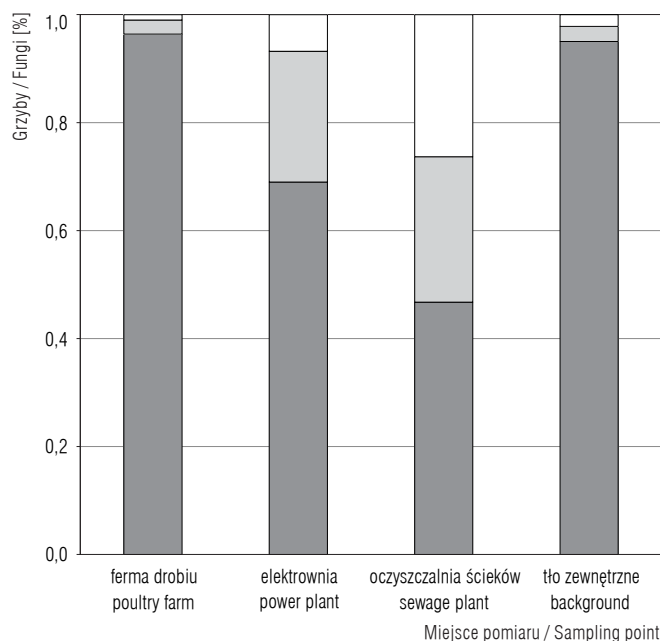
Me – mediana / median.

Istotne statystycznie różnice w poziomie stężenia: ^a $p < 0,01$, ^{b,c,d,e} $p < 0,05$ / Statistically significant differences in the concentration level: ^a $p < 0,01$, ^{b,c,d,e} $p < 0,05$.

ściami uzyskanymi w tle zewnętrznym. Stężenia grzybów strzępkowych i drożdżopodobnych w powietrzu tła zewnętrznego były znacząco niższe od wartości odnotowanych na wszystkich stanowiskach pracy (test Manna-Whitneya: $p < 0,01-0,05$). Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w stężeniach aerozolu grzybowego między poszczególnymi stanowiskami tła zewnętrznego badanych obiektów.

Analiza jakościowa aerozolu grzybowego

Udział procentowy poszczególnych grup grzybów w całości mykobioty w badanych środowiskach pracy przedstawiono na rycinie 1. i w tabeli 3. Analiza udziału



■ grzyby pleśniowe bez *Aspergillus fumigatus* / mold fungi without *Aspergillus fumigatus*
 ■ *Aspergillus fumigatus*
 □ grzyby drożdżopodobne / yeast-like fungi

Ryc. 1. Udział poszczególnych grup grzybów w całości wyizolowanej mykobioty na badanych stanowiskach pracy i w tle zewnętrznym

Fig. 1. Contribution of fungal groups in the total isolated mycobiota at the studied workplaces and in the background

procentowego zidentyfikowanych grup drobnoustrojów w powietrzu zewnętrznym oraz wewnątrz badanych obiektów wykazała istotne statystycznie różnice w składzie jakościowym bioaerozolu (test Kruskala-Wallis: $p < 0,01$). Najwyższy odsetek grzybów drożdżopodobnych w stosunku do całości analizowanej mykobioty obserwowano w oczyszczalni ścieków (26,3%), natomiast najniższe ich odsetki stwierdzono w fermie

Tabela 3. Grzyby wyizolowane z próbek powietrza na badanych stanowiskach pracy i w tle zewnętrznym
Table 3. Fungi isolated from the air samples at the studied workplaces and in the background

