

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

**Ekologie a ochrana prostředí
Ochrana životního prostředí**



Kseniia Shamratova

**Kvalitativní a kvantitativní analýza spor hub nebo jejich částí ve
velikostně rozlišeném aerosolu.**

Characterization of fungal aerosol in size segregated aerosol.

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jan Hovorka, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pouze s využitím uvedené literatury a že předložená tištěná verze bakalářské práce je totožná s elektronickou verzí vloženou do SIS.

V Praze, dne

.....
Kseniia Shamratova

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce RNDr. Janu Hovorkovi, Ph.D. za odborné vedení, za pomoc a rady při zpracování této práce. Také chtěla bych poděkovat Mgr.Miroslavu Klanovi za pomoc během SEM analýzy.

Abstrakt:

Tato bakalařská práce řeší problematiku bioaerosolu, vlastnosti spor hub rozptýlených ve vzduchu, popisuje jejich význam, koncentraci, způsoby šíření a vliv na zdraví člověka. Daná práce poskytuje informace o metodách odběru a detekce bioaerosolu. Byla prokázána vhodnost využití prvního stupně vysokoobjemového kaskádního impaktoru (Hi-Vol) BGI-900 k odběru bioaerosolu pro následnou analýzu pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM). Pomocí optimalizované metody vzorky bioaerosolu byly izolovány z polyuretanové pěny, což je impakční substrat impaktora.

Vzorky bioaerosolu byly odebrány ze 3 lokalit v ČR: Praha, Březno, Láz. Během SEM analýzy pro 15 vzorků bioaerosolu bylo vytvořeno 605 SEM snímků, na 340 z nich byly identifikovány spor hub. Nejméně spor hub bylo nalezeno v Praze. Na lokalitách Březno a Láz bylo objeveno přibližně stejné množství spor. Spory hub se podařilo identifikovat do 9 rodů, 1 čeledí a 1 druhu. Procento deformovaných spor v Praze činil 48%, v Březnu 23 %, v Lázu 25%. Největší variabilita spor hub byla na lokalitách Březno a Láz. Nejčastěji se vyskytujícím rodem hub byl rod *Cladosporium*. Nebyla pozorována ani pozitivní, ani negativní korelace mezi počtem spor hub a navázkou bioaerosolu. Ve vzorcích zimního odběru z Prahy byl nalezen bioaerosol, kdy zevrubná mikroskopická analýza dalších stupňů nepotvrdila existenci bioaerosolu.

Klíčová slova: spory hub, bioaerosol, kaskádní impaktor, SEM.

Abstract:

This bachelor thesis deals with the issue of bioaerosol, properties of airborne fungal spores, describes their significance, concentration, methods of spreading and influence on human health. This work provides information about sampling and detection methods of bioaerosol. Was proved the suitability of using of the first step of the high volume cascade impactor (Hi-Vol) BGI-900 to collect bioaerosol samples for subsequent scanning electron microscope (SEM) analysis. Using the optimized method, bioaerosol samples were isolated from the polyurethane foam, which is the impact substrate of the impactor.

Bioaerosol samples were taken from 3 locations in the Czech Republic: Prague, Březno, Láz. During the SEM analysis of 15 bioaerosol samples, 605 SEM images were taken, on 340 of them were identified fungal spores. The smallest number of spores were found in Prague. Approximately the same amount of fungal spores was found in Březno and Láz. Fungal spores

were identified into 9 genus, 1 family, and 1 species. The percentage of deformed spores in Prague was 48%, in Březno 23%, in Láz 25%. The greatest variability of spores was at the Březno and Láz localities. The most common fungal genus was the *Cladosporium* genus. No positive or negative correlation was observed between the number of fungi and the bioaerosol mass. In winter samples from Prague, bioaerosol was found, when a detailed microscopic analysis of the other stages did not confirm the existence of bioaerosol.

Key words: fungal spores, bioaerosol, cascade impactor, SEM.

1. Úvod	8
2. Rešeršní část	9
2.1. Bioaerosol	9
2.1.1. Krystalizační jádra	9
2.1.2. Kondenzační jádra	10
2.2. Spory hub	10
2.2.1. Vlastnosti	11
2.2.2. Tvar a povrchová struktura spor	12
2.2.3. Koncentrace	14
2.2.4. Venkovní versus vnitřní prostředí	15
2.2.5. Houby jako patogeny	15
2.3. Transport spor hub	17
2.3.1. Anemochorie	17
2.3.2. Hydrochorie	18
2.3.3. Zoochorie	18
3. Metody odběru vzorků bioaerosolů	19
3.1. Impingery	19
3.2. Cyklony	20
3.3. Impaktory	20
3.3.1. Kaskádní impaktor	20
3.3.2. Virtuální impaktor	21
3.4. Filtry	21
4. Identifikace bioaerosolu	22
5. Identifikace spor hub	22
5.1. Molekulární metody	22
5.2. Imunodetekce	23
5.3. Metody houbové biomasy	23
5.4. Kultivační metoda	24
5.5. SEM analýza	24
5.6. Optická mikroskopie	25
5.7. On-line detekce na základě laserem / světlem indukované fluorescence (LIF)	25
6. Praktická část	26
6.1. Lokality	26

6.1.1. Praha.....	26
6.1.2. Březno	26
6.1.3. Láz.....	27
6.2. Vysokoobjemový kaskádní impaktor (Hi-Vol)	27
6.3. Příprava vzorku bioaerosolu pro analýzu	29
6.3.1. Separace aerosolu od PUF	29
6.3.2. Filtrace	29
6.3.3. Testování homogenity depozitu na filtru	31
6.3.4. Analýza vzorků pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM)	31
7. Výsledky a diskuze.....	32
7.1. Homogenita rozložení depozitu na filtru	32
7.2. Kvalitativní a kvantitativní analýza spor hub	33
7.2.1. Praha.....	34
7.2.1.1. Srovnávací kvalitativní analýza vzorků 18A, 20A a analýza vzorku 19A+B	36
7.2.3. Láz.....	43
8. Závěr.....	50
9. Seznam použité literatury	50

1. Úvod

Atmosférický aerosol je obecně definován jako soubor tuhých, kapalných nebo směsných částic o velikosti v rozsahu 1nm-100 μm , suspendovaných v atmosféře minimálně po dobu umožňující jejich detekci. Atmosférický aerosol je všudypřítomnou složkou atmosféry Země. Zvláštní kategorií aerosolu je bioaerosol, zahrnující životaschopné organismy, jako jsou viry, bakterie, houby a případně jejich části a živočišné a rostlinné produkty jako spory a pyl (Braníš a kol, 2009). Velikost částic aerosolu se obvykle uvádí jako aerodynamický průměr (d_{ae}). D_{ae} je průměr kulové částice o hustotě 1000 kg/m^3 , která má stejnou ustálenou rychlost sedimentace v klidném ovzduší, jako sledovaná částice (Hollerova, 2007).

Bioaerosoly hrají klíčovou roli při rozšíření reprodukčních jednotek rostlin a mikroorganismů (pylů, výtrusů apod.), pro které atmosféra umožňuje transport přes geografické bariéry a na dlouhé vzdálenosti (Brown, 2002). Proto jsou bioaerosoly velmi důležité pro šíření organismů, umožňují výměnu genetické informace mezi stanovišti a geografické posuny biomů. Jsou centrálními prvky vývoje, evoluce a dynamiky ekosystémů. Bakterie, spory hub, pyl a další biočástičky transportované vzduchem jsou nezbytné pro reprodukci a šíření organismů napříč ekosystémy a mohou způsobovat nebo posilovat lidské, živočišné a rostlinné onemocnění. Navíc mohou sloužit jako jádra pro oblačné kapky, ledové krystaly a tím ovlivňují hydrologický cyklus a klima (Frohlich-Nowoisky a kol, 2016).

Spory hub mohou tvořit velký podíl aerosolových částic a mohou potenciálně ovlivnit hydrologický cyklus a klima jako jádro pro vodní kapky a ledové krystaly v oblacích, mlze a srážení. Navíc některé houby jsou hlavní patogeny a alergeny (Frohlich-Nowoisky a kol, 2009). Daná práce má za úkol poskytnout informace o metodách odběru a detekce bioaerosolu, přehledně charakterizovat spory hub, jejich chování v atmosféře, vlastnosti a vliv na zdraví člověka. Praktickou náplní práce je osvojit si techniku skenovací elektronové mikroskopii (scanning electron microscope - SEM), naučit se odlišovat spory hub od jiných objektů a rozpoznávat základní typy běžně se vyskytujících spor hub.

Cílem této práce je ověřit, zda pro odběr a analýzu spor hub nebo jejich částí jako složek bioaerosolu volné atmosféry lze využít první stupeň vysokoobjemového kaskádního impaktoru BGI-900 (Hi-Vol). Kaskádní impaktor byl konstruován pro potřeby toxikologických testů velikostně rozlišených částic aerosolu. Pro tvarovou SEM analýzu bylo nutné vypracovat metodiku separace bioaerosolu od impakčního substrátu PUF (Polyurethane Foam- PUF). Byla popsána homogenita připravených vzorků na filtru a vyhodnocena souvislost mezi počtem a druhovou variabilitou bioaerosolu a hmotností aerosolu odebraného na třech lokalitách v České republice.

2. Rešeršní část

2.1. Bioaerosol

Bioaerosoly jsou velmi malé částice (0.01 - 100 μm) biologického původu rozptýlené ve vzduchu, pocházející z rostlin, zvířat a mohou obsahovat i živé organismy (Georgakopoulos a kol, 2009). Patogenní a/nebo nepatogenní, mrtvé nebo živé mikroorganismy (např. viry, bakterie a houby) mohou být součástí bioaerosolů (Brandl a Mandal, 2011). Kvůli malé velikosti a nízké hmotnosti mohou být bioaerosoly lehce transportovány z jednoho prostředí do jiného (Van Leuken a kol, 2016).

Teoreticky všechny biologické materiály mohou být uvolněny do ovzduší buď přímo, nebo resuspendovány do ovzduší z půdy, oceánů, zvířat, lesů, lidí atd. Jakmile se částičky bioaerosolu dostanou do ovzduší mohou podstoupit lidské inhalaci, suché/mokrý depozici, transportu, krystalizačními a kondenzačními procesy, atmosférické transformaci atd. Proto mají význam pro šíření infekčních, alergických onemocnění, biologickou bezpečnost, atmosférickou chemii i klima (Despres a kol, 2012; Nazarof, 2016).

Přibližně 5-10% celé hmotnosti rozptýlených částic připadá na bioaerosoly. Primární biologické aerosolové částice (primary biological aerosol particles – PBAP) v atmosféře hraje důležitou roli ve vzdušné hygieně jak vnitřního, tak i vnějšího prostředí (Matthias-Maser a Jaenicke, 1995).

2.1.1. Krystalizační jádra

Částičky atmosférického aerosolu působí jako jádra pro oblaka. Většina z nich však potřebují teplotu pod $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zvláštnost některých PBAP spočívá v tom, že mají mrazicí schopnost i při teplotách kolem $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. To znamená, že i když okolí je stále podchlazené, procesy vytváření oblaků mohou být indukovány PBAP působící jako krystalizační jádra (Matthias-Maser and Jaenicke, 1995). Schnell a Vali (1973) uvádějí, že část atmosférických krystalizačních jader má biogenní původ. Laboratorní studie ukázaly, že některé druhy bakterií, spor hub a pyl jsou vysoce efektivní krystalizační jádra (ice nuclei - IN) (Morris a kol, 2013) a biopartikuly byly detekovány v oblacích, mlze, dešti a sněhu (Pratt a kol, 2009). Bylo zjištěno, že některé z bakterií (zejména *Pseudomonas syringae*) a spory hub patří k nejúčinnějším INs, iniciující zmrazení při teplotách až $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Yankofsky a kol, 1981).

Co se týče IN schopnosti hub, Pouleur a kol, (1992) zkoumal IN schopnost suspenze 20 druhů hub v teplotách až -10,0 °C. Nicméně, IN schopnost spor hub nebyla specificky stanovena.

V poslední době roste zájem o IN vlastnosti druhů hub a IN aktivita nad -20 °C byla nalezena u několika druhů hub, jako je *Boletus zelleri* (Haga a kol,2014), *Endocronartium harknessii* (Haga a kol,2013), *Hemileia vastatrix* (Morris a kol,2013), *Isaria farinosa* (Huffman a kol,2013), *Mortierella alpina* (Fröhlich-Nowoisky a kol,2015), *Puccinia spp.*(Morris a kol,2013), *Sarocladium* (dříve *Acremonium*) *implicatum* (Huffman a kol,2013) a *Ustilago nigra* (Haga a kol,2014).

V několika studiích (Von Blohn a kol, 2005) byla studována IN schopnost pylů, což jsou relativně velké částice bioaerosolu o dle 10-100 μm. Krystalizační teploty pro 4 typy pylových částic v imerzním zmrazovacím režimu se pohybovaly od -13, 5 °C do -21, 5 °C.

V globálním měřítku bioaerosoly mohou být jen nepatrnou částí celkové populace IN (Sesartic a kol, 2013).

2.1.2. Kondenzační jádra

Částice aerosolu tvoří jádra pro kondenzaci kapiček v oblacích; jejich počet a vlastnosti ovlivňují mikrofyzické vlastnosti oblaku. Jak moc mohou být aktivní částice jako jádra kondenzace v oblacích (cloud condensation nuclei – CCN), závisí na jejich velikosti a hygroskopicitě (Petters a Kreidenweis, 2007). Primární biologické aerosolové částice jsou obecně považovány za účinné CCN za předpokladu, že jejich povrchy jsou smáčitelné (Ariya a kol, 2009). Bylo navrženo, že největší PBAP (např. pylové zrno) může působit jako takzvaný «obrovský CCN», tzn. že mohou vytvářet kapičky v oblaku při nižších úrovních přesycení než většina jiných aerosolových částic a rychle rostou do velkých kapiček, což usnadňuje tvorbu dešťů (Pope, 2010). V regionálním měřítku by bioaerosoly mohly hrát důležitou roli ve vývoji oblaků a srážek (Prenni a kol, 2009; Poschl a kol, 2010), a to zejména v původních oblastech jako je Amazonský deštný prales (Prenni a kol, 2009; Poschl a kol, 2010).

2.2. Spory hub

Houby tvoří důležitou součást PBAP. Houbové spory se produkují během životního cyklu hub a často představují dominantní biologickou složku okolních aerosolů v rozmezí velikosti 2 až 10 μm (Zhang a kol, 2010).

Spora (výtrus) je struktura sloužící k nepohlavnímu rozmnožování, adaptovaná k rozšiřování a přežití i v nepříznivých podmínkách i na dlouhou dobu. Mnohé taxonomické skupiny jsou pojmenovány podle typu spor. Tak například, askospory jsou charakteristické pro vřeckovýtrusné houby, sporangiospory pro spájkivé houby. Aeciospory (sloužící k primární infekci primárního hostitele), urediospory (letní spory), teliospory (zimní spory) jsou charakteristické pro parazitické rody sněti (*Ustilaginomycetes*) a rzí (*Uredinales*, *Pucciniales*). Z teliospor se po přezimování vyklíčí v basidie, na kterých vznikají basidiospory.

Spory a fragmenty hub jsou chápány jako jedna z nejčastějších tříd PBAP v řadě prostředí (Crawford a kol, 2009). Houby jsou složeny z vegetativních mycelia, které se skládají z velkého množství rozvětvených hyfů a rostou prakticky ve všech ekosystémech na Zemi a jsou také schopné účinné aerosolizace (Adhikari a kol, 2009). Spory se často uvolňují pomocí aktivních procesů, založených na osmotickém tlaku a povrchovém napětí (Ingold, 1971).

Spory mohou být uvolňovány jak během sexuální, tak i asexuální morfy (fáze) životního cyklu houby a mnoho druhů jsou schopné produkovat spory během obou fází. Houby, které aktivně uvolňují spory během sexuálního stádia (teleomorfa), mohou typicky produkovat jeden ze tří různých typu spor. Ascospory jsou uvolňovány z asc (dlouhá trubice, která obvykle obsahuje osm spor), basidiospores z basidia (malý podstavec na plodu těla) nebo teliospory. Během asexuálního stádia, anamorfy, některé houby produkují konidie, také známé jako konidiospory, které jsou produkovány částmi hyf nazývanými konidiospory (Després a kol, 2012).

2.2.1. Vlastnosti

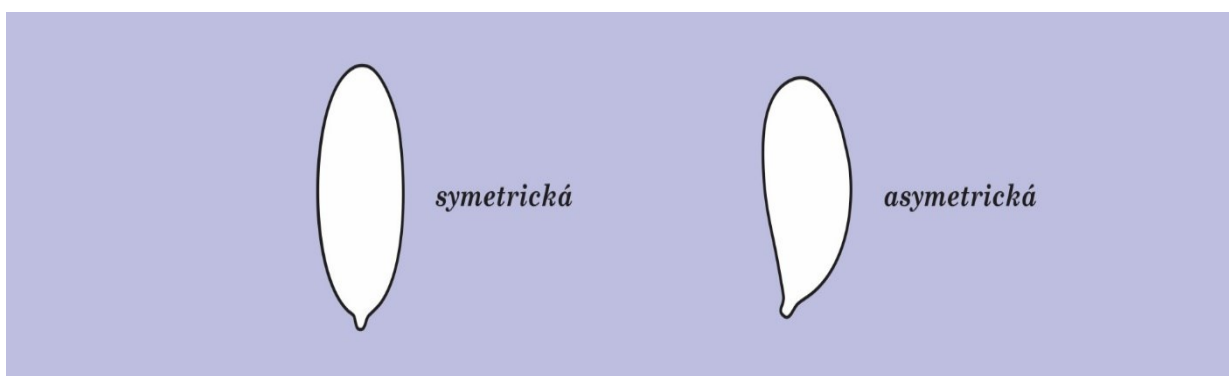
Houbové aerosoly jsou části houbových těl, které jsou dost malé, aby byly transportovány vzduchem. To, jak dlouho zůstanou částice ve vzduchu, záleží na jejich aerodynamickém průměru, pohybu vzduchu a povaze okolí (Burge, 2011). V závislosti na biologických druzích, věku a okolních podmínkách se může průměr spor hub měnit ($\leq 1-50 \mu\text{m}$); nejčastěji je v rozmezí $2-10 \mu\text{m}$ (Huffman a kol, 2010). Navíc se často pozoruje, že houbové spory se agregují do dlouhých řetězců spor, které výrazně ovlivňují jejich aerodynamický průměr a mají důsledky jak pro atmosférickou životnost, tak pro proniknutí do lidských tkání (Reponen a kol, 2001). Některé houby jsou hlavní patogeny nebo alergeny pro člověka, zvířata a rostliny a vzduch je primární médium pro jejich rozptýlení (Frohlich-Nowoisky a kol, 2009).

Spory s průměrným aerodynamickým diametrem mezi 2 a $10 \mu\text{m}$ se mohou dostat do dýchacího systému člověka a vyvolat alergie, zhoršit astma a způsobit akutní respirační onemocnění (Pringle, 2013). Je známo, že klíčení spor hub na různých substrátech vede k degradaci potravy a organického materiálu; kromě toho, spory hub mohou způsobit negativní zdravotní problémy

pro člověka a rostliny. Výzkumy ukazují, že i v přítomnosti kouře z automobilů a znečištěného vzduchu se zvyšuje účinnost spor hub jako bioalergenů (Chehregani a kol, 2004).

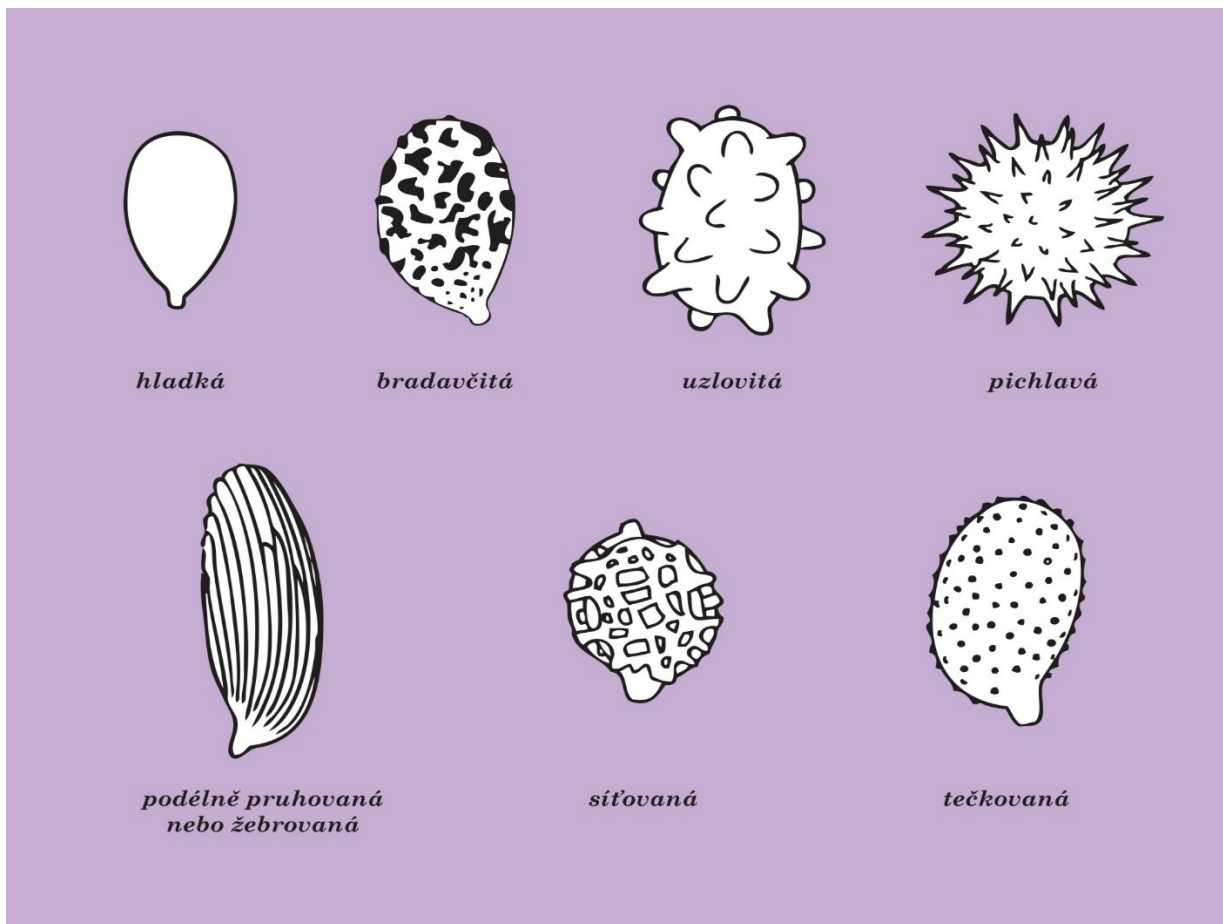
2.2.2. Tvar a povrchová struktura spor

Pro identifikaci hub je důležitá povrchová struktura jejich spor, která je charakteristická pro různé rody. Mnoho hub vypadá velmi podobně makroskopicky, ale mikroskopické znaky mohou odhalit velké rozdíly. Spory nejsou pouze kruhové propagule, které postrádají odlišnou strukturu. Každý druh houby má unikátní spory s mnoha charakteristikami, které je třeba rozpoznat a popsat. Houby mají extrémně širokou škálu sporných barev, tvarů, velikosti a stěn. Houby, které mají nadzemní plodnice, obvykle mají spory, které jsou bilaterálně asymetrické (nerovnoměrné). Tyto spory jsou známé jako balistospory, protože jsou pod vlivem síly vypouštěny z bazidia pro rozptýlení v proudech vzduchu. *Gasteromycety* obvykle mají spory, které jsou bilaterálně symetrické (rovnostranné), takže při pohledu zepředu a z boku nebo z konce, spory vypadají jako zrcadlové obrazy. Tyto symetrické spory se nazývají statismospory, protože obvykle jsou pasivně vypouštěny z plodnice. Tvar a velikost hilárního appendixu (bod připojení k bazidiu před separací) mohou být zaoblené, zrnaté, rozbité nebo celé. Také apex spor (protilehlý konec hilárního appendixu) může být zaoblený nebo špičatý. Sporová stěna je důležitým diagnostickým znakem pro rozlišení ektomykorhizních hub, protože se liší od tenkých a hladkých až po složité a mající ornamentace. Například některé rody, jako jsou *Amanitaceae*, mají zcela hladké spory, zatímco druhy jiných rodů mohou mít unikátní ornamentace spor.



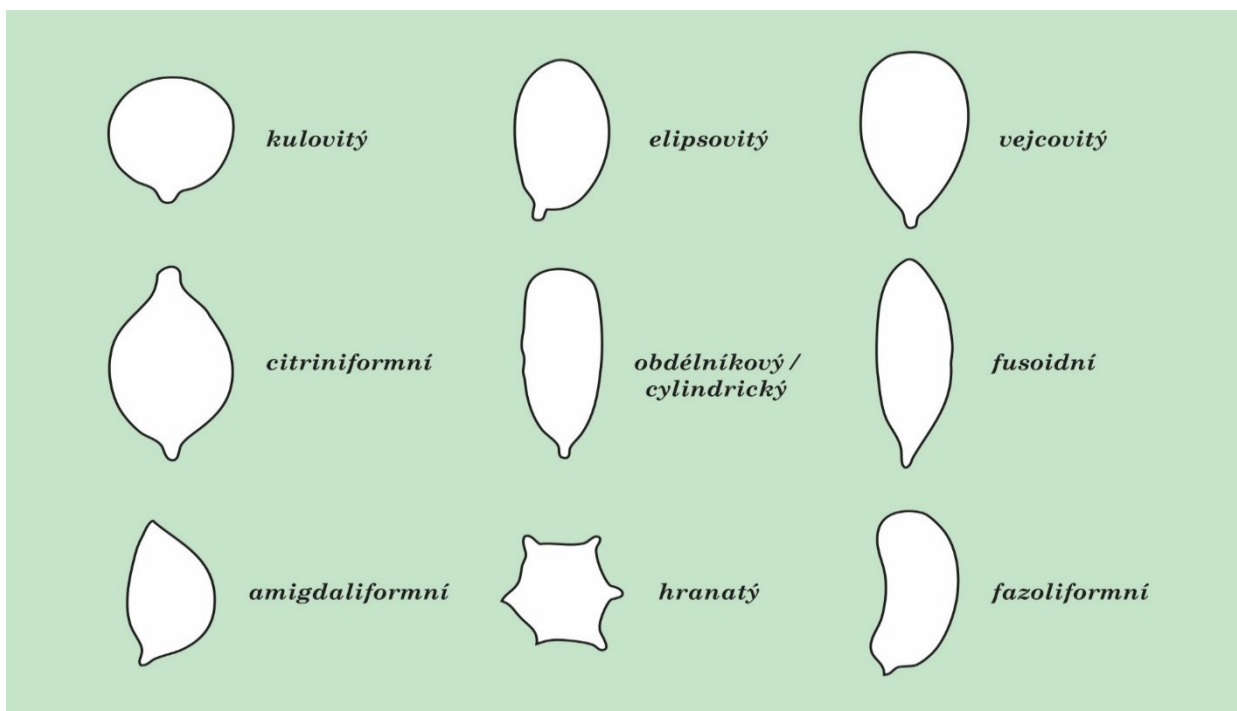
Obr. 1 Struktura a tvar spor. Vpravo je symmetrická spora, vlevo asymetrická spora.

(Brundrett a kol, 1996).



Obr. 2 Ornamentace spor (některé typické druhy ornamentaci houbových spor).

(Brundrett a kol, 1996).



Obr. 3 Tvar spor (kulovitý, elipsovitý, vejcovitý, citriniformní, obdélníkový / cylindrický, fusoidní, amigdaliformní, hranatý, fazoliformní).

(Brundrett a kol, 1996).

2.2.3. Koncentrace

Výskyt spor hub závisí na čase, klimatu a zeměpisné poloze (Flores a kol, 2013). Dalšími důležitými faktory je hustota obyvatelstva, aktivita a cirkulace vzduchu. V ovzduší se vyskytuje značný počet spor hub, jejich hustota se pohybuje mezi 10^3 až 10^4 spory m^{-3} (Fröhlich-Nowoisky a kol, 2009). Koncentrace spor v atmosféře je výsledkem složitých interakcí mezi biologickými a environmentálními faktory (Grinn-Gofron a kol, 2011). Spory, které jsou reprodukčními jednotkami hub, se uvolňují do ovzduší a jsou rozptýleny vzdušnými proudy do atmosféry. Množství houbových spor v atmosféře záleží na denním období a meteorologických faktorech (Gilbert a Reynolds, 2005; Stennett a Beggs, 2004).

Spory hub, zejména *askomycety* a *bazidiomycety*, tvoří velký podíl venkovního hrubého aerosolu (1-10 μm) (Burge, 2011). Nedávné studie ukázaly, že spory hub a jiné biologické částice mohou představovat velké podíly hmoty aerosolových částic ve vzduchu deštného pralesa, jakož i ve venkovských a městských prostředích. Například spory hub obsahovaly v tropickém deštném pralesi až 45% hmotnosti hrubozrnných částic ($>1\mu m$) a až 4 - 11% hmoty jemných částic ($\leq 2, 5 \mu m$) v městském a venkovském vzduchu (Frohlich-Nowoisky a kol, 2009). Výskyt spor ve vzduchu se obecně zvyšuje, když se výrazně zvyšuje teplota vzduchu (Langenberg a kol, 1977), relativní vlhkost (Webster a kol, 1989) nebo počet srážek (Velez-Pereira a kol, 2016). Vysoké teploty vzduchu pozitivně korelují s vysokou hustotou spor ve vzduchu rodů *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum* (Aira a kol, 2013). Zvýšení relativní vlhkosti může vyvolat uvolňování spor, což zvyšuje množství spor ve vzduchu (Leyronas a Nicot, 2013). Déšť také vyvolává uvolňování spor (Aylor a Sutton, 1992) a vlhká půda a listy, které přetrvávají po dešti, přispívají ke zvýšení hustoty spor hub ve vzduchu (Ganthaler a Mayr, 2015). Rody jako *Cladosporium*, *Alternaria*, *Epicoccum* nebo *Drechslera* mají nejvyšší koncentrace během teplých suchých dní, zatímco askospory a basidiospory jsou nejhojnější naopak ve vlhkých podmínkách v noci nebo k ránu (Burch a kol, 2002).

Zdá se, že cirkulace spor rodu *Alternaria* je podmíněna především teplotou vzduchu, zatímco cirkulace spor rodu *Cladosporium* je ovlivněna slunečním zářením (Stennett a Beggs, 2004). Mahieu a kol. (2000) zdokumentovali, že koncentrace spor rodu *Aspergillus* vzrostla během sanace a že použití čističe vzduchu významně snižovalo jejich koncentrace.

Ukázalo se, že vzduch, který byl odebrán z krávinu obsahoval až 16 000 000 spor na m^3 ; převážná většina těchto spor patřila do skupiny *Aspergillus / Penicillium*, které se uvádí jako jedná skupina, protože je obtížné odlišit pomocí optické mikroskopie (Baruah, 1961).

2.2.4. Venkovní versus vnitřní prostředí

Geografická poloha, sezóna a zvláště venkovní klima ovlivňují druhy spor hub uvnitř budov (Sterling a Lewis, 1998). V současné době lidé stráví spoustu času uvnitř budov. Úroveň znečištění ovzduší ve vnitřním prostoru, které představuje pouze 1/3 vnějšího znečištění, ovlivňuje zdraví pracovníků stejně jako venkovní (Shalaboda a kol, 2015). Koncentrace spor hub uvnitř budov, která vyvolává příznaky alergie, je 1000 částic na 1 m³ vzduchu (1/3 vnější úrovně), pro pyl - 15 částic na 1 m³ vzduchu (1/3 vnější úrovně) (Shalaboda a kol, 2015). Špatná kvalita vzduchu uvnitř budov je z velké části podporována moderními domy, kde je poskytována nízká spotřeba energie. Tyto domy jsou postaveny tak, aby udržovaly vzduch v prostorách a nepodléhají náhlým teplotním výkyvům.

Ve většině případů je koncentrace spor hub uvnitř budovy kontrolována koncentrací spor hub venku. Dvě nedávné studie z Houstonu potvrzují skutečnost, že většina vnitřních houbových aerosolů (hyfy, spory, úlomky a částičky hub) pochází z venkovního vzduchu. V jedné studii venkovní koncentrace vysvětlovali vysokou koncentraci spor hub uvnitř. Levy a kolektiv (1999) sebrali přes 100 vzorků během jediného dne intenzivního odběru vzorků v pekárně. Koncentrace a druhy spor ve vzduchu souvisely s činnostmi v pekárně, ale faktory toto ovlivňující byly různé v různých dnech a koncentrace ve venkovním vzduchu byly proměnlivé a výrazně ovlivňovaly vnitřní koncentrace.

2.2.5. Houby jako patogeny

Bylo pozorováno, že těžké plicní onemocnění a alergie mohou nastat v důsledku expozice organickému prachu, bakteriím, aktinomycetům a houbám z míst kompostování komunálního odpadu (Huang a kol, 2002). Respirabilní velikostní frakce $\leq 10 \mu\text{m}$ se snadno rozptylují a pronikají do dýchacího systému (Cox a Wathes, 1995). Aerodynamické velikosti částic určují hloubku jejich proniknutí a usazování v lidském respiračním systému, což zase určuje možné účinky na zdraví (Golofit-Szymczak a kol, 2010).

Téměř 10% lidí po celém světě trpí alergií na houby (Burge, 2001). Četné studie ukázaly, že expozice houbám může být spojena s akutními toxickými účinky, alergiemi a astmatem (Bush a kol, 2001). Více než 100 druhů hub jsou spojeny s vážnými infekcemi lidí a zvířat, zatímco mnoho dalších druhů způsobuje vážné choroby rostlin (Cvetnić a kol, 1997).

Spory hub určitých rodů jsou často implikované do respiračních příznaků alergií (Mari a kol, 2003).

Velikost houbových částic rozptýlených ve vzduchu ovlivňuje jak proniknutí do lidského respiračního traktu tak efektivitu jejich sběru různými odběrovými zařízeními. Obvyklá velikost houbových spor je v rozmezí 2 až 10 μm , z tohoto důvodu jsou účinně sbírány nejčastěji používanými přístroji pro odběr vzorků vzduchu a lehce pronikají do dolních dýchacích cest.

Bylo zjištěno, že citlivost na *Alternaria* je rizikovým faktorem závažných astmatických záchvatů a epidemie astmatu. V jedné studii bylo úmrtí na astma v Chicagu více než dvakrát vyšší ve dnech, kdy koncentrace spor rodu *Alternaria* ve vzduchu byla 1000 spór/ m^3 (Baxi a kol, 2016).

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity produkované houbami. Mohou způsobovat kontaminace mnoha zemědělských produktů. Aflatoxiny jsou nejvíce toxické, karcinogenní a teratogenní sloučeniny mezi známými mykotoxiny a jsou produkovány hlavně *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* (Ellis a kol, 1991).

Dle Riina Rautemaa-Richardson a Malcolm D. Richardson (2017) rozlišujeme následující houbové infekce:

Candidóza

Kvasinky patřící do rodu *Candida* mohou způsobit akutní nebo chronickou hlubokou infekci. Jde o nadměrné pomnožení kvasinek (*Candida albicans*) ve střevech, krvi a orgánech. *Candida albicans* je parazitická kvasinka, která osídluje střeva (10-15% střevní mikroflóry), pohlavní ústrojí, ústa, jícen a krk. Tato kvasinka žije za normálních podmínek v rovnováze s ostatními bakteriemi (např. acidophilus a bifidobakterie) a kvasinkami v lidském organismu. Za určitých podmínek se však množí, oslabuje imunitní systém a způsobuje infekci známou jako kandidóza. Mikroorganismus může cestovat krevním oběhem do mnoha tělních orgánů.