Miejsce pomiaru / Sampling point	Gatunek/rodzaj grzyba / Fungi species/genus	Udział w mykobiocie / Contribution in mycobiota [%]
Ferma drobiu / Poultry farm	<i>Acremonium strictum</i>	3,66
	<i>Alternaria alternata</i>	10,99
	<i>Alternaria tenuissima</i>	1,43
	<i>Alternaria spp.</i>	1,10
	<i>Aspergillus candidus</i>	1,10
	<i>Aspergillus flavus</i>	1,10
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2,57
	<i>Aspergillus melleus</i>	1,47
	<i>Aspergillus sydowii</i>	1,43
	<i>Candida dubliniensis</i>	0,18
	<i>Chrysosporium spp.</i>	11,73
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3,66
	<i>Cryptococcus albidus</i>	0,22
	<i>Fusarium verticillioides</i>	14,66
	<i>Fusarium spp.</i>	5,50
	<i>Geotrichum spp.</i>	0,37
	<i>Mucor plumbeus</i>	7,33
	<i>Mucor spp.</i>	7,33
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	1,61
	<i>Penicillium commune</i>	4,40
<i>Penicillium digitatum</i>	1,83	
<i>Penicillium rugulosum</i>	5,13	
<i>Penicillium verrucosum</i>	1,47	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0,11	
<i>Rhodotorula minuta</i>	0,11	
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	5,13	
<i>Scopulariopsis fusca</i>	4,40	
Elektrownia spalająca biomasę / Power plant utilizing biomass	<i>Absidia spp.</i>	11,87
	<i>Aspergillus flavus</i>	8,17
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	24,24
	<i>Aspergillus niger</i>	11,93
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0,94
	<i>Emericella nidulans</i>	3,65
	<i>Geotrichum candidum</i>	1,51

Tabela 3. Grzyby wyizolowane z próbek powietrza na badanych stanowiskach pracy i w tle zewnętrznym – cd.
Table 3. Fungi isolated from the air samples at the studied workplaces and in the background – cont.

Miejsce pomiaru Sampling point	Gatunek/rodzaj grzyba Fungi species/genus	Udział w mykobiocie Contribution in mycobiota [%]
Elektrownia spalająca biomasę – cd. / / Power plant utilizing biomass – cont.	<i>Mucor racemosus</i>	3,89
	<i>Penicillium citrinum</i>	3,52
	<i>Penicillium corylophilum</i>	3,58
	<i>Penicillium janthinellum</i>	4,77
	<i>Penicillium</i> spp.	3,39
	<i>Phialophora fastigiata</i>	4,02
	<i>Pichia</i> spp.	1,51
	<i>Rhizopus stolonifera</i>	1,57
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	2,83
	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	11,87
	<i>Scopulariopsis chartarum</i>	2,20
	<i>Scopulariopsis</i> spp.	6,34
	<i>Sporobolomyces roseus</i>	0,06
	Oczyszczalnia ścieków / / Sewage plant	<i>Acremonium</i> spp.
<i>Alternaria alternate</i>		0,57
<i>Aspergillus niger</i>		0,81
<i>Aspergillus</i> spp.		6,72
<i>Aspergillus fumigatus</i>		26,9
<i>Candida</i> spp.		4,84
<i>Chrysonilia sitophila</i>		4,71
<i>Cryptococcus laurentii</i>		18,83
<i>Geotrichum candidum</i>		2,69
<i>Mucor racemosus</i>		3,56
<i>Oidiodendron</i> spp.		4,03
<i>Paecilomyces</i> spp.		7,40
<i>Penicillium corylophilum</i>		8,07
<i>Penicillium funiculosum</i>		8,74
Tło zewnętrzne / / Background	<i>Alternaria</i> spp.	19,93
	<i>Acremonium</i> spp.	7,03
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2,81
	<i>Candida</i> spp.	0,59
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	11,72
	<i>Cryptococcus albidus</i>	0,12
	<i>Fusarium</i> spp.	7,03
	<i>Geotrichum</i> spp.	1,17
	<i>Mucor</i> spp.	11,72

Tabela 3. Grzyby wyizolowane z próbek powietrza na badanych stanowiskach pracy i w tle zewnętrznym – cd.
Table 3. Fungi isolated from the air samples at the studied workplaces and in the background – cont.