Aspergilóza

Termín «*aspergilóza*» označuje infekce způsobené houbami rodu *Aspergillus*, které se vyskytují po celém světě. Vstupní bariérou pro spory houby (konidie) jsou nejčastěji dýchací cesty či kůže zbavená ochranných bariér. Většina lidí vdechuje spory této houby každý den. Charakter a závažnost onemocnění závisí zejména na stavu imunity. Proto se toto onemocnění nejčastěji objevuje u lidí s oslabenou imunitou (imunosuprimované). Nejběžnější infekční agens je *Aspergillus fumigatus*. Onemocnění může také vyplynout z alergické reakce na inhalované spory.

Cryptococcosis

Infekční choroba způsobená kvasinkovými houbami *Cryptococcus neoformans* se vyznačuje napadením centrálního nervového systému, plic, kůže a sliznic. Onemocnění je většinou zaznamenáno u mužů. Původce onemocnění se může nacházet v půdě kontaminované ptáčím

trusem a půda také může být infikovaná při oplodnění tímto trusem. Předpokládá se, že infekce následuje po inhalaci vysušených spor.

Mucormykoza

Mucormykoza je infekce způsobená houbami z řádu *Mucorales*. Obvykle jsou nejčastěji zahrnuty druhy rodu *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*. Jedná se zejména o plicní, gastrointestinální, kožní, CNS houbovou infekci. Onemocnění je často charakterizováno hyfy, které rostou uvnitř a kolem krevních cév a mohou potenciálně ohrožovat život u diabetických nebo těžce imunokompromitovaných jedinců.

Pneumocystis jirovecii pneumonie

Pojmenován po známém českém parazitologu Otto Jirovcí. Infekce *Pneumocystis jirovecii* (dříve *Pneumocystis carinii*) se obvykle projevuje po vdechnutí spor z prostředí ve formě pneumonitidy. Tento parazit je specifický pro člověka, jiní živočichové nebyly infikováni tímto druhem. Jiné typy pneumocytů naopak neinfikují lidi. *Pneumocystis* se objevuje v plicích zdravého člověka, ale způsobuje zánět u lidí s imunodeficiencí.

2.3. Transport spor hub

Po celém povrchu Země se neustále šíří množství výtrusů (příp. úlomků mycelií), které můžeme nalézt i v extrémních podmínkách.

Nejběžnější způsoby šíření hub jsou prostřednictvím vzduchu, vody, rostlin anebo živočichů. Zvláštní postavení má antropochorie, šíření zásluhou člověka – zejména s dopravou, ale třeba i s odpadem (Křížková, 2017).

Rozšíření a transport vzdušných spor hub jsou ovlivněné několika meteorologickými faktory, jako jsou vítr, dešťové srážky, teploty vzduchu, atmosférický tlak, sluneční záření a relativní vlhkost (Giner a kol, 2001).

2.3.1. Anemochorie

Houby, u nichž probíhá rozptyl pomocí větru (anemochorie), mají malé lehké spóry. Aerodynamický průměr diaspor hub (struktury primárně určené k rozšiřování jedince) (2–200 µm) umožňuje jejich dálkový přenos, u urediospor *Puccinia graminis* byl zjištěn dolet až 10 000 km. Diaspory semenných rostlin se na takové vzdálenosti nešíří (Ekologie a význam hub (místy

se zvláštním zřetelem k makromycetům); Modularizace výuky evoluční a ekologické biologie CZ.1.07/2.2.00/15.0204). Ovzduší samo o sobě není pro houby a jejich spory moc «přátelské» prostředí, mají zde nízkou vlhkost a jsou vystaveny záření. Výhodu v tomto mají spory mající ve stěně melanin (tmavý pigment), jímž jsou přímo na povrchu chráněny proti UV záření. Spory rozšiřované větrem jsou v řadě případů aktivně uvolňovány z plodnic. K aktivnímu uvolňování výtrusů z plodnice dochází jen při vyšší vlhkosti vzduchu. Na šíření spor se mohou spoluuplatňovat dešťové srážky: dopad vodní kapky vede k vymrštění spor (buď z plodnice nebo spor již uvolněných, ležících na nějakém podkladu) do vzduchu, dále již šíření zajišťují vzdušné proudy (jde o kombinaci hydrochorie a anemochorie, uplatňující se hlavně na krátké vzdálenosti) (Ekologie a význam hub (místy se zvláštním zřetelem k makromycetům); Modularizace výuky evoluční a ekologické biologie CZ.1.07/2.2.00/15.0204).

2.3.2. Hydrochorie

U šíření vodou (hydrochorie) mají spory co možná největší povrch s výběžky, což jim umožňuje snadnější přenos vodním proudem, ale i přichycení na povrchové blance vody.

V případě hydrochorie jde zejména o šíření zoospor, a to nejen přímo ve vodě u vodních zástupců, ale též například v půdní vodě (jde o zástupce oddělení *Oomycota* a zejména *Chytridiomycota*, kteří mohou být též přenašeči viróz). Pohyb zoospor je buď pasivní v encystovaném stavu nebo aktivní – například u parazitických druhů z oddělení *Oomycota* se uplatňuje pozitivní chemotaxe vyvolaná kořenovými exudáty. V případě aktivního šíření pohyblivých buněk se jedná též o formu autochorie. V případě suchozemských hub se jedná spíše o pasivní odnos spor tekoucí vodou (napadají-li do vody) nebo prostřednictvím srážek (rostřík kapek při dešti) (Ekologie a význam hub (místy se zvláštním zřetelem k makromycetům); Modularizace výuky evoluční a ekologické biologie CZ.1.07/2.2.00/15.0204).

2.3.3. Zoochorie

Zoochorie je způsob šíření spor pomocí živočichů. Existují dva typy zoochorie: epizoochorie (na povrchu těl), endozoochorie (uvnitř těl).

Endozoochorie: vyloženě skrz trávicí trakt se šíří houby podzemní. Obvykle uvolňují aromatické látky, které působí jako atraktanty – alkoholy, ketony a estery (dimetyl sulfid), zřejmě se nejedná o analogy pohlavních hormonů. Vůně je cítit i z půdy ven a přiláká savce. Endozoochorii jako «vedlejší produkt své činnosti» zajišťuje i řada mykofágických živočichů – například drobní

hlodavci (u některých mohou tvořit plodnice až 100 % stravy v průběhu určitého období), ale i medvědi (nejvíce „houbaří“ na podzim kolem září a houby činí 1–7 % jejich potravy).

Na stejné úrovni jako endozoochorie «podzemek» je epizoochorie v případě plodnic padlí s větvenými přívěsky, jimiž se zachytávají na tělech lesních živočichů; nejedná se o tak bytostně spjatý vztah jako v případě ambróziových hub, ale přece jen jde o nezanedbatelný přínos k šíření spor. Zatímco padlí využívají «mechanické pomůcky» k zachycení spor, jiné houby šířící své spory na povrchu těl živočichů (nejčastěji hmyzu nebo slimáků) vylučují sliz obalující spory nebo látky, které lákají hmyz svým pachem – známými případy jsou chlamydospory druhů rodu *Asterophora* (mouchy láká pach rozkládajících se ryzců a holubinek). (Ekologie a význam hub (místy se zvláštním zřetelem k makromycetům); Modularizace výuky evoluční a ekologické biologie CZ.1.07/2.2.00/15.0204).

3. Metody odběru vzorků bioaerosolů

Dle C.W. Haig a kol, 2016 pokud jde o detekci bioaerosolu, lze rozlišit pět různých metod, (I) techniky růstu (kultivovatelného čísla), (II) mikroskopie (celkový počet a tvar), (III) poměrně rychlé biochemické techniky, (IV) imunologické techniky a (V) techniky molekulární biologie (Griffiths a kol, 1994). Vzorky bioaerosolu mohou být sebrány za použití buď aktivního nebo pasivního sběrače (C.W. Haig a kol, 2016).

3.1. Impingery

Impingery jsou běžnými nástroji pro odběr vzorků bioaerosolu. Impingery pracují tak, že přivádějí proud vzduchu spolu s částicemi přes trysky, které vystupují do oddílu obsahující kapalinu. Jakmile částice rozptýlené ve vzduchu přejdou přes trysky, vstupují do sběrného oddílu. Vzdálenost od výstupu z trysky k povrchu kapaliny spolu s průtokem vzduchu ovlivňuje průměr částic, které budou sbírány. Sbíráání na kapalinu zabraňuje vysoušení shromážděných částic, avšak tření v trysce ve spojení s turbulencí způsobenou vzduchem hnaným do komory mohou mít za následek ztrátu životaschopnosti. Široce používané bioaerosolové impingery zahrnují All-Glass Impinger (Ace Glass Inc., Vineland, NJ, USA), BioSampler (SKC Inc., Covington, GA, USA) a Multistage Liquid Impinger (Burkard Manufacturing Co. Ltd, Rickmansworth, UK), kromě jiných (Haig a kol, 2016).

3.2. Cyklony

V cyklonovém vzorkovači je vzduch s částicemi dostává do tvaru spirály díky tvaru sběrného oddílu, vířivý proud.

V tomto proudu vzduchu jsou částice vystavené odstředivé síle, která je úměrná jejich průměru, hustotě a rychlosti. Tato odstředivá síla nese částice s dostatečnou setrvačností k cyklonové stěně, kde částice jsou odděleny od proudu vzduchu do kapaliny. To znamená, že větší částice mají větší pravděpodobnost, že budou zachycené, než menší částice, a stejně jako u všech vzorkovačů, je pro udržení správné efektivity odběru nutné kalibrovat proud vzduchu. Po dosažení dna cyklonu proud vzduchu změní svůj směr a nese menší, nezachycené částice ven z cyklonu.

Cyklóny, které jsou široce používané, zahrnují Coriolis_m (Bertin Technologies, Saint Quentin en Yvelines, France), SASS 2300 (Research International, Inc., Monroe, WA, USA), Burkard Cyclone sampler (Burkard Manufacturing Co. Ltd, UK) spolu s ostatními cyklony, které byly navrženy speciálně k odběru vzorků z bioaerosolu (Haig a kol, 2016).

3.3. Impaktory

Stejně jako cyklóny, impaktory pro separaci částic využívají jejich setrvačnost.

Vzorek vzduchu prochází souborem trysek, které přivádějí vzduch obsahující částice přes otvor směrem k agarové kultivační desce, která leží kolmo k výstupu trysky. Proud vzduchu projde přes trysky, dále následuje do sady záhybů známých jako proudnicové linie skrz vzorkovač; tyto záhyby leží tangenciálně k vektorům rychlosti toku. Deska vychýlí proudy o 90°, přičemž vzduch proudí přes desku a průchod mezi deskou a stěnami zařízení. Částice s dostatečně nízkou setrvačností budou nesené pomocí proudnicových linií a takovým způsobem zachycování uniknou. Nicméně, částice s vyšší setrvačností nebudou schopné sledovat 90 stupňovou křivku proudnicových linií a pod vlivem odstředivé síly budou mít vliv na agarovou desku. Účinnost odběru impaktoru proto závisí primárně na průměru a hustotě částice a na průměru trysky, spolu s rychlostí vzduchu přes trysky (tudíž je nutné kalibrovat průtok vzduchu přes zařízení) (Haig a kol, 2016).

3.3.1. Kaskádní impaktor

Kaskádní impaktory mohou být použity pro získání informací o distribuci částic podle velikosti v aerosolu, přičemž tok vzduchu s částicemi prochází přes několik po sobě následujících pater

trysky a impaktních desek. Každá vrstva, známá jako patro, sbírá částice určité velikosti. Menší částice zůstávají ve vzduchu a jsou převedeny do dalšího patra. V každém dalším patru se bude průměr trysky postupně zmenšovat, a proto se rychlost průchodu vzduchu přes trysky zvětšuje a velikost řezu částic se zmenší. Konečně průtok vzduchu projde filtrem, aby se dovolilo zachycení zbývajících malých částic. Odvážením impaktních desek z každého patra a filtru před a po odběru vzorků lze stanovit hmotnostní zlomek částic v určitém rozmezí velikosti (Haig a kol, 2016).

3.3.2. Virtuální impaktor

Virtuální impaktory také používají setrvačnost k oddělování částic v závislosti na jejich průměru. Nicméně, virtuální impaktory neshbírají na agarovou desku, ale místo toho mají sběrnou sondu pracující s malým průtokem. To funguje tak, že částice vstupují do impaktoru a jsou nesený hlavním prouděním kolem pásky. Menší částice jsou schopny sledovat proudnicové linie kolem záhybu, zatímco částice větší než průřezový průměr zařízení mají dostatečnou setrvačnost, aby mohly být přeneseny do sběrné sondy. Menší tok ve sběrné sondě nese tyto větší částice na sběrný filtr. Podobně jsou menší částice shromažďovány na filtr v samostatné části zařízení. Virtuální impaktory mají obvykle pouze jedno nebo dvě patra, protože každé separační patro vyžaduje kontrolu jak velkých, tak menších průtoků. Použití sběrné sondy místo agarové destičky vylučuje problémy s odrazem částic a nárůstem usazování; virtuální impaktory však vykazují ztráty sběru v blízkosti velikosti průřezu průměru na vstupu sondy. Užitečným rysem těchto zařízení je skutečnost, že proudění vzduchu koncentruje částice větší než průřezový průměr na menší objem vzduchu a dělá virtuální impaktory užitečné jako koncentrátoři částic (Haig a kol, 2016).

3.4. Filtry

Osobní vzorkovače jsou malá přenosná zařízení, která jsou připojena k oděvu pracovníků, aby poskytla reprezentativní ukázkou expozice jednotlivce nebezpečnému aerosolu. Stejně jako větší vzorkovače, osobní vzorkovače vyžadují pumpu, která pohání vzduch přes zařízení, přičemž jako předběžná selekce velikosti částic byla použita vzorkovací hlava, pěna nebo cyklón. Stejně jako u větších zařízení, osobní vzorkovače vyžadují, aby pumpy proháněly vzduch přes zařízení, přičemž jako předběžná selekce velikosti částic se používá vzorkovací hlava obsahující impaktor nebo cyklón. Bioaerosolové částice se pak sbírají na filtry, odkud mohou být přeneseny na destičky nebo rozpuštěny do kapalného roztoku pro kultivaci nebo mikroskopické zkoumání (například imunofluorescenci). Odběr vzorků filtrováním je běžný způsob pro odběr vzorků

aerosolů, ale méně populární pro sběr bioaerosolových částic kvůli ztrátě bioefektivity prostřednictvím vysoušení patogenu, avšak byly zaznamenány významné úspěchy při sběru bioaerosolů.

Mezi osobní vzorkovače s různými filtry patří Inhalable GSP samplers (CIS; BGI, Inc., Waltham, MA, USA), ve kterých se používají teflonové a polykarbonátové filtry, PAS-6 vzorkovací hlavy obsahující polytetrafluorethylen (PTFE) filtry (Millipore, Merck, France) a Button Aerosol Sampler obsahující želatinové filtry (SKC, Inc.) (Haig a kol, 2016).

4. Identifikace bioaerosolu

Typicky různé metody poskytují velmi odlišné informace, z nichž každá poskytuje jiný pohled na extrémně složitou směs atmosférických aerosolů. Optické a elektronové mikroskopie mohou dodat velikost částic a tvar přímo, zatímco elastický rozptyl odhaluje informace o morfologii, a to i od ojediněle pohybujících se částic. Spektrometrie laserem buzeného plazmatu (Laser-Induced Breakdown Spectroscopy - LIB) a rentgenová fluorescence mohou určit techniky charakterizace aerosolu. Infračervená (IR) absorpce a Ramanova spektroskopie poskytují rotační a vibrační informace na molekulární úrovni částic a laserová indukovaná fluorescenční spektroskopie (Laser-induced fluorescence - LIF) se zaměřuje na elektronické, ro (rotační)-vibrační struktury molekul v částicích (PAN, 2015).

5. Identifikace spor hub

5.1. Molekulární metody

Vývoj DNA analýzy je příslibem umožňujícím identifikaci specifických houbových taxonů ve vzorcích. Mnoho analýz bylo vyvinuto pro identifikaci specifických hub a skupin hub. Pro detekci jakékoli houby uvnitř budovy byl vyvinut test polymerázové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction- PCR) za použití pouze jedné sady primerů, který je specifický pro houby. Zvláště důležité využití PCR metod je porovnávání vzorků hub z různých zdrojů (Burge, 2002).

Celé spektrum atmosférické mikrobiální rozmanitosti, tj. atmosférický mikrobiom, se nyní stává přístupným díky nedávným vývojům a aplikacím metod založených na DNA a RNA analýze (Maron a kol, 2005). Identita bioaerosolů může být určena DNA sekvenováním. Mnoho studií používá tradiční sekvenační přístup Sanger, protože poskytuje sekvence, které jsou dostatečně dlouhé pro identifikace jednotlivých rodů nebo druhů pomocí srovnání se sekvencemi

dostupnými v online databázích, jako je Národní centrum biotechnologických informací (National Center for Biotechnology Information) (Despres a kol,2007; Frohlich-Nowoisky a kol,2009). Bioaerosolová analýza založená na sekvencování Sanger se pomalu nahrazuje moderními technologiemi následné generace (Next Generation Sequencing - NGS). V minulosti byla délka sekvencí často omezujícím faktorem pro identifikaci do druhu nebo rodu, protože čtení byla mnohem kratší než sekvence získané sekvencováním Sanger. NGS se neustále zlepšují a jsou schopny poskytovat sekvence delší než 400 bp - komplementární pár bází - (Schmidt a kol, 2015).

5.2. Imunodetekce

Imunodetekce je důležitou metodikou pro detekci specifických alergenů. Pro houby je metoda pouze částečně úspěšná kvůli obrovskému počtu potenciálních alergenů, které mohou být ve vzorku, a také variabilitě produkce alergenů v závislosti na kmenu, věku, substrátu a dalších faktorech. Protilátky jsou komerčně dostupné pro řadu houbových alergenů, ale metoda se ještě musí rozšířit. Razmovski a kol, 2000 používaly protilátky *Lolium perenne* pro vizualizaci částic obsahujících alergeny na podložních sklíčkách Burkard spora-past (spore-trap). Tato metoda umožňuje lokalizovat typy částic, na kterých určité alergeny vznikly.

5.3. Metody houbové biomasy

Ergosterol v ekologických vzorcích je jasným znakem přítomnosti hub a testy pro tyto houbové složky byly po mnoho let používány k detekci růstu hub v potravinářských produktech. Nicméně je třeba poznamenat, že obsah ergosterolu v kultivovaných houbách závisí na typu živného média, na kterém rostou (Szponar a kol, 2000). To by mohlo omezit porovnání mezi měřeními biomasy hub u různých druhů stavebních materiálů.

Pro identifikaci houbových aerosolů, což jsou spory hub nebo jejich části rozptýlené ve vzduchu, byla nedávno vyvinuta molekulární stopová metoda (Lee a kol, 2004). Například polysacharidy (Douwes a kol, 1999), fosfolipidy (Womiloju a kol, 2003), cukerné alkoholy (Liu a kol, 2016) a ergosterol (Di Filippo a kol,2013) - bylo zjištěno, že jsou stopami pro houbové aerosoly. Ergosterol v houbách a houbových sporech je navázán na buněčnou membránu ve volné formě a esterifikován.

5.4. Kultivační metoda

Tradiční kvantitativní metoda houbových sporů byla založena především na počítání kolonií (Colony Forming Units - CFU) (Després a kol, 2012). Tato metoda by mohla vypočítat celkovou koncentraci spor hub a identifikovat morfologii (Gonçalves a kol, 2010). Avšak CFU metoda závisí na kultuře mikroorganismů.

Metody kultivace se již dlouho používají k detekci živých mikroorganismů. Pouze malá část všech druhů živých organismů, které existují v přírodě, může být pěstována v laboratoři se současnými kultivačními technikami. Kultivační metody jsou schopné shromažďovat a zjišťovat pouze určité životaschopné bakterie, houby a řasy, zatímco nejsou schopné detekovat všechny ostatní biologické aerosolové částice z těchto a jiných skupin organismů (např. mrtvé bakterie a houby, fragmenty tkání, jako jsou buněčné stěny nebo cytoplazmatický materiál). Ačkoli nejsou schopny přímo infikovat hostitele, neživotaschopné třídy PBAP jsou stále velmi důležité, protože mohou vyvolat škodlivé účinky na zdraví (Green a kol, 2006) a mohou být stále významné pro tvorbu oblaků. Studie zkoumající životaschopnost buněk však naznačují, že převážná většina mikrobiálních organismů v životním prostředí je nekultivovatelná, i když je životaschopná (Wainwright a kol, 2004b). Pouze 17% známých druhů hub může být kultivováno (Bridge a Spooner, 2001) a u bakterií je frakce typicky menší než 10% s pozorovaným rozmezím 0, 01% až 75% a průměrnými hodnotami odhadovanými na 1% (Chi a Li, 2007).

5.5. SEM analýza

Skenovací elektronový mikroskop (scanning electron microscope - SEM) může poskytnout vynikající obrazy až do 40000 zvětšení a někdy v závislosti na vzorku, nástroji a přípravě vzorku. Umožňuje detailní zkoumání morfologie a povrchu částic (Karlsson a Malmberg, 1989). Překvapivě je možné zhotovit snímky některých vzorků v podmínkách vysokého vakua bez předběžného ošetření, i když se houbové a rostlinné buňky zhroutnou po dehydrataci. U hub se SEM běžně používá k dokumentaci morfologie a prostorových vztahů. Značně odolnější vůči vysokému vakuu a ozáření jsou spory houby *Sordaria* (Read a Lord, 1991), které mohou být zobrazeny ve vysokém vakuu až při 34000 zvětšení.

5.6. Optická mikroskopie

V řadě studií k charakterizaci vzorků PBAP byla použita světelná mikroskopie (Spurny, 1994). Musí se však brát v úvahu, že částice $< 2 \mu\text{m}$ jsou viditelné pouze jako tečky pod optickým mikroskopem, a proto nemohou být podrobně analyzovány podle jejich velikosti a tvaru. Vzorky aerosolu sebrány sedimentačním a impakčním zařízením lze přímo pozorovat a počítat pomocí světelné mikroskopie. Pro analýzu rozmanitosti a složení bakterií a hub nejsou mikroskopické analýzy zpravidla spolehlivé, neboť malé nevýrazné spory a hyfy hub nebo fragmenty houbových tkání nelze klasifikovat (Pitt a Hocking, 1987). Některé houby nebo bakterie mohou zůstat morfologicky nerozlišitelné nebo mohou být identifikovatelné pouze na úrovni třídy nebo rodu.

5.7. On-line detekce na základě laserem / světlem indukované fluorescence (LIF)

Detekce a identifikace bioaerosolů v reálném čase (on-line) jsou nezbytné v lékařských a zemědělských oblastech, stejně jako ve vysoce rizikových situacích. Oproti běžným metodám, měření v reálném čase má mnoho výhod, mezi které patří rychlá detekce vzorků (v řádu sekund), zkrácení pracovní doby a větší analytická frekvence v důsledku možnosti nepřetržitého monitorování (Kanaani a kol, 2008). Byla vyrobena celá řada "on-line" nástrojů založených na laserem / světlem indukované fluorescence (LIF- laser/light induced fluorescence) (Healy a kol, 2012). Základním principem těchto on-line detektorů je měření fluorescence specifických organických molekul biologického původu (Healy a kol, 2012). Vlnové délky excitace a emise byly původně zvoleny pro detekci biologických fluoroforů, které jsou přítomné ve vzdušných mikroorganismech (např. proteiny obsahující tryptofan, koenzymy NAD(P)H nebo riboflavin) (Savage a kol, 2017). Dva nejčastěji používané nástroje jsou: Ultrafialový aerodynamický třídič částic podle velikosti (UV-APS -UltraViolet-Aerodynamic Particle Sizer); Širokopásmový integrovaný bioaerosolový senzor (WIBS - Wideband Integrated Bioaerosol Sensor Droplet measurement Technologies) (Fernandez-Rodríguez a kol, 2018).

UVAPS slouží k velikostní distribuci částic s aerodynamickým průměrem $0,5 - 15 \mu\text{m}$ v reálném čase. Detekce fluorescence se provádí pomocí excitujících částic pomocí UV laserového paprsku při vlnové délce 355 nm a detekované emisí při 420-575 nm (Kanaani a kol, 2008).

Wideband Integrated Bioaerosol Sensor model č. 4 (WIBS-4), je nejnovější verzí série nedávno vyvinutých nástrojů pro měření biologických částic v reálném čase (Stanley a kol,2011). Přístroj byl původně navržen k detekci bioaerosolů v reálném čase za využití on-line detekce jejich auto fluorescence a současného poskytování informace o koncentraci, velikosti a tvaru částic (asymetrie) založeného na prostorovém rozptylu světla (Kaye a kol,2008). Tento přístroj využívá xenonové UV zdroje pro excitaci fluorescenci jednotlivých částic. Na rozdíl od UV laserů, xenonové UV lasery umožňují přesnou selekci konkrétních UV vlnových pásem. Daná vlnová pásma byly určeny pro optimalizaci detekci běžných bioaerosolu (tryptofanu a NADH).

6. Praktická část

6.1. Lokality

6.1.1. Praha

Odběr vzorků vzduchu probíhal v Botanické záhradě Katedry botaniky a Ústavu pro životní prostředí Přírodovědecké fakulty UK. Vysokoobjemový kaskádní impaktor byl umístěn na střeše ve výšce 25 m nad terénem. V dané lokalitě se nacházejí vzácnější druhy rostlin. Místo odběru je v centru města, a proto vzorky z této lokality reprezentují městský aerosol. Na této lokalitě nebyly objeveny žádné vzácné druhy spor hub.

6.1.2. Březno

Obec Březno leží v Podkrušnohoří a nachází se v okrese Chomutov v Ústeckém kraji. Počet obyvatel podle statistických údajů je přibližně 1 300 osob. Jihozápadně od obce se nachází přírodní rezervace Běšický a Čachovický vrch. Vysokoobjemový impaktor byl situovan nedaleko školy ve výšce 4 m. Z tohoto důvodu předpokládáme, že zdroje spor hub mají městský původ. V důsledku resuspenzí silničního prachu a půdy ve vzorcích bylo identifikováno hodně polétavého prachu.

6.1.3. Láz

Vodní nádrž Láz se nachází ve vzdálenosti cca 1 km západně od obce Láz v lesnatém údolí v Brdech. Je to velmi vlhké údolí, nad nádrží se vyskytují rozsáhlé mokřady a rašeliniště. Povodí nádrže je zalesněno, což vede k tomu, že voda je kyselá, hnědá s příměsí huminových látek, málo úživná, téměř bez ryb (<http://www.pvl.cz/files/download/vodohospodarske-informace/vodni-dila-a-nadrze/laz.pdf>).

Území je ostrovem chladného a vlhkého klimatu horského charakteru, do jehož nižších okrajových poloh zasahují výběžky klimatu teplejšího a suššího. V Brdech existuje řada fenoménů vztahující se pouze na horské oblasti. Pro Brdy typické mísení vegetačních druhů mezofytika (středních) a oreofytika (horských). V Brdech jsou charakteristickými skupinami druhů alpské migranty (*Soldanella montana*, *Chrysosplenium oppositifolium*).

(<http://brdy.ochranaprirody.cz/charakteristika-oblasti/vegetace-brd-vyznacne-biotopy-a-druhy/>).

Impaktor byl umístěn ve výšce 4 m na střeše stanice na hrázi vodní nádrže Láz, která slouží jako zásobárna pitné vody.

Díky velkým a rozsáhlým lesním porostům v této lokalitě by se dal očekávat nejvyšší výskyt spor hub. Dalším důležitým faktorem, který způsobil vysokou početnost spor hub, je období odběru vzorků (24.08 – 1.09). V tomto období se s velkou pravděpodobností mohou vyskytovat pylová zrna zejména bylin a plevelů.

6.2. Vysokoobjemový kaskádní impaktor (Hi-Vol)

K odběru vzorků bioaerosolu byl použit vysokoobjemový kaskádní impaktor o pěti stupních Hi-Vol BGI 900 USA, s objemovým průtokem 900 LPM. Díky podtlaku na pumpě vzduch proudí impaktorem přes kaskádu trysek, které se postupně zmenšují a zužují. Na jednotlivé velikostní stupně se aerosolové částice zachytávají v polyuretanové pěně (Polyurethane Foam- PUF) dle aerodynamického průměru - d_{ae} na frakce A ($d_{ae} > 10 \mu\text{m}$), B ($1 < d_{ae} < 10 \mu\text{m}$), C ($0,5 < d_{ae} < 1 \mu\text{m}$), D ($0,17 < d_{ae} < 0,5 \mu\text{m}$), E ($d_{ae} < 0,17 \mu\text{m}$). PUF substrat je chemický inertní a jeho struktura obsahuje póry. Částice aerosolu se na PUF účinně zachytávají mechanismem impakce a filtrace (Kavouras a kol, 2000). Před začátkem odběru vzorků se PUF čistil třístupňovou extrakcí. Dále byl sušen po dobu několika dní v čistém boxu a následně zabalen a uchován v mrazničce při teplotě $-22 \text{ }^\circ\text{C}$. Rozměry trysek 1. stupně jsou $10,99 \times 0,759 \text{ cm}$. Při celkovém průtoku impaktorem 900 l/min je rychlost průtoku vzduchu tryskami 1. stupně 600 cms^{-1} a pokles tlaku 0.25 kPa (Demokritou a kol, 2002). V porovnání s jinými impaktory používanými pro odběr

vzorků bioaerosolu je rychlost průtoku vzduchu nižší. Z tohoto důvodu můžeme předpokládat malou míru poškození částic bioaerosolu způsobenou přístrojem.

V našem případě byla doba odběru vzorků zejména 2 dny a celkový objem prosátého vzduchu byl kolem 2500 m³ (TAB.1). V této práci jsou analyzovány vzorky frakce A a jeden frakce B.

Tabulka. 1 GPS lokalit; čas začátku odběru; čas ukončení odběru; doba odběru; objem prosátého vzduchu; navažka aerosolu.

Lokalita GPS	Číslo vzorků	Začátek odběru (datum a čas)	Konec odběru (datum a čas)	Doba odběru (min.)	Objem prosátého vzduchu (m ³)	Navážka aerosolu (mg)
Praha 50°4'16.638"N, 14°25'15.305"E	18A	9.3.15 18:50	10.3.15 14:33	1183	1065	*
	19A+ B	20.2.15 17:10 + 25.2.15 15:15	23.2.15 11:11 + 27.2.15 9:46	6512	5861 (3565 + 2296)	*
	20A	27.2.15 17:34	9.3.15 18:08	14 434	12 991	*
	29A	5.6.09 12:16	7.6.09 10:23	2767,0	2490,3	11,3
	31A	9.6.09 11:10	11.6.09 10:55	2865,0	2578,5	10,7
	32A	11.6.09 11:35	13.6.09 10:30	2815,0	2533,5	7,4
	33A	13.6.09 11:07	15.6.09 11:30	2903,0	2612,7	12,6
Březno 50°24'0.545"N, 13°25'19.909"E	38A	7.8.09 13:25	9.8.09 10:58	2733,0	2459,7	32,8
	39A	9.8.09 11:45	11.8.09 10:12	2787,0	2508,3	37,1
	40A	11.8.09 10:58	13.8.09 9:40	2802,0	2521,8	16,1
	42A	15.8.09 10:03	17.8.09 9:30	2847,0	2562,3	31,0
Láz 49°39'35.206"N, 13°53'43.743"E	45A	24.8.09 11:55	26.8.09 10:55	2820,0	2598,0	n.a.
	46A	26.8.09 11:25	28.8.09 10:40	2835,0	2551,5	<0
	47A	28.8.09 11:06	30.8.09 10:00	2814,0	2532,6	<0
	48A	30.8.09 10:30	1.9.09 10:32	2882,0	2593,8	9,7

*Navážka aerosolu (mg) : substráty nebyly váženy po expozici z důvodu případné ztráty těkavých látek při ekvilibraci na 50% vlhkost před vážením – vzorky byly dány rovnou do mrazáku.

6.3. Příprava vzorku bioaerosolu pro analýzu

Vzorky z impakčního substratu PUF byly extrahované do deionizované vody s ethanolem v ultrazvukové lázni. Vzniklá suspenze pomocí filtračního zařízení byla převedená na filtr, který dál byl vysoušen a aplikován na hliníkový podložní terčík. Pak následovala analýza pomocí skenovacího elektronového mikroskopu.

6.3.1. Separace aerosolu od PUF

Pro sterilní práci se vzorky, byl využit čistý box s laminárním prouděním Holten LaminAir HB2436. Aby se nedostaly různé nečistoty do pracovního prostoru, bylo nezbytné pracovat v jednorázových rukavicích. Jeden vzorek byl obsažen ve třech páskách substrátu PUF. U vzorků byly extrahované tři PUF pásy na jeden filtr dohromady.

Pro manipulaci se vzorky byla použita pinzeta. Každou pásku jsme rozřízli do menších částic cca 1 cm² pro usnadnění izolace a zmenšení celkového objemu PUF substrátu. Dále byly tyto částice převedeny do 150 ml kádinky. Pro zlepšení extrakce na PUF jsme přidali několik kapek ethanolu. Ethanol nemá žádný škodlivý účinek pro bioaerosol. Pak do kádinky byla přidána deionizovaná voda na objem cca 100ml, aby se PUF pásy nacházely pod hladinou. V dalším kroku jsme kádinku umístili do ultrazvukové lázně Micro Ultrasonic Cleaner CT-400 po dobu tří minut při maximálním výkonu 60 W. Následně suspenzi vylily do filtračního zařízení Thermo Scientific™ Nalgene™. Separace byla provedena ještě jednou. V posledním kroku PUF byl odstraněn z kádinky pomocí pinzety a kopistky.

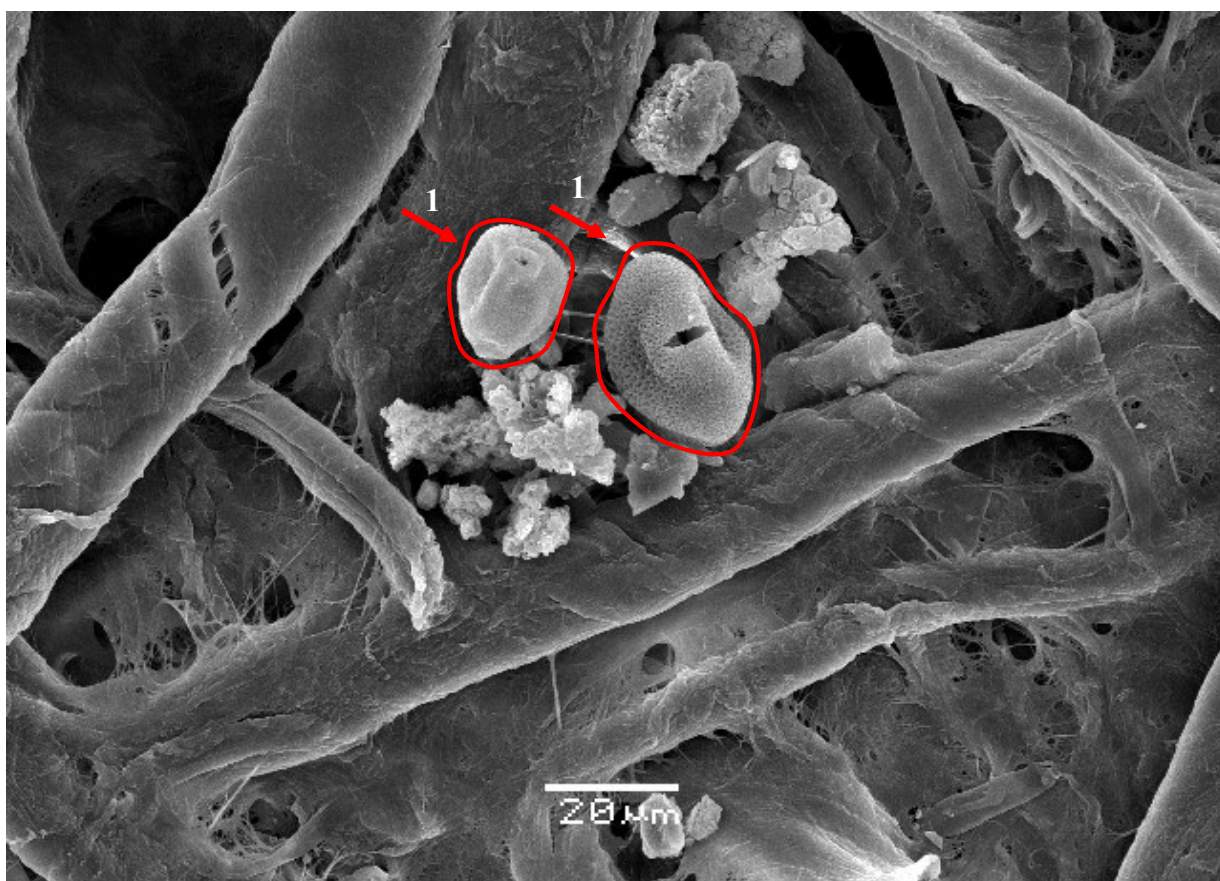
6.3.2. Filtrace

K filtraci byla použita aparatura NALGENE. Nejdříve byla nádobka filtračního zařízení (stěny a podložka) smočena deionizovanou vodou. Následně byl vložen filtr, který byl stejně smočen. Nádobka filtračního zařízení se zafixovala a na spodní část nádoby, která kumuluje

přefiltrovanou vodu, byla nasazena ucpávka. Dále byl roztok se vzorkem přelit do filtrační nádoby Heto SUE 300Q.