Miejsce pomiaru Sampling point	Gatunek/rodzaj grzyba Fungi species/genus	Udział w mykobiocie Contribution in mycobiota [%]
Tło zewnętrzne – cd. / / Background – cont.	<i>Penicillium crustosum</i>	17,58
	<i>Penicillium echinulatum</i>	5,86
	<i>Penicillium</i> spp.	2,34
	<i>Rhizopus stolonifera</i>	2,34
	<i>Rhizopus</i> spp.	7,03
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	0,35
	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	1,17
	<i>Ulocladium chartarum</i>	1,17

drobiu (1%) i w tle zewnętrznym (2,2%) (test Dunna: $p < 0,01-0,05$). Przeprowadzone analizy wykazały zanieczyszczenie wszystkich stanowisk pracy grzybem *A. fumigatus*. Jego przewagę procentową w stosunku do pozostałych mikroorganizmów stwierdzono na stanowiskach pracy w elektrowni (24,2%) i oczyszczalni ścieków (26,9%) (test Dunna: $p < 0,01-0,05$). Najniższe odsetki grzybów *A. fumigatus* w stosunku do całości analizowanej mykobioty zaobserwowano w fermie drobiu (2,6%) i w tle zewnętrznym (2,8%) (test Dunna: $p < 0,001-0,05$).

Wyniki analizy jakościowej bioty grzybowej powietrza na wyznaczonych stanowiskach pomiarowych przedstawiono w tabeli 3. Na badanych stanowiskach pracy w fermie drobiu zidentyfikowano 27 gatunków grzybów należących do 13 rodzajów, w tym 22 gatunki grzybów pleśniowych i 5 gatunków grzybów drożdżopodobnych.

Najliczniej reprezentowane były grzyby z rodzajów *Aspergillus* (5 gatunków), *Penicillium* (5 gatunków) i *Alternaria* (3 gatunki). Z próbek powietrza z elektrociepłowni wyizolowano łącznie 20 gatunków grzybów należących do 13 rodzajów, w tym 15 gatunków grzybów pleśniowych i 5 gatunków grzybów drożdżopodobnych.

Najliczniej reprezentowane były tu pleśnie z rodzajów *Penicillium* (4 gatunki), *Aspergillus* (3 gatunki) i *Scopulariopsis* (3 gatunki). Na badanych stanowiskach pracy w oczyszczalni ścieków zidentyfikowano 14 gatunków grzybów należących do 11 rodzajów, w tym 11 gatunków grzybów pleśniowych i 3 gatunki grzybów drożdżopodobnych. W badanych próbkach dominowały grzyby z rodzaju *Aspergillus* (3 gatunki).

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w składzie jakościowym aerozolu grzybowego między poszczególnymi stanowiskami tła zewnętrznego badanych obiektów. W powietrzu zewnętrznym zidentyfikowano łącznie 17 gatunków grzybów z 14 rodzajów, w tym 13 gatunków grzybów pleśniowych i 4 gatunki grzybów drożdżopodobnych. Najliczniej reprezentowane były tu grzyby z rodzaju *Penicillium* (3 gatunki).

W niniejszej pracy oceniano również przydatność techniki PCR w identyfikacji patogenu *A. fumigatus*. O wykryciu drobnoustrojów z gatunku *A. fumigatus* świadczyła obecność produktu reakcji PCR o wielkości 200 pz (dla ITS1–ITS2), 350 pz (dla ITS3–ITS4) i 550 pz (dla ITS1–ITS4). Zastosowanie w reakcji PCR badanych par primerów ITS1–ITS2, ITS3–ITS4 i ITS1–ITS4 umożliwiło wykrycie fragmentów DNA *A. fumigatus* we wszystkich analizowanych próbkach.

Wyniki niniejszej pracy wskazują na wysoką zgodność identyfikacji izolatów grzybowych przy użyciu metody hodowlanej opartej na analizie makro- i mikroskopowej oraz metody molekularnej opartej o technikę PCR. Analiza sekwencyjna produktów reakcji PCR umożliwiła identyfikację gatunkową *A. fumigatus* wszystkich szczepów na poziomie 97–99%. Dla 3 szczepów pochodzących z elektrowni 100% homologii analizowanych sekwencji potwierdzono m.in. z *A. fumigatus* szczep ATCC 1022 (American Type Culture Collection, nr akcesyjny 121481.1), *A. fumigatus* szczep ATCC 208997 (nr akcesyjny KC689332.1), *A. fumigatus* szczep ATCC 10827 (nr akcesyjny KC689312.1).