První vzorek č. 29A byl přefiltrován na papírový filtr Whatman (d=42, 5 mm). Ale během SEM analýzy bylo zjištěno, že tento druh filtru není vhodný pro analýzu bioaerosolu, protože došlo k překryvu částic bioaerosolu samotným filtrem. To bylo způsobeno strukturou papírového filtru.

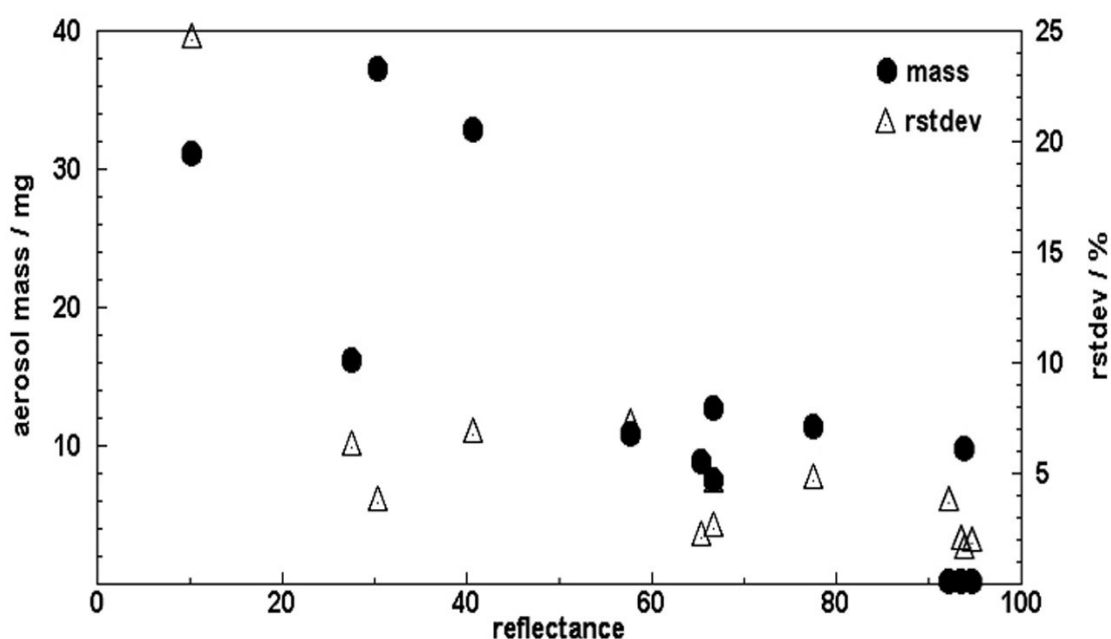
Další vzorky se filtrovaly přes nylonový filtr Cronus Membrane Filter Nylon (d=47 mm, rozměr pórů 0,45 μm). Po ukončení procesu filtrace, filtr byl pečlivě přemístěn pinzetou na víčko přenosné plastové Petriho misky s průměrem 47 mm, která byla předem popsána příslušným číslem vzorku. Filtry se sušily v čistém boxu po dobu minimálně jedné hodiny. Po vysušení se vzorky uschovaly do Petriho misek, dále do ZIP sáčků a byly následně zabaleny do alobalové folie a popsány.



Obr. 4 SEM snímek: papírový filtr Watman s obsahem minerálních a organických částic, pyl (1).
Vzorek 33A, lokalita Praha, doba odběru 13.06.09 - 15.06.09.

6.3.3. Testování homogenity depozitu na filtru

K vyhodnocení homogenity depozice na nylonových filtrech bylo provedeno měření odrazivosti na 10 různých místech pro každý filtr a byla vypočtena průměrná odrazivost a příslušná relativní směrodatná odchylka - rstdev. Zatímco průměrná odrazivost se snižovala s hmotností aerosolu, jak se dá očekávat, relativní směrodatná odchylka se mírně pohybovala kolem 5% pro hodnoty odrazivosti >15, kdy se skokem zvyšuje na 25%. Nežádoucí nárůst nehomogenity lze předejít použitím dvou nylonových filtrů pro jeden vzorek, což snižuje zatížení filtru (Kolpakova a kol, 2017).



Obr. 5 Hmotnost aerosolu a relativní standardní odchylky měření odrazivosti versus odrazivost depozitu na nylonovém filtru po separaci aerosolu od PUF substrátu prvního stupně HiVol impaktoru.

(Kolpakova a kol, 2017).

6.3.4. Analýza vzorků pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM)

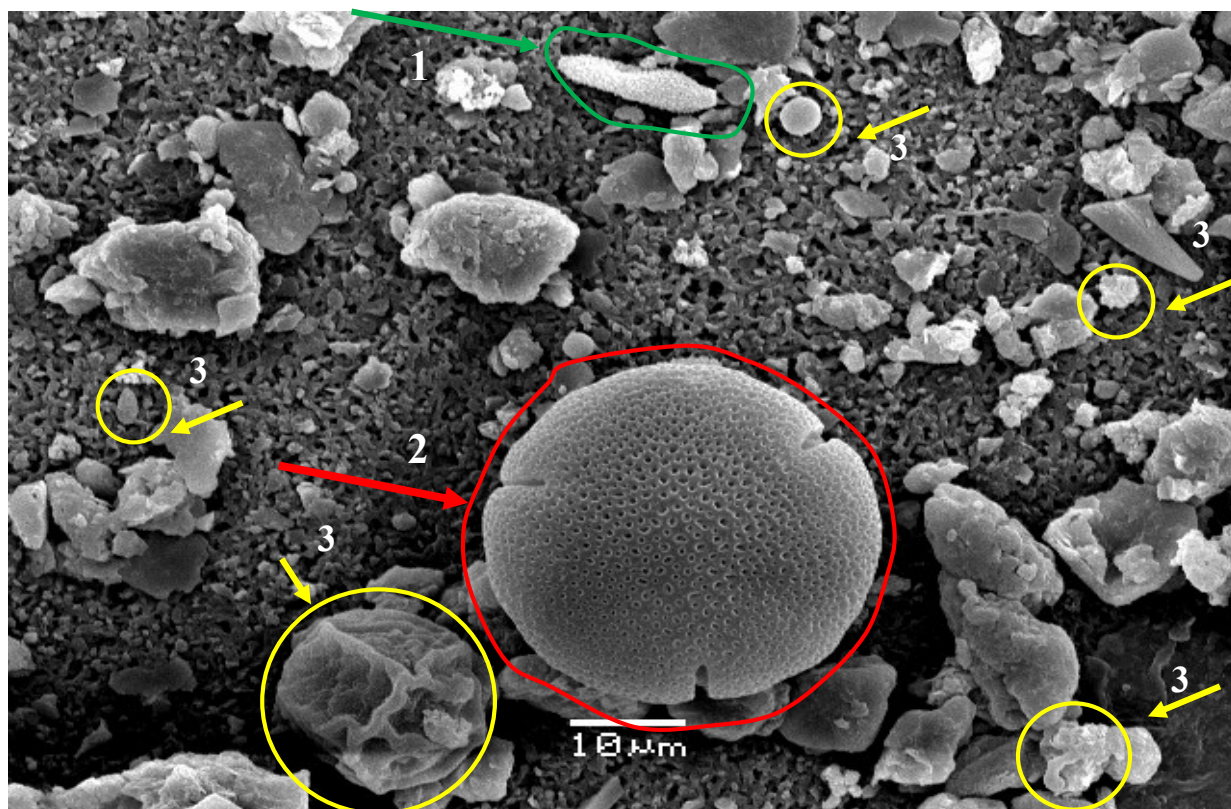
Nejprve byl připraven hliníkový podložní terčik. Aby se zabránilo přenosu mastnoty byla práce prováděna v rukavicích bez prášku. Podložní terčik slouží pro odstranění náboje a tepla. Z předem připraveného filtru se vystříhla reprezentativní část (1x2 cm). S filtrem bylo nutné manipulovat opatrně, aby nedošlo k rozprašování bioaerosolu. Vystříhnutá část byla přenesena na proužky oboustranné uhlíkové lepicí pásky, které byly nalepené na podložní terčik. Dále byl hliníkový

terčik pokovován vrstvou zlata 1 nm ve vakuovém naprašovacím zařízení BAL-TEC SCD 050 při teplotě 23 °C po dobu 5 min. Pozlacený vzorek byl pinzetou vložen do skenovacího elektronového mikroskopu JEOL JSM-6380LV. Práci s počítačovým programem SEM Control User Interface byla provedena některá vylepšení jako např. regulace kontrastu a jasu, zrnitosti obrázku nebo změna tzv. spot size. Po každé půlhodině používání mikroskopu nebo po výměně vzorku bylo nutné doostřit obraz na nejsilnějším zvětšení x 300000.

7. Výsledky a diskuze

7.1. Homogenita rozložení depozitu na filtru

Filtrační zařízení Thermo Scientific™ Nalgene™ poskytuje homogenní rozložení depozitu na filtru. Nedochází k překrytí částic bioaerosolu, což usnadňuje identifikace a kvantifikace spor hub. Během SEM analýzy při zvětšení do x 1000 nebylo možné identifikovat částice bioaerosolu, ale lze pozorovat velké části vegetace a hrubý neorganický aerosol. Zvětšení x 2000 se používá pro identifikaci většiny pylu (Gretchen, 2012), ale pro identifikace spor hub je vhodnější x 3000 – 6000 zvětšení (Heikkilä a kol, 1988).



Obr.6 SEM snímek: spora rodu *Cladosporium* (1), pyl rodu *Tilia* (2) a neidentifikovaný bioaerosol (3). Vzorek 33A lokalita Praha, doba odběru 13.06.09 - 15.06.09.

7.2. Kvalitativní a kvantitativní analýza spor hub

Pro kvantitativní analýzu spor hub bylo spočítáno množství spor hub na 10 snímcích se stejnou plochou pro každý vzorek. Počet spor se přepočítal na celkovou plochu filtru a koncentrace spor hub byla vypočítána z celkového objemu vzduchu prosátého impaktorem. Výpočet koncentrace spor hub byl proveden podle následujících vzorců:

1. Plocha filtru (μm^2):

$$P = \pi * d^2 * 0,25;$$

Kde d (průměr filtrační plochy po odečtení 5 mm, které zaujímá filtrační zařízení k fixaci) = 37mm

$$P = 3,14 * 37000 * 37000 * 0,25 = 1074665000 \mu\text{m}^2$$

2. Celkový počet spor hub v celém vzorku :

1074665000 / plocha snímku * počet spor hub na snímcích

3. Koncentrace spor hub (počet spor * m^{-3}):

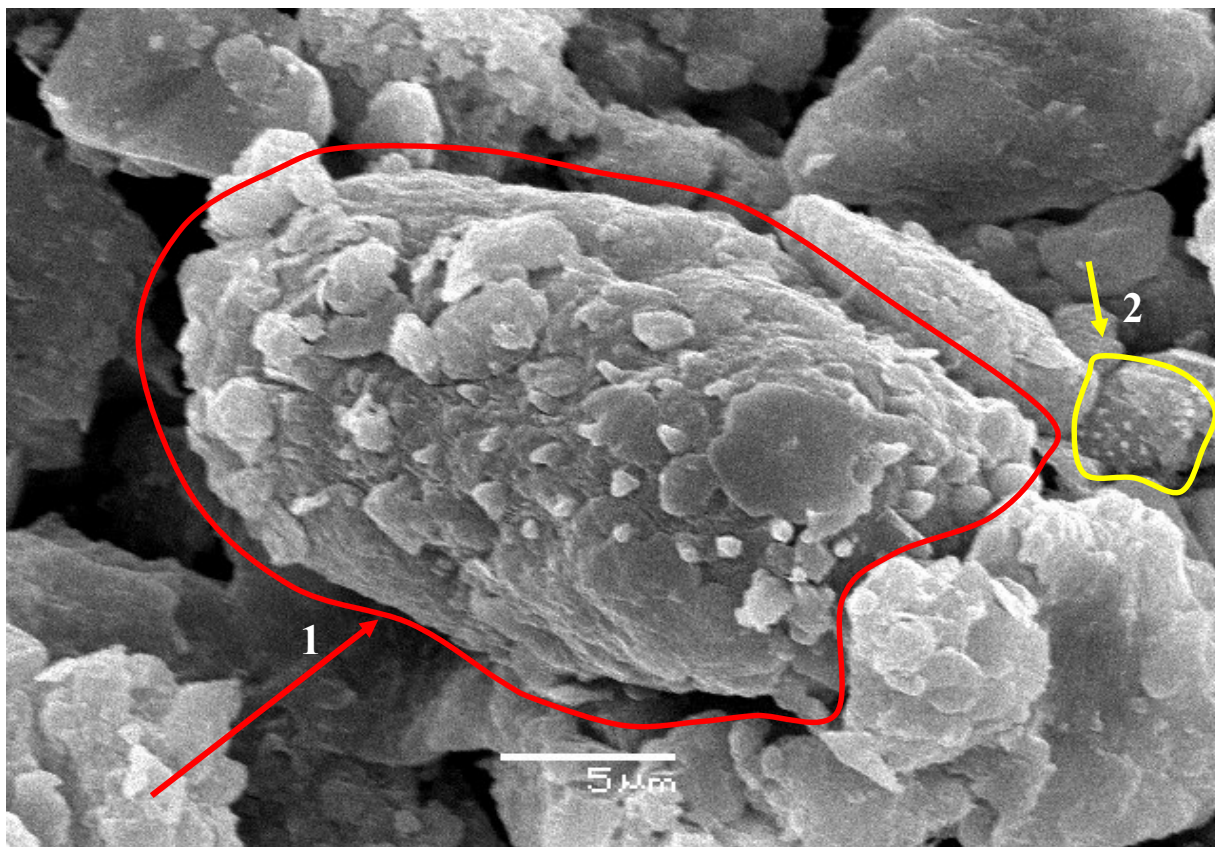
Celkový počet spor hub v celém vzorku / objem prosátého vzduchu (m^3)

V tabulkách č.2,3,4 jsou uvedeny jen přibližné odhady koncentrace spor hub, protože to není přesná kvantifikace. PUF není vhodný pro kvantitativní odběr nanočástic rozptýlených ve vzduchu kvůli jeho relativně velkým pórům (Kavouras a kol, 2001), ale má minimální ztráty při odrazu částic a má vysokou účinnost sběru (Sharma a kol, 2015). Výsledky koncentrace spor se shodují s uvedenými hodnotami koncentrace v jiných pracích.

Kvalitativní analýza vzorků spor a pylu se obvykle provádí s odkazem na již připravené podložní sklíčko obsahující známé druhy nebo z fotografií stejného druhu (Cox a kol, 1995). Spory hub byly identifikovány na základě následujících klíčů: “An atlas of airborne pollen grains and common spores of Canada”, Bassett, I.John, 1978; “Atlas zur Bestimmung rezenter und fossiler Pollen und Sporen”, F.Jonas, 1952; “Atlas of Airborne Fungal Spores in Europe”, S.T.Nilsson, A Käärik, 1983; “Die Myxomyceten: Deutschlands und des angrenzenden Alpenraumes unter besonderer Berücksichtigung Österreichs.“ Band 1 (Ceratiomyxales Echinosteliales Liceales Trichiales, 1993), Band 2 (Physarales, 1995), Band 3 (Stemonitales, 2000), Hermann Neubert, Wolfgang Nowotny, Karlheinz Baumann .

Pro 15 vzorků bylo celkem vytvořeno 605 snímků filtrů obsahujících bioaerosol. Na 340 snímcích byly identifikovány spory hub. Na dalších snímcích byly pozorovány pyl, brochosomy.

Mimo jiné vzorky obsahovaly zbytky rostlin a anorganické aerosolové částice (Obr.7), které byly často navázány na spory hub a tím komplikovaly proces jejich určování.



Obr.7 SEM snímek: spora houby s navazujícími anorganickými částicemi (1) a neidentifikovaná spora (2). Vzorek 40A, lokalita Březno, doba odběru 11.8.09 – 13.8.09.

7.2.1. Praha

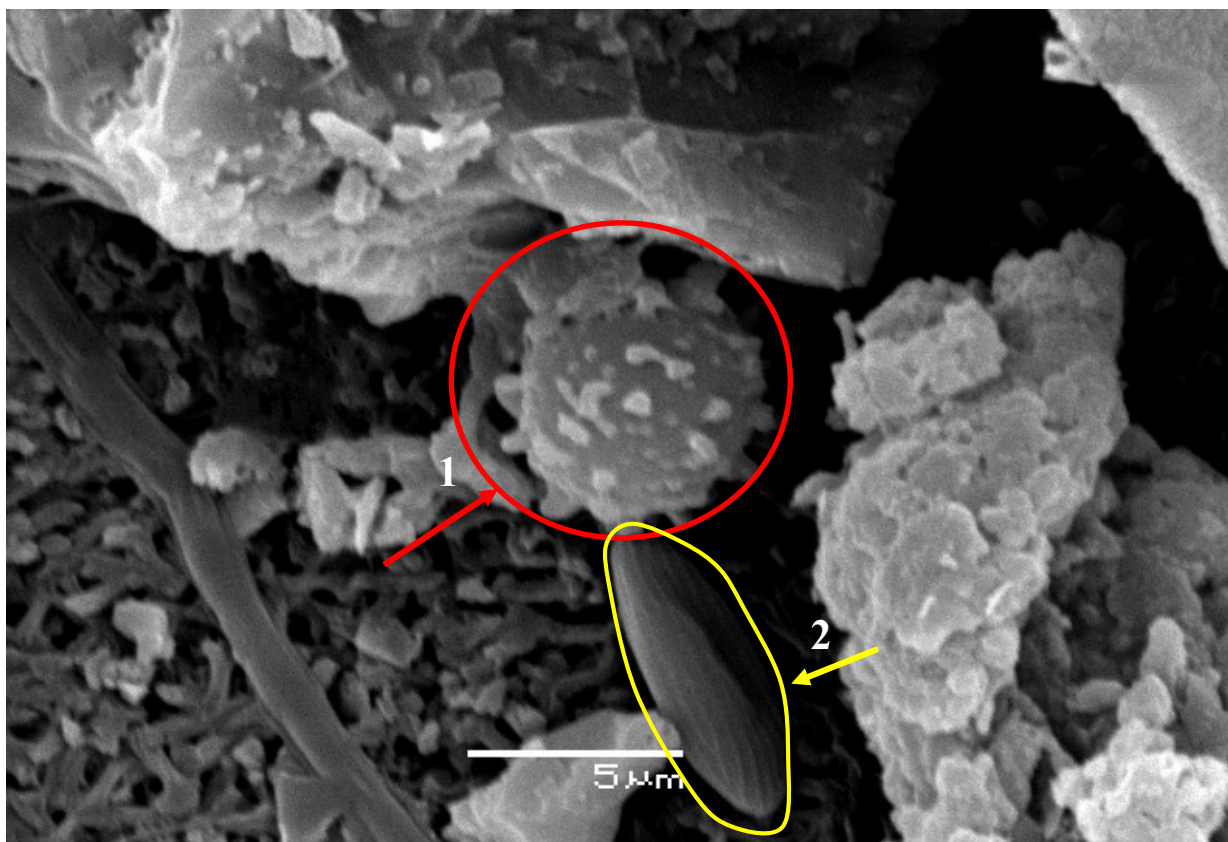
Tabulka 2. Počet a koncentrace spor hub na lokalitě Praha.

Číslo vzorku	Počet spor hub		Celková plocha snímků (μm ²)	Celkový počet spor hub v celém vzorku	Koncentrace spor hub (počet spor *m ⁻³)	Objem prosatého vzduchu (m ³)
	Ident.	Neident.				
29A	20	99	52940	2456261	986	2490,3
31A	15	105	52940	2435961	948	2578,5
32A	22	107	52940	2598359	1025	2533,5

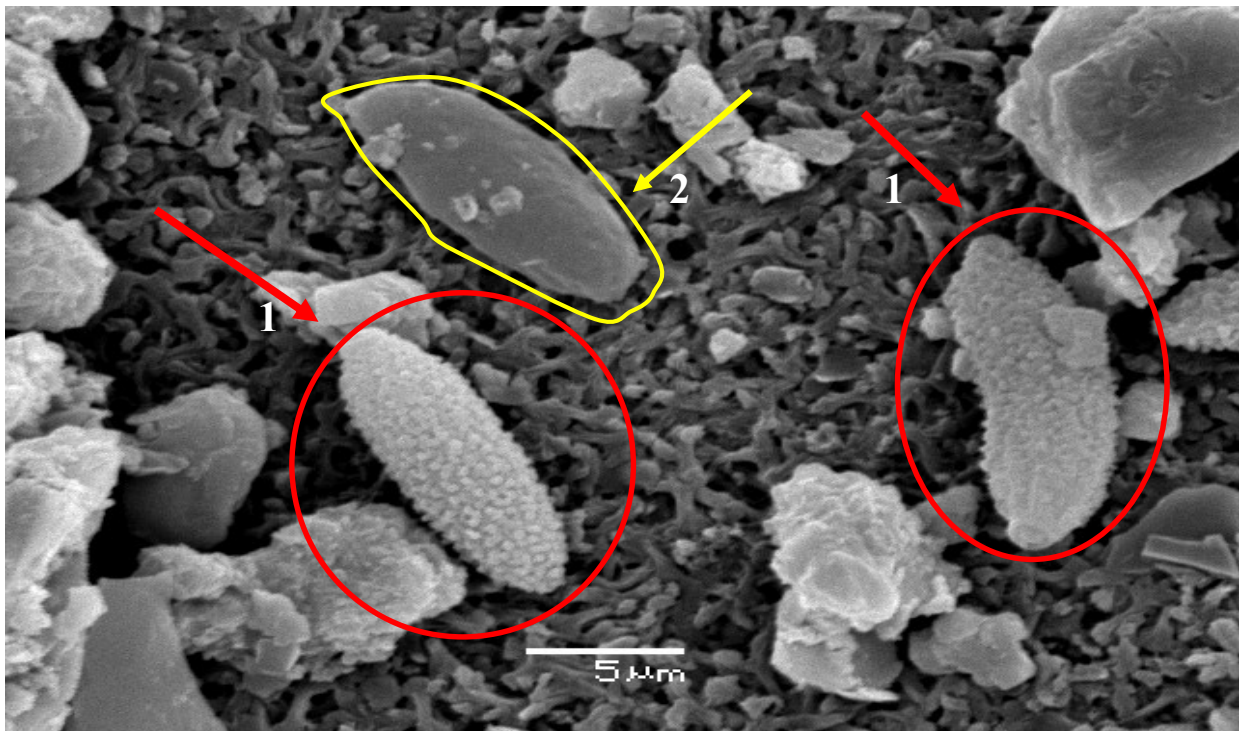
33A	14	110	52940	2517160	967	2612,7
-----	----	-----	-------	---------	-----	--------

V Praze vzorky byly odebrány od 5.6.09 do 15.6.09. V tomto období podle NCDC (National Centers for Environmental Information) v Praze skoro nepršelo a průměrné denní teploty se pohybovaly od 14,7 °C v noci až do 24,4 °C během dne. Vlhkost vzduchu byla od 64% do 89%. Kvůli dosti nízkým teplotám a dalším klimatickým podmínkám bylo pozorováno malé množství spor hub a jejich částí. Tento fakt je také pravděpodobně spojen se suchem. Dalším faktorem, který mohl způsobit nízkou koncentraci spor hub, je výška umístění impaktoru (25 m). Tak podle Khattab a kol, 2008 některé spory hub působící jako aeroalergeny měly vyšší koncentraci v přízemní úrovni než ostatní spory hub, což naznačuje, že vzorkovací výška je jednou z mnoha proměnných, které ovlivňují hladiny bioaerosolu.

V této lokalitě byly identifikovány spory hub rodů *Calvatia*, což jsou saprogenní houby, které podle mushroomexpert.com obvykle rostou v parcích a vyskytují se v létě a na podzim. Dalším identifikovaným rodem parazitických hub byl rod *Cladosporium*. Také byly nalezeny spory rodů *Puccinia* a *Ustilago*. Spory hub těchto dvou rodů bylo těžce určit do druhu z důvodu velké podobnosti jejich tvaru a ornamentací.



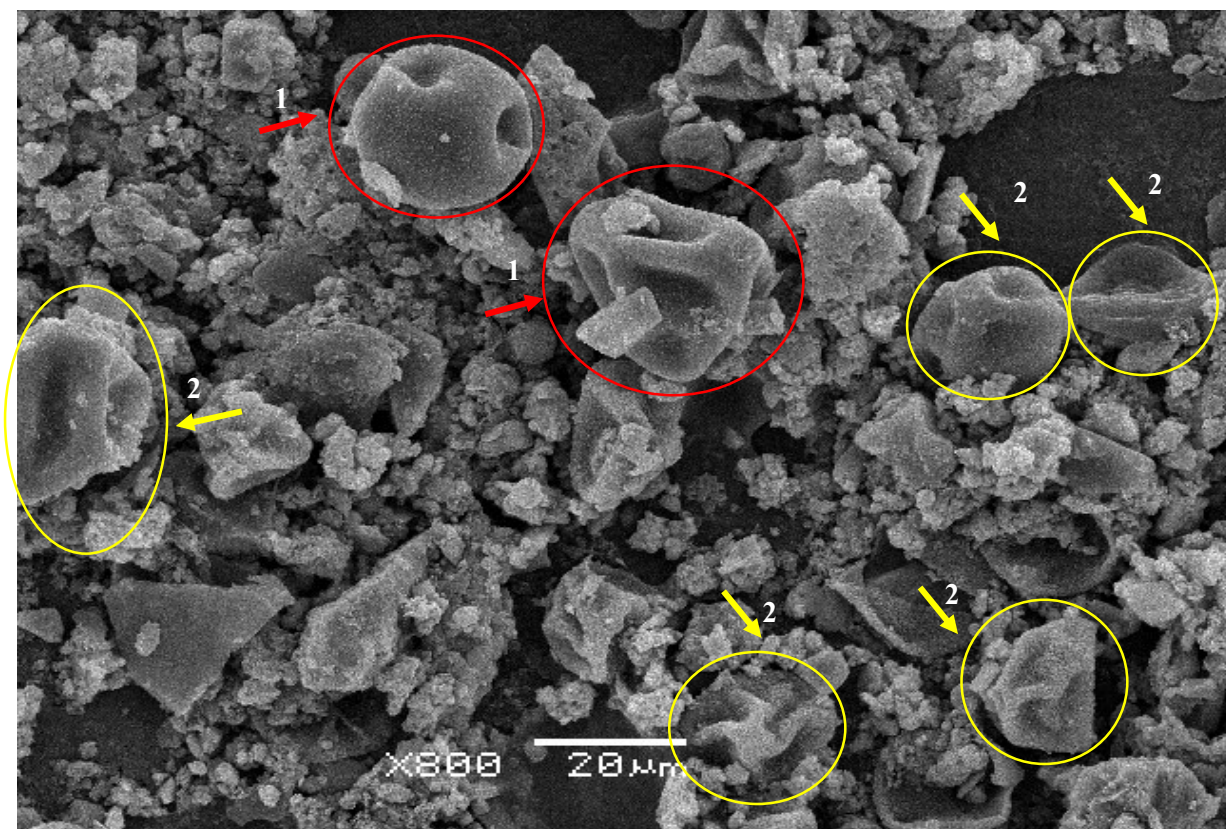
Obr.8 SEM snímek: spora rodu *Calvatia* (1) a neidentifikovaná spora (2). Vzorek 32A, lokalita Praha, doba odběru 11.6.09 – 13.6.09.



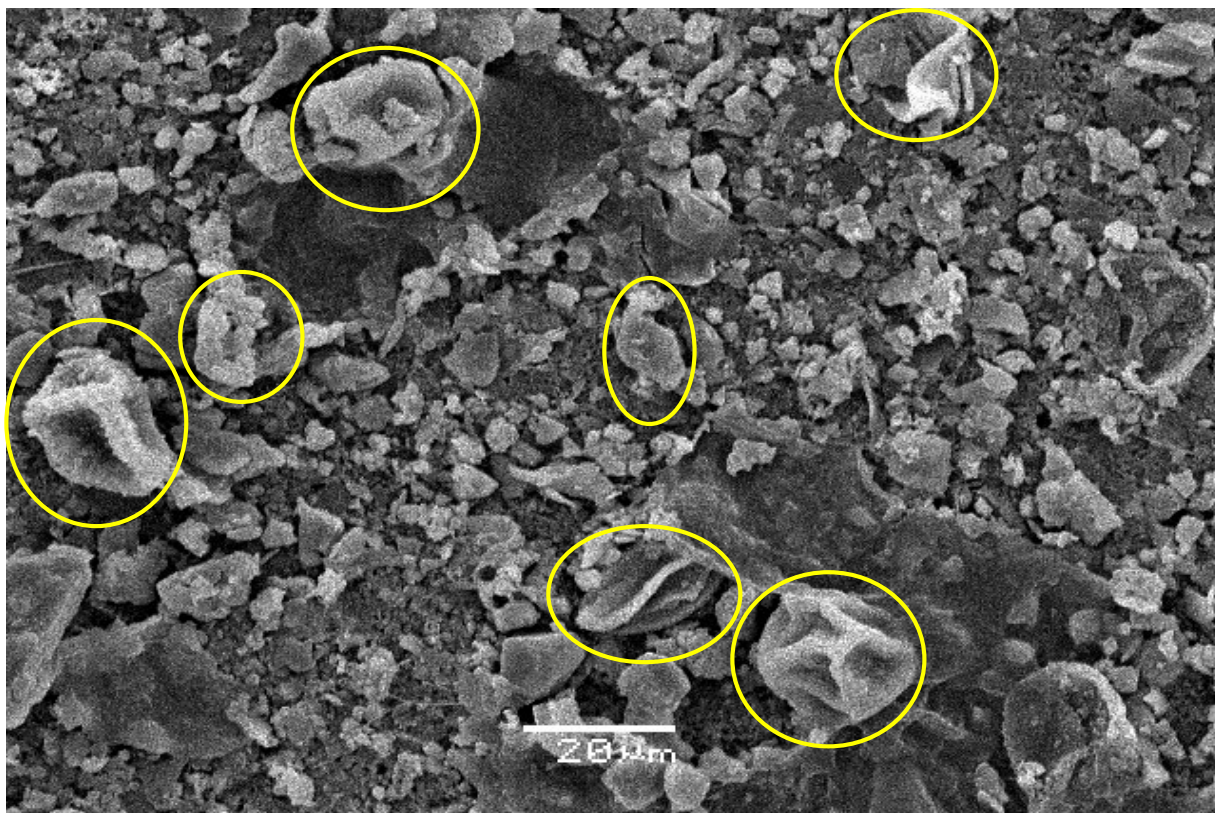
Obr.9 SEM snímek: spora rodu *Cladosporium* (1) a neidentifikovaná spora (2). Vzorek 32A, lokalita Praha, doba odběru 11.6.09 – 13.6.09.

7.2.1.1. Srovnávací kvalitativní analýza vzorků 18A, 20A a analýza vzorku 19A+B

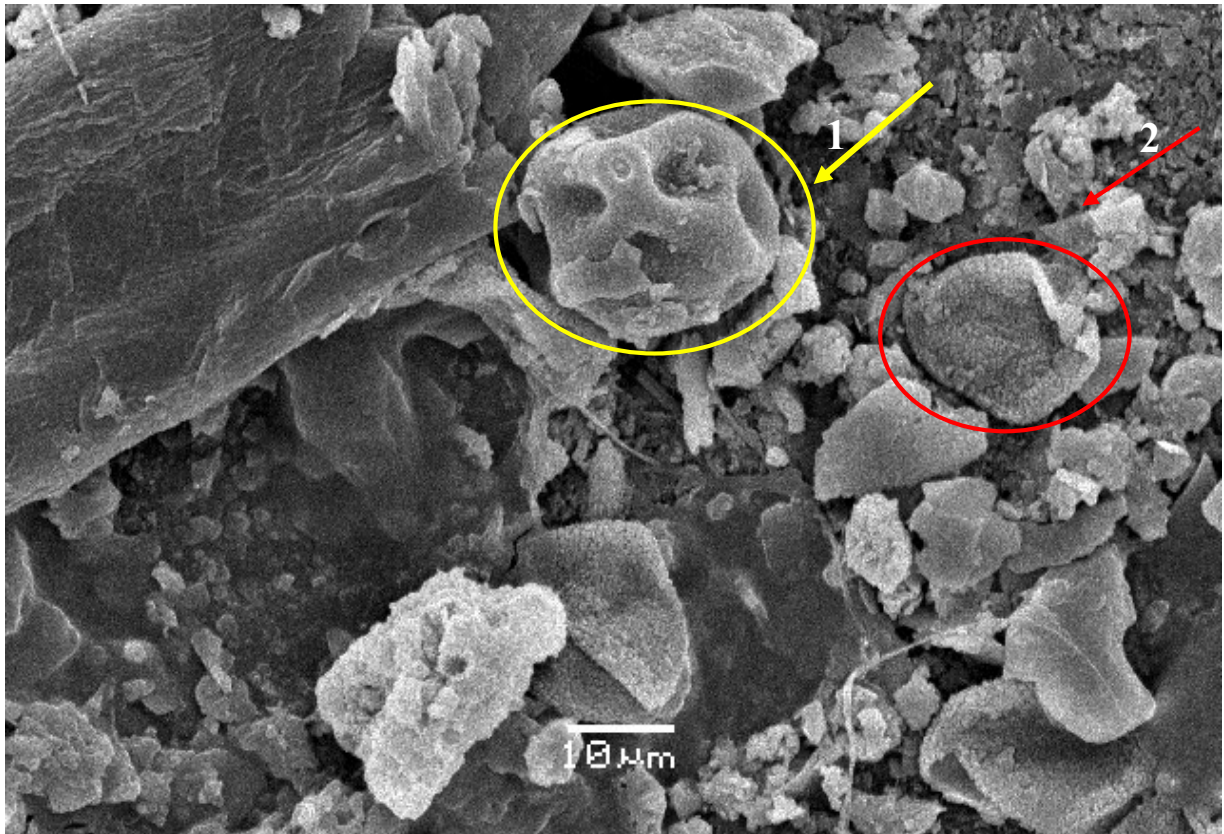
V článku S.Marvanové a kol, 2018 byla detailně popsána SEM analýza nižších pater B, C, D, E vzorků 18 a 20, pro které příprava pro následující SEM analýzu byla provedena stejným způsobem, který byl popsán v kapitole č.6.3. V závěru uvádí, že frakce B byla převážně tvořena skalnatými minerály mezi něž patřily křemen, kalcit a biotit, zatímco frakce C většinou obsahovala krystaly síranu vápenatého a K – aluminosilikát. Ve frakci D byly nalezeny uhlíkaté částice se stopovým množstvím N a S. Frakce E byla tvořena anorganickými solemi Ca a K. Provedli jsme srovnávací analýzu A-patra vzorků 18 a 20. Vzorky 18 a 20 byly odebrány od konce února do začátku března v Praze. V těchto vzorcích bylo pozorováno velké množství aerosolových částic, které podle tvaru a struktury byly identifikovány jako bioaerosol. Některé bioaerosolové částice jsou s největší pravděpodobností pyl, protože na sobě mají specifické struktury charakteristické pro pyl např. póry a ostny. Skulptura exiny (vnějšího obalu) má také velký význam pro identifikaci pylu. Ale kvůli velké zrnitosti SEM snímků se je nepodařilo přesněji klasifikovat. Mimo jiné proces identifikace byl ztížen deformacemi, které podle Iwanami a kol. 1988 mohou být důsledkem dehydratace anebo mohly vzniknout v průběhu manipulace se vzorky.