Analiza parametrów fizycznych powietrza

Wartości temperatury i wilgotności względnej powietrza zmierzone na badanych stanowiskach pracy oraz

w środowisku zewnętrznym przedstawiono w tabeli 4. Najwyższe wartości temperatury powietrza i wilgotności odnotowano na stanowiskach pomiarowych w fermie drobiu oraz oczyszczalni ścieków, jednak zależności te nie były istotne statystycznie. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie korelacji między stężeniem aerozoli grzybowych a badanymi parametrami fizycznymi powietrza.

OMÓWIENIE

Przedstawione wyniki badań potwierdzają, że narażenie zawodowe na aerozol grzybowy jest zjawiskiem powszechnym w wielu sektorach gospodarki narodowej. W badanych zakładach pracy wykazano występowanie wysokich stężeń szkodliwych dla zdrowia człowieka grzybów pleśniowych. Ich obecność była związana z dużą ilością materii organicznej pochodzenia roślinnego i zwierzęcego w tych obiektach, która (w odpowiednich warunkach wilgotnościowych i temperaturowych) jest naturalnym miejscem rozwoju dla gatunków grzybów. Uzyskane w niniejszych badaniach wartości stężenia aerozolu grzybowego były zbliżone do odnotowywanych przez innych badaczy na stanowiskach pracy związanych z hodowlą drobiu – $1,2 \times 10^3$ – $5,9 \times 10^5$ jtk/m³ [19–21], przemysłem drzewnym i przetwarzaniem biomasy – $1,6 \times 10^2$ – $8,8 \times 10^5$ jtk/m³ [22–25] oraz gospodarką wodno-ściekową – 0 – $26,7 \times 10^3$ jtk/m³ [26,27].

Należy zaznaczyć, że ocena czystości mikrobiologicznej powietrza na stanowiskach pracy jest utrudniona ze względu na brak powszechnie akceptowanych wartości dopuszczalnych stężeń. W związku z tym do oceny higienicznej badanych środowisk pracy wykorzystano propozycje wartości dopuszczalnych stężeń

Tabela 4. Temperatura i wilgotność względna powietrza na badanych stanowiskach pracy i w tle zewnętrznym
Table 4. Air temperature and relative humidity measurements at the studied workplaces and in the background

Miejsce pomiaru Sampling point	Odczyty Readings [n]	Temperatura Temperature [°C]		Wilgotność Humidity [%]	
		Me	zakres range	Me	zakres range
Ferma drobiu / Poultry farm	12	26,8	26,0–27,8	63,0	58–66
tło zewnętrzne / background	12	21,6	20,1–23,1	40,0	38–42
Elektrownia spalająca biomasę / Power plant utilizing biomass	12	23,6	14,3–24,2	59,0	40–61
tło zewnętrzne / background	12	22,0	19,5–24,3	41,0	36–44
Oczyszczalnia ścieków / Sewage plant	12	24,5	21,5–26,2	73,5	60–78
tło zewnętrzne / background	12	24,4	22,7–25,8	43,0	40–46

Me – mediana / median.

czynników biologicznych opracowane przez Zespół Ekspertów ds. Czynników Biologicznych Międzyresortowej Komisji ds. Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynników Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy (ZECB) [28].

Proponowane wartości dopuszczalnych stężeń drobnoustrojów dla pomieszczeń roboczych zanieczyszczonych pyłem organicznym wynoszą dla grzybów 5×10^4 jtk/m³. Wśród zakładów badanych w niniejszej pracy tylko na stanowiskach pracy w fermie drobiu stwierdzono przekroczenia wartości dopuszczalnych stężeń grzybów. Zanieczyszczenie grzybowe powietrza zewnętrznego wokół badanych zakładów pracy oceniono również w oparciu o dostępne w piśmiennictwie propozycje dopuszczalnych stężeń grzybów dla powietrza atmosferycznego [28]. Biorąc pod uwagę proponowane zalecenia, stężenia badanych bioaerozoli w środowisku zewnętrznym nie przekraczały wartości proponowanych dla powietrza czystego (tj. 5×10^3 jtk/m³).