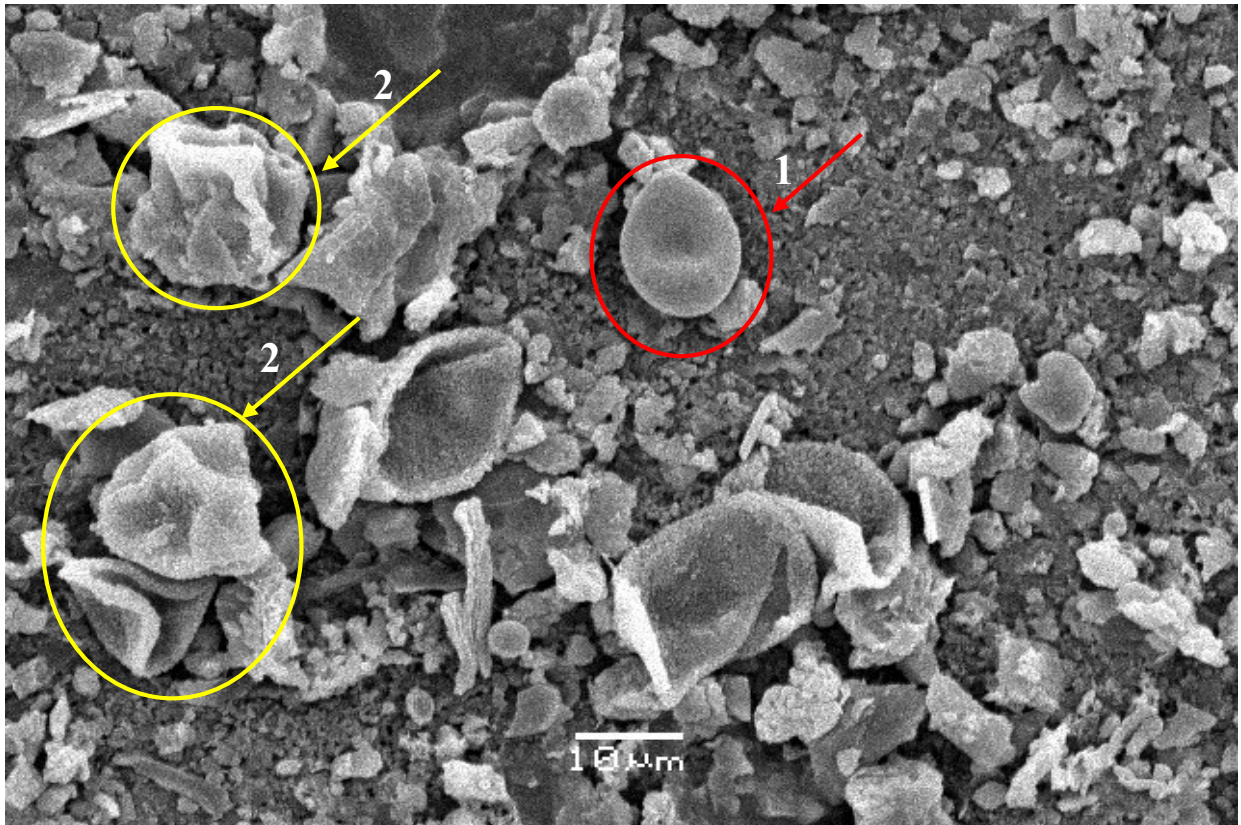
Obr.10 SEM snímek: neidentifikovaný pyl (1) a neidentifikovaný bioaerosol (2). Vzorek 18A, lokalita Praha, doba odběru 09.3.15 – 10.3.15.



Obr.11 SEM snímek: neidentifikovaný bioaerosol. Vzorek 18A, lokalita Praha, doba odběru 9.3.15 – 10.3.15.

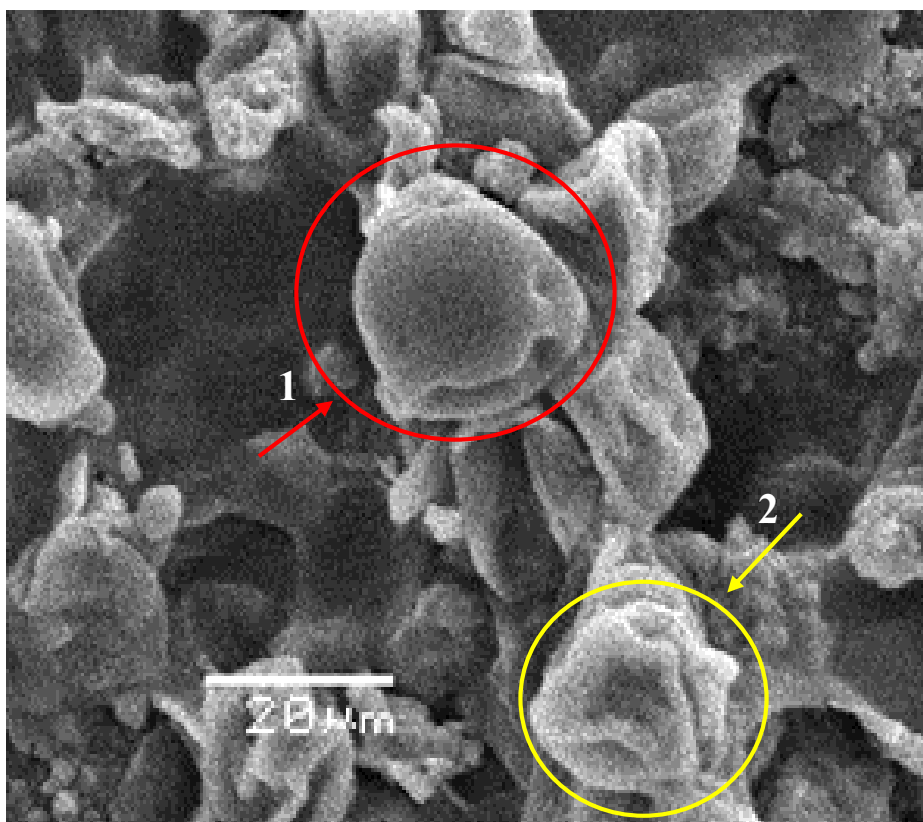


Obr.12 SEM snímek: neidentifikovaný pyl (1) a neidentifikovaný bioaerosol (2). Vzorek 18A, lokalita Praha, doba odběru 9.3.15 – 10.3.15.



Obr.13 SEM snímek: neidentifikovaná spora houby (1) a neidentifikovaný bioaerosol (2). Vzorek 18A, lokalita Praha, doba odběru 9.3.15 – 10.3.15.

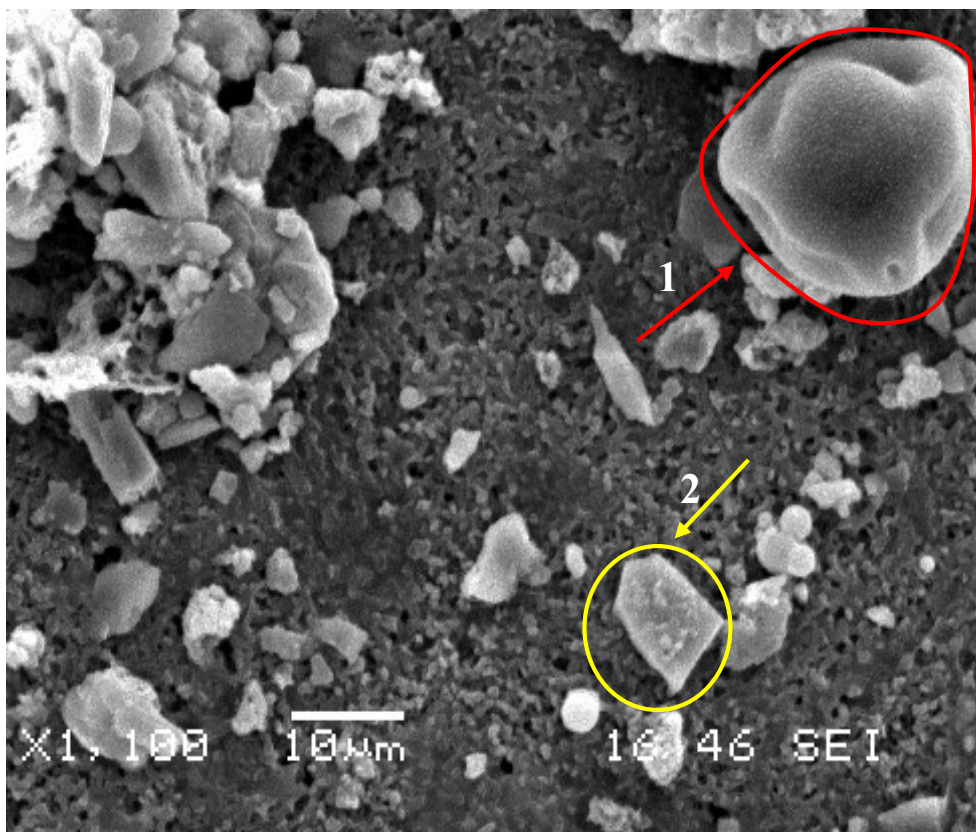
Ve vzorku 20A se podařilo identifikovat pyl rodu *Corylus*, který je často příčinou alergií v pozdní zimě nebo brzy na jaře (Hubert, 1974). Lze jej identifikovat při zvětšení (x 600) díky charakteristickým exinám, které nesou tři nápadné póry.



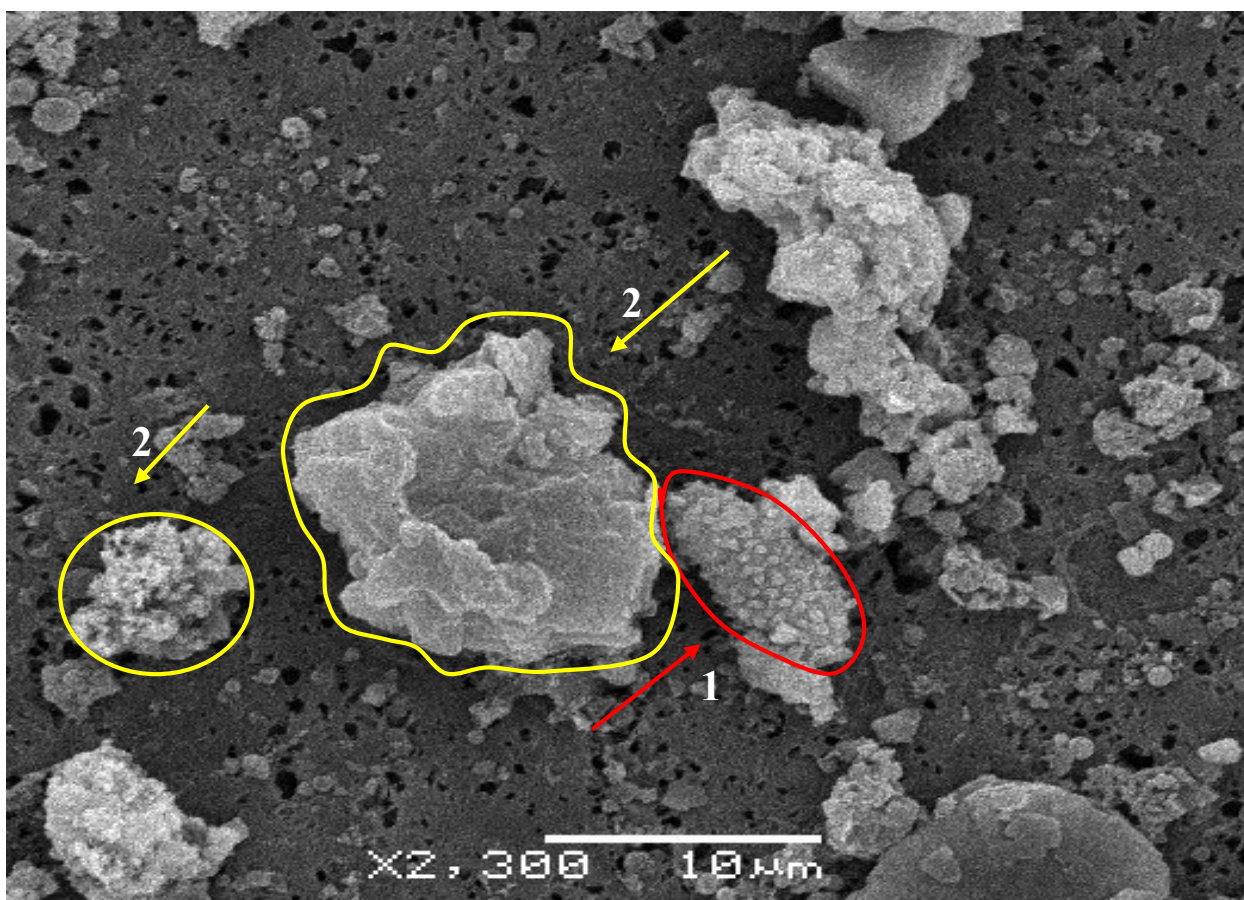
Obr.14 SEM
snímek: pyl rodu
Corylus (1) a
neidentifikovaný
bioaerosol (2).
Vzorek 20A,
lokalita Praha,
doba odběru
27.2.15 – 9.3.15.

Z výše uvedeného plyne, že A frakce všech vzorků a B frakce vzorku 19 bioaerosol obsahovaly. Ale v B frakce bylo pozorováno srovnatelně menší množství bioaerosolových částic. Což naznačuje fakt, že většina bioaerosolových částic se zachycuje již v prvním patře vysokoobjemového impaktoru, i když některé částice o $d_{ae} < 10 \mu\text{m}$ (např. spory hub), by měly postupovat do nižších pater. Za prvé, to může být podmíněno chemickými a fyzikálními vlastnostmi impakčního substrátu PUF. Za druhé, předpokládáme, že záchyt částic na prvním patře mohl být způsoben vznikem elektrostatických sil mezi negativně nabitými bioaerosolovými částicemi (Delort a kol, 2017) a nabitým PUF- substrátem.

Během naší analýzy obou frakcí (A+B) vzorku 19 byly pozorovány částice bioaerosolu. Ve frakci A byl, stejně jako u vzorku 20A, pozorován pyl rodu *Corylus*. Ve frakci B neočekávaným nálezem byly spory hub rodu *Cladosporium*, protože nejvyšší koncentraci ve vzduchu mají od června do září (Grinn-Gofron a kol, 2013). Podle MBL (Mold & Bacteria Consulting Laboratories) v zimním období je jejich koncentrace mnohem nižší.



Obr.15 SEM snímek: pyl rodu *Corylus* (1) a neidentifikovaný bioaerosol (2). Vzorek 19A, lokalita Praha, doba odběru 20.2.15 – 23.2.15 + 25.2.15-27.2.15.



Obr.16 SEM snímek: spora rodu *Cladosporium* (1) a neidentifikovaný bioaerosol (2). Vzorek 19B, lokalita Praha, doba odběru 20.2.15 – 23.2.15 + 25.2.15-27.2.15.