W ocenie narażenia na szkodliwe patogeny grzybowe przenoszone drogą powietrzno-pyłową bardzo ważny jest wybór odpowiedniej metody analizy próbek powietrza, która pozwoli na uzyskanie wiarygodnych, powtarzalnych oraz możliwie ilościowo i jakościowo pełnych wyników. W piśmiennictwie opisano liczne metody hodowlane i genetyczne, różniące się siłą dyskryminacji, powtarzalnością, stopniem trudności, czasochłonnością, kosztami oraz sposobem interpretacji uzyskanych danych [29,30].

Należy podkreślić, że przeprowadzona w niniejszej pracy identyfikacja mikroorganizmów grzybowych metodą hodowlaną stanowi nadal „złoty standard” w diagnostyce laboratoryjnej zarówno próbek środowiskowych (wymazy, płyny, gleba, surowce, powietrze), jak i materiałów klinicznych. Metoda ta jest stosunkowo niedroga, ale bardzo czasochłonna (inkubacja próbek może trwać nawet 21 dni) i wymagająca dużego laboratoryjnego doświadczenia wykonującej ją osoby [4,12,17]. Stąd też w ostatnich latach obserwuje się m.in. intensywny rozwój metod molekularnych, które znacząco skracają czas analizy i umożliwiają rozróżnienie szczepów izolowanych z różnego rodzaju próbek [30,31]. Wybór metody do rutynowego stosowania w danym środowisku pracy nie jest więc prosty i często wymaga jednoczesnego zastosowania kilku technik diagnostycznych.

Niewątpliwie kuszącą alternatywną metodą identyfikacji mikroorganizmów grzybowych jest technika PCR z wykorzystaniem odpowiednich par starterów. Zazwyczaj analizie poddawane są rejony charakteryzujące się

wysoką konserwatywnością, np. fragmenty genów kodujących rybosomalny DNA. W skład operonu rrrn u grzybów wchodzi kolejno ułożone geny 18S rRNA, 5.8S i 28S rRNA. Między sekwencjami tych genów znajdują się wewnętrzne regiony niekodujące ITS, które występują w dużej liczbie kopii. Analiza sekwencyjna tych polimorficznych niekodujących regionów jądrowego DNA jest bardzo często wykorzystywana w badaniach filogenetycznych grzybów [18,32,33].

W niniejszej pracy do identyfikacji grzybów *A. fumigatus* izolowanych z próbek powietrza wykorzystano pary starterów ITS1–ITS2, ITS3–ITS4 i ITS1–ITS4. Przeprowadzone badania genetyczne potwierdziły wyniki otrzymane tradycyjnymi metodami fenotypowymi opartymi na analizie makro- i mikroskopowej. Uzyskane wyniki badań wskazują także, że identyfikacja grzybów przy użyciu techniki PCR i par primerów ITS1–ITS2, ITS3–ITS4 i ITS1–ITS4 jest czułym, szybkim oraz wiarygodnym sposobem identyfikacji grzybów zanieczyszczających środowisko pracy.

W niniejszej pracy ocenę zagrożenia zdrowia pracowników ze strony mikroorganizmów grzybowych obecnych w powietrzu na badanych stanowiskach pracy przeprowadzono z uwzględnieniem Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 22 kwietnia 2005 r. w sprawie szkodliwych czynników biologicznych dla zdrowia w środowisku pracy oraz ochrony zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki [34].

Stwierdzono, że wśród izolowanych mikroorganizmów występowały w większości organizmy saprotroficzne zaliczane do grupy 1. zagrożenia. W powietrzu badanych zakładów pracy zauważono obecność 1 gatunku grzyba pleśniowego (*A. fumigatus*) zakwalifikowanego do grupy 2. zagrożenia. Mikroorganizmy z tej grupy zagrożenia mogą wywoływać u ludzi choroby i być niebezpieczne dla pracowników, ale zazwyczaj istnieją skuteczne w stosunku do nich metody profilaktyki lub leczenia. We wszystkich badanych przypadkach stężenie tego grzyba nie przekroczyło wartości dopuszczalnych zalecanych dla powietrza pomieszczeń roboczych zanieczyszczonych pyłem organicznym. Należy jednak wyraźnie zaznaczyć, że osoby uczulone na alergeny grzybów pleśniowych (bez względu na stężenie tych mikroorganizmów w powietrzu) i osoby z obniżoną odpornością mogą odczuwać niekorzystne skutki zdrowotne związane z inhalacyjnym narażeniem na grzyby pleśniowe, które w skrajnych przypadkach mogą doprowadzić do rozwoju groźnych chorób [8].

W badanych środowiskach pracy dominowały również inne grzyby pleśniowe z rodzajów *Aspergillus*,

Alternaria i *Penicillium*. Są to drobnoustroje powszechnie występujące w środowisku (w glebie, na rozkładających się surowcach pochodzenia roślinnego). Analizując występowanie grzybów w pomieszczeniach zamkniętych, należy pamiętać, że ich spory mogą zachowywać zdolność przeżycia na nieczyszczonych powierzchniach roboczych nawet przez kilkadziesiąt lat [13,17]. Ekspozycja na fragmenty ścian komórkowych grzybów zawierających m.in. (1→3)-β-D-glukany i metabolity (mikotoksyny, lotne związki organiczne) grzybów może powodować podrażnienia błon śluzowych, prowadzić do rozwoju chorób alergicznych, alergicznego zapalenia pęcherzyków płucnych i wielu innych dolegliwości ze strony układu oddechowego [8,10,16,17].

W badanych próbkach powietrza wykazano również obecność grzybów drożdżopodobnych z rodzajów *Candida*, *Cryptococcus* i *Geotrichum*. Są to drobnoustroje powszechnie występujące w środowisku, które mogą także zasiedlać skórę człowieka. U osób z obniżoną odpornością mogą powodować kandydozę oraz podrażnienie i zapalenie dróg oddechowych [10].

Rozprzestrzenianie się na stanowiskach pracy szkodliwych czynników biologicznych należy ograniczać, wykorzystując różne typy środków ochronnych i profilaktycznych. Do najważniejszych z nich zalicza się m.in. systemy wentylacji mechanicznej ogólnej i miejscowej (wyposażonej w odpowiednie filtry powietrza). Środki ochrony indywidualnej powinny być stosowane jedynie wtedy, gdy nie można uniknąć zagrożenia lub – jak w badanych przypadkach – nie można ich dostatecznie ograniczyć za pomocą innych środków. Ze względu na uzyskane wyniki analiz mikrobiologicznych na badanych stanowiskach pracy zaleca się stosowanie do ochrony układu oddechowego pracowników jednorazowego sprzętu filtrującego klasy ochronnej P2 (zatrzymującego cząstki bioaerozolu, których wielkość zawiera się w przedziale $\geq 0,5 \mu\text{m}$, $< 1 \mu\text{m}$ i które zaliczane są do 1. lub 2. grupy zagrożenia) w postaci półmasek filtrujących FFP2. Charakter wykonywanych czynności sprawia, że wybrana osłona układu oddechowego powinna umożliwić równoczesne stosowanie ochrony oczu, słuchu i głowy.

WNIOSKI

Stężenia bioaerozoli zmierzone na stanowiskach pracy w fermach drobiu przekraczały proponowane przez Zespół Ekspertów ds. Czynniki Biologicznych wartości dopuszczalne dla grzybów. W przypadku pozostałych środowisk pracy nie odnotowano przekroczeń

wartości dopuszczalnych. Należy jednak podkreślić, że przeprowadzona analiza jakościowa wykazała, że na stanowiskach pracy w elektrowni i oczyszczalni ścieków dominującym gatunkiem w stosunku do całości izolowanej mykobioty był *A. fumigatus*. Ponieważ wdychanie ich zarodników może prowadzić do wystąpienia u pracowników wielu groźnych chorób, konieczne jest stosowanie przez nich odpowiednich środków ochrony indywidualnej.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują także na wysoką zgodność identyfikacji patogenów grzybowych przy użyciu metody tradycyjnej (hodowlanej) i metody genetycznej opartej o technikę PCR. W niniejszych badaniach potwierdzono przydatność par starterów ITS1–ITS2, ITS3–ITS4 i ITS1–ITS4 w identyfikacji patogenu *A. fumigatus* izolowanego z próbek powietrza. Uzyskane wyniki badań wskazują, że identyfikacja patogenów grzybowych przy użyciu techniki PCR jest czułym i wiarygodnym sposobem detekcji grzybów zanieczyszczających stanowiska pracy.

PIŚMIENNICTWO

1. Webster J., Weber R.: Introduction to fungi. Wyd. 3. Cambridge University Press, New York 2007, <https://doi.org/10.1017/CBO9780511809026>
2. Richardson M., Lass-Flörl C.: Changing epidemiology of systemic fungal infections. Clin. Microbiol. Infect. 2008; 14:5–24, <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.01978.x>
3. Enoch D.A., Yang H., Aliyu S.H., Micallef C.: The changing epidemiology of invasive fungal infections. Methods Mol. Biol. 2017;1508:17–65, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6515-1_2
4. Sulik-Tyszką B., Wróblewska M.: Przegląd metod laboratoryjnych stosowanych w diagnostyce inwazyjnych zakażeń grzybiczych. Diagn. Lab. 2015;51(2):147–152
5. Tekaią F., Latge J.-P.: *Aspergillus fumigatus*: Saprophyte or pathogen? Curr. Opin. Microbiol. 2005;8(4):385–392, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.017>
6. Croft C.A., Culibrk L., Moore M.M., Tebbutt S.J.: Interactions of *Aspergillus fumigatus* conidia with airway epithelial cells: A critical review. Front. Microbiol. 2016;7:472, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00472>
7. Dutkiewicz J., Prażmo Z.: Biologiczne czynniki zagrożenia zawodowego w przemyśle drzewnym. Zdr. Publ. 2008;118(2):138–144
8. Dutkiewicz J., Śpiewak R., Jabłoński L., Szymańska J.: Biologiczne czynniki zagrożenia zawodowego. Klasyfikacja, narażone grupy zawodowe, pomiary, profilaktyka. Instytut Medycyny Wsi, Lublin 2007

9. Hohl T.M., Feldmesser M.: *Aspergillus fumigatus*: Principles of pathogenesis and host defense. Eukaryot. Cell 2007; 6(11):1953–1963, <https://doi.org/10.1128/EC.00274-07>
10. Krzyściak P., Skóra M., Macura A.B.: Atlas grzybów chorobotwórczych człowieka. MedPharm, Wrocław 2011
11. Lowes D., Al-Shair K., Newton P.J., Morris J., Harris C., Rautemaa-Richardson R. i wsp.: Predictors of mortality in chronic pulmonary aspergillosis. Eur. Respir. J. 2017;49(2): 1601062, <https://doi.org/10.1183/13993003.01062-2016>
12. Reponen T., Willeke K., Ulevicius V., Reponen A., Grinshpun S.A.: Effect of relative humidity on the aerodynamic diameter and respiratory deposition of fungal spores. Atmos. Environ. 1996;30(23):3967–3974, [https://doi.org/10.1016/1352-2310\(96\)00128-8](https://doi.org/10.1016/1352-2310(96)00128-8)
13. Kwon-Chung K.J., Sugui J.A.: *Aspergillus fumigatus* – What makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? PLoS Pathog. 2013;9(12):e1003743, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003743>
14. Wasylńska J.A., Simmer M.I., Moore M.M.: Differences in sialic acid density in pathogenic and non-pathogenic *Aspergillus* species. Microbiologia 2001;147(4):869–877, <https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-869>
15. Klich M.A.: Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht 2002
16. Pitt J.I.: A laboratory guide to common *Penicillium* species. Food Science Australia, North Ryde 2000
17. Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C.: Introduction to food- and airborne fungi. Wyd. 7. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht 2004
18. Kumar M., Shukla P.K.: Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and single-stranded conformation polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis. J. Clin. Microbiol. 2005;43(2): 662–668, <https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.662-668.2005>
19. Gros R.V., Nichita I., Seres M., Ilie M.S., Marcu A., Cucerzan A. i wsp.: Study of the fungi dynamics in a poultry house with permanent litter. Lucrări Știin. Med. Vet. 2015; XLVIII(2):257–262
20. Sowiak M., Bródka K., Kozajda A., Buczyńska A., Szadkowska-Stańczyk I.: Fungal aerosol in the process of poultry breeding-quantitative and qualitative analysis. Med. Pr. 2012;63(1):1–10
21. Ostović M., Menčik S., Ravić I., Žužul S., Pavičić Ž., Matković K. i wsp.: Relation between microclimate and air quality in the extensively reared turkey house. Mac. Vet. Rev. 2017;40(1):83–90, <https://doi.org/10.1515/macvetrev-2017-0015>
22. Klarić M.Š., Varnai V.M., Calușić A.L., Macan J.: Occupational exposure to airborne fungi in two Croatian sawmills and atopy in exposed workers. Ann. Agric. Environ. Med. 2012;19(2):213–219
23. Madsen A.M.: Exposure to airborne microbial components in autumn and spring during work at Danish biofuel plants. Ann. Occup. Hyg. 2006;50(8):821–831, <https://doi.org/10.1093/annhyg/mel052>
24. Rohr A.C., Campleman S.L., Long C.M., Peterson M.K., Weatherstone S., Quick W. i wsp.: Potential occupational exposures and health risks associated with biomass-based power generation. Int. J. Environ. Res. Public Health 2015;12(7):8542–8605, <https://doi.org/10.3390/ijerph120708542>
25. Skóra J., Matusiak K., Wojewódzki P., Nowak A., Sulyok M., Ligocka A. i wsp.: Evaluation of microbiological and chemical contaminants in poultry farms. Int. J. Environ. Res. Public Health 2016;13(2):192, <https://doi.org/10.3390/ijerph13020192>
26. Cyprowski M., Szarapińska-Kwaszewska J., Dudkiewicz B., Krajewski J.A., Szadkowska-Stańczyk I.: Ocena narażenia pracowników oczyszczalni ścieków na czynniki szkodliwe występujące w miejscu pracy. Med. Pr. 2005;56(3):213–222
27. Prazmo Z., Krysińska-Traczyk E., Skórska C., Sitkowska J., Cholewa G., Dutkiewicz J.: Exposure to bioaerosols in a municipal sewage treatment plant. Ann. Agric. Environ. Med. 2005;10(2):241–428
28. Augustyńska D., Pośniak M.: Międzyresortowa Komisja ds. Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynników Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy – Czynniki szkodliwe w środowisku pracy – Wartości dopuszczalne. Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa 2014
29. Rastogi G., Sani R.K.: Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. W: Ahmad I., Ahmad F., Pichtel J. [red.]. Microbes and Microbial Technology: Agricultural and environmental applications. Springer, New York 2011, ss. 29–57
30. Wolska K., Szweda P.: Genotyping techniques for determining the diversity of microorganisms. W: Caliskan M. [red.]. Genetic diversity in microorganisms. In-Tech, Rijeka 2012, ss. 53–94, <https://doi.org/10.5772/2641>
31. Wang H., Zhang L., Kudinha T., Kong F., Ma X.J., Chu Y.-Z. i wsp.: Investigation of an unrecognized large-scale outbreak of *Candida parapsilosis sensu stricto* fungaemia in a tertiary-care hospital in China. Sci. Rep. 2016;6:27099, <https://doi.org/10.1038/srep27099>
32. Zarrin M., Erfaninejad M.: Molecular variation analysis of *Aspergillus flavus* using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the internal transcribed spacer rDNA region. Exp. Ther.

- Med. 2016;12(3):1628–1632, <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3479>
33. Badotti F., de Oliveira F.S., Garcia C.F., Vaz A.B., Fonseca P.L., Nahum L.A. i wsp.: Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of *Basidiomycota* (Fungi). *BMC Microbiol.* 2017;17:42, <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0958-x>
34. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 kwietnia 2005 r. w sprawie szkodliwych czynników biologicznych dla zdrowia w środowisku pracy oraz ochrony zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki. DzU z 2005 r. nr 81, poz. 716 z późn. zm.