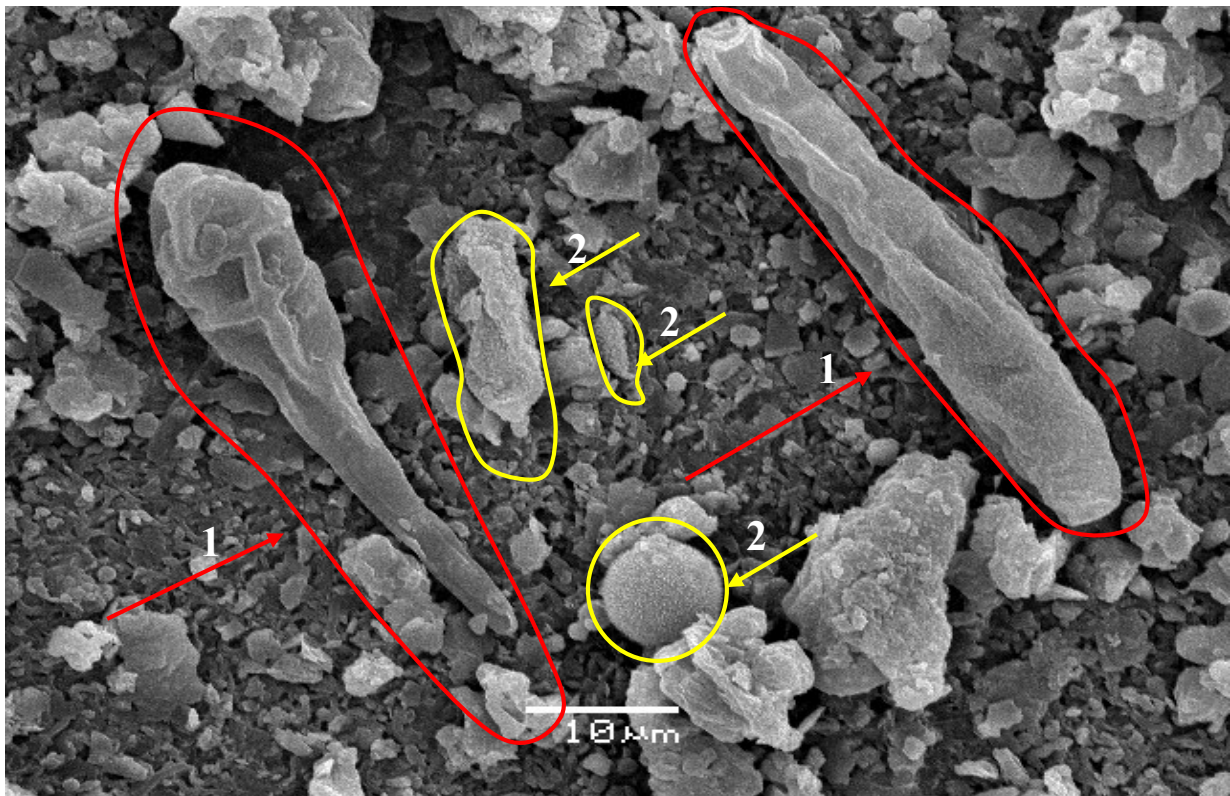
7.2.2. Březno

Tabulka 3. Počet a koncentrace spor hub na lokalitě Březno.

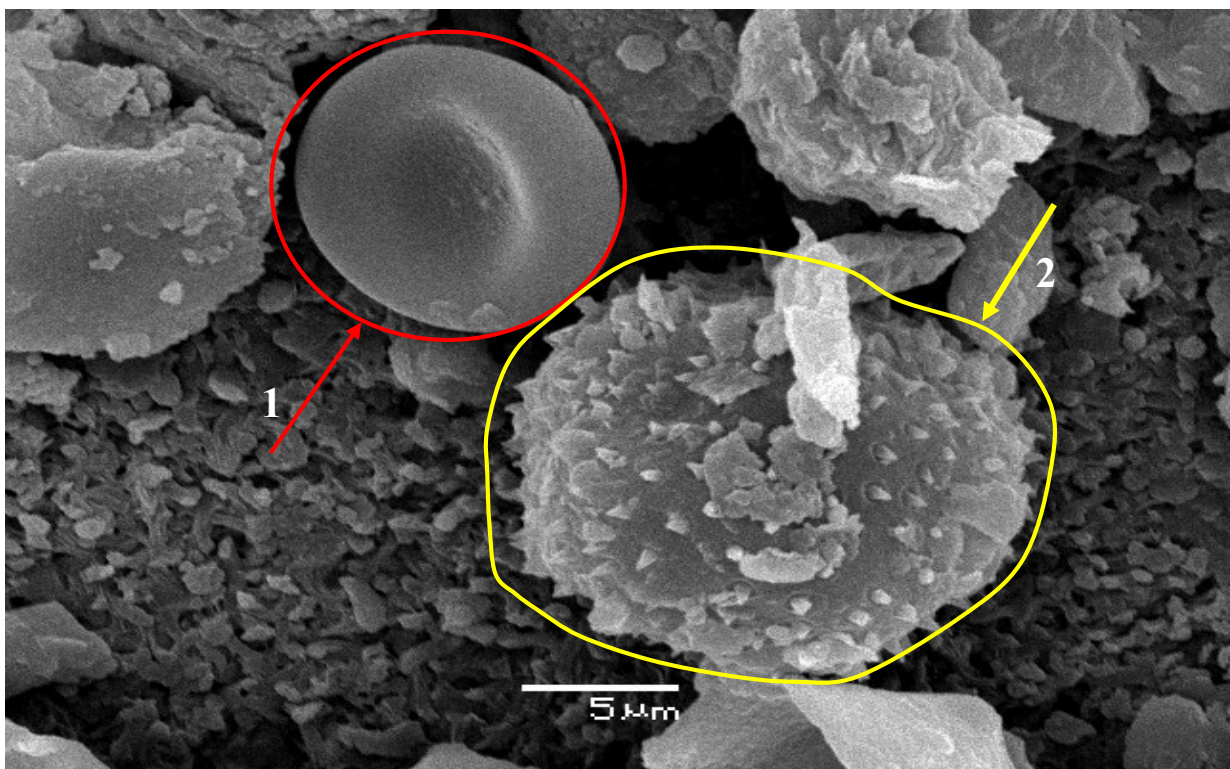
Číslo vzorku	Počet spor hub		Celková plocha snímků (μm^2)	Celkový počet spor hub v celém vzorku	Koncentrace spor hub (počet spor $\cdot\text{m}^{-3}$)	Objem prosatého vzduchu (m^3)
	Ident.	Neident.				
38A	21	155	52940	3572743	1452	2459,7
39A	10	153	52940	3308848	1320	2508,3
40A	8	187	52940	3958437	1569	2521,8
42A	15	181	52940	3978737	1552	2562,3

V Březnu byly vzorky odebrány od 7.8.09 do 17.8.09. Podle NCDC v tomto období bylo hodně srážek a denní teploty se pohybovaly mezi 26°C a 30°C. Tyto klimatické podmínky nejvíce vyhovují růstu hub a následnému uvolňování jejich spor do ovzduší. Z toho důvodu byla pozorována vysoká koncentrace spor hub. Mimo jiné výška umístění impaktoru (4 m od zemského povrchu) také pozitivně ovlivnila koncentraci spor hub. Lze pozorovat postupné zvětšení koncentrace.

Celkem se podařilo identifikovat spory hub do 9 rodů. Největší variabilita byla pozorována u spor hub rodu *Puccinia*. To může být podmíněno jejich nejmenší deformací. Právě na této lokalitě byly nalezeny spory hub rodu *Alternaria*, které podle Bullerman, 2003 vyžadují vysokou vlhkost a parazitují na obilovinách a ovoci. Spory rodu *Boletaceae* jsou náchylné na znečištění ovzduší, a proto jsme neočekávali jejich nález v této lokalitě. Dalšími identifikovanými rody spor hub byly *Conoplea*, *Melampsora*, *Tilletiaceae*.



Obr.17 SEM snímek: spora rodu *Alternaria* (1) a neidentifikovaná spora (2). Vzorek 38A, lokalita Březno, doba odběru 7.8.09 – 9.8.09.



Obr.18 SEM snímek: spora rodu *Conoplea* (1) a spora rodu *Ustilago* (2). Vzorek 39A, lokalita Březno, doba odběru 9.8.09 – 11.8.09.

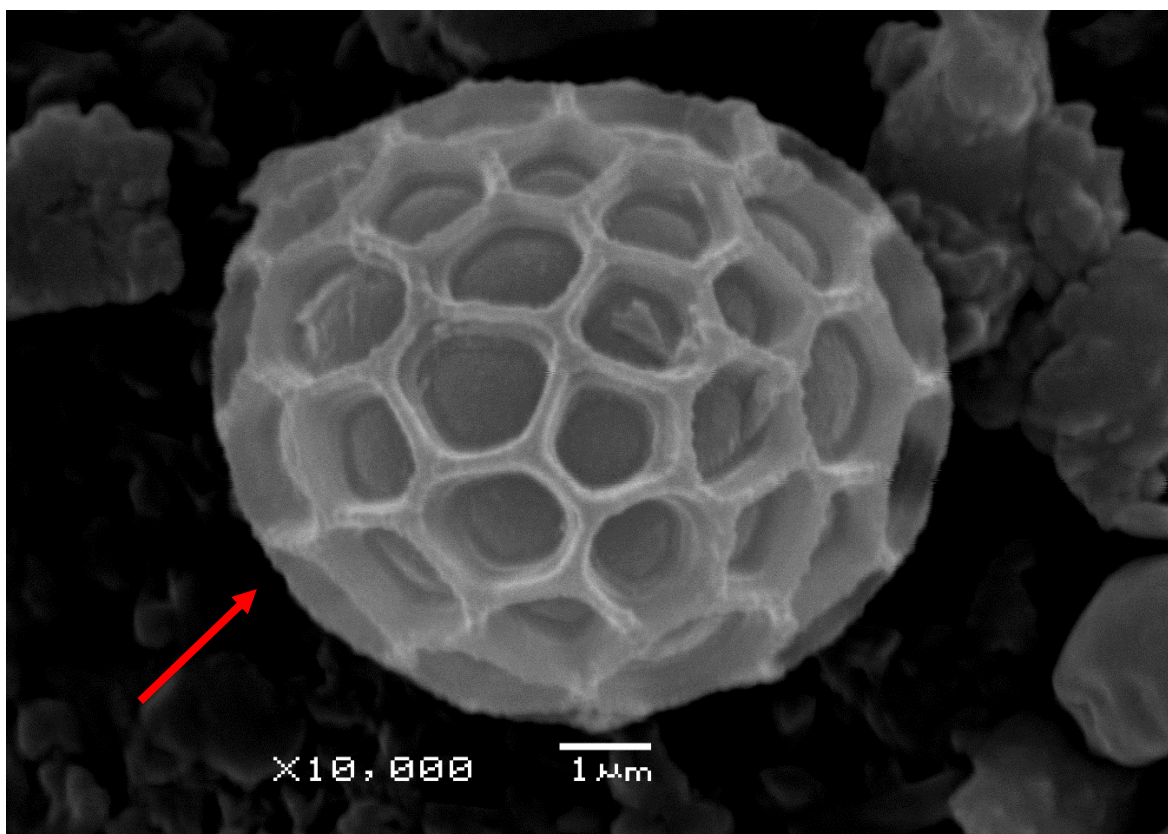
7.2.3. Láz

Tabulka 4. Počet a koncentrace spor hub na lokalitě Láz.

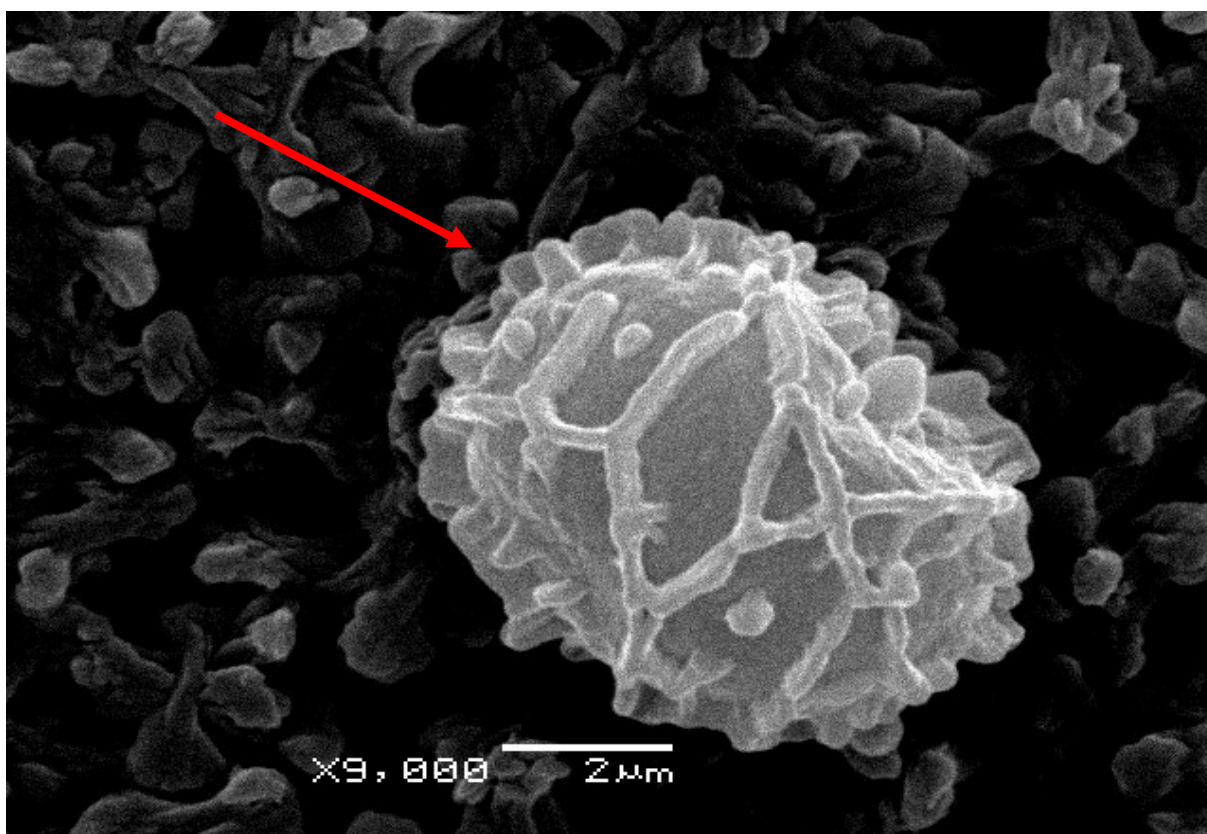
Číslo vzorku	Počet spor hub		Celková plocha snímků (μm^2)	Celkový počet spor hub v celém vzorku	Koncentrace spor hub (počet spor $\cdot\text{m}^{-3}$)	Objem prosatého vzduchu (m^3)
	Ident.	Neident.				
45A	16	191	52940	4202034	1617	2598
46A	13	190	52940	4120835	1613	2551,5
47A	12	205	52940	4405030	1738	2532,6
48A	20	186	52940	4181734	1610	2593,8

V Lázu byly vzorky odebrány od 24.8.09 do 1.9.09. Během odběru vzorků nepršelo a střední denní teploty byly kolem 29°C. V tomto období se ještě více zlepšily podmínky pro uvolňování spor hub do ovzduší. Proto tady byla objevena nejvyšší koncentrace spor hub ze všech třech lokalit. Pravděpodobně je tento jev také spojen s umístěním impaktoru blízko zemského povrchu. Mezi faktory, které způsobily větší množství spor patří zalesněné okolí, rozsáhlé mokřady a rašeliniště na místě odběru vzorků. Koncentrace postupem času byla skoro konstantní.

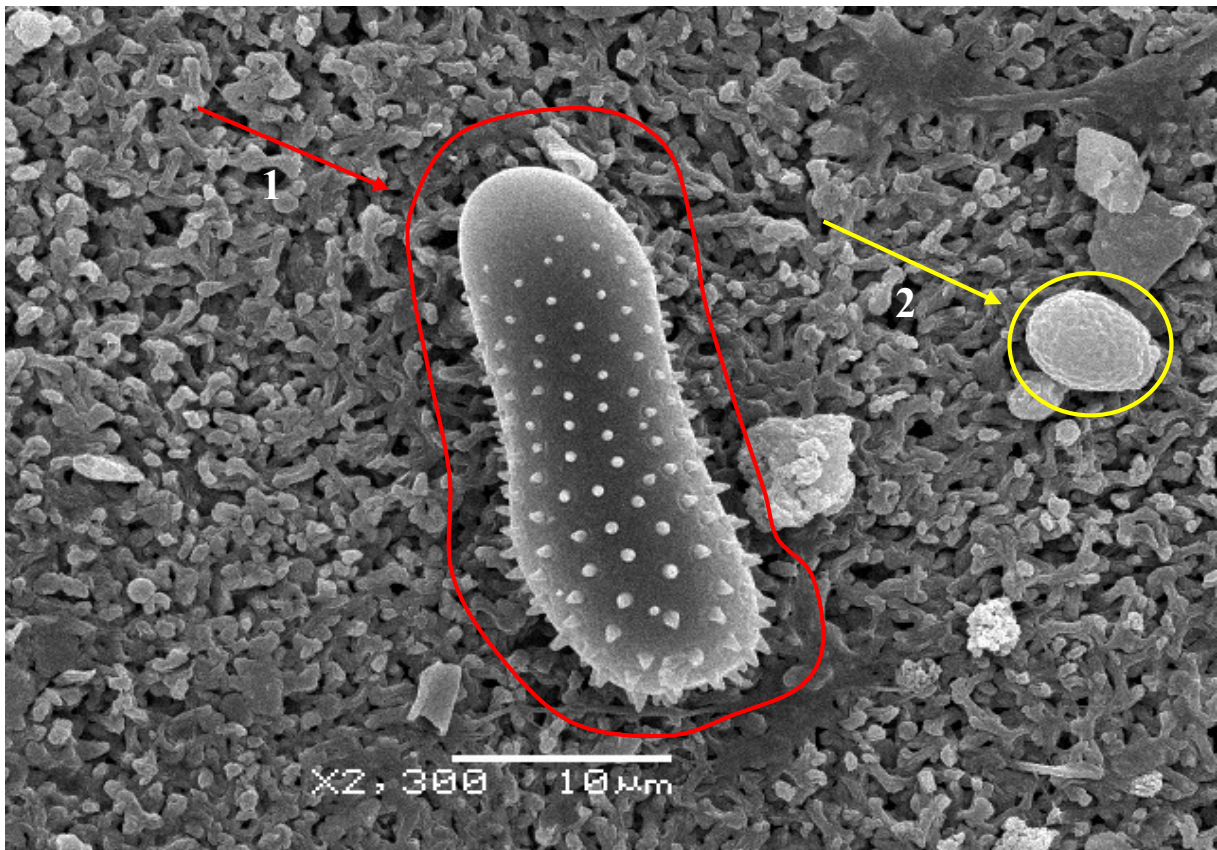
Ve vzorcích z této lokality bylo identifikováno velké množství spor čeledi *Tilleteaceae*, což jsou parazitické houby rostlin z čeledi Lipnicovité (*Poaceae*). Pouze na této lokalitě byly identifikovány spory rodů *Aspergillus* a *Fusarium* a druhu *Lactarius Trivialis*, který roste především v horských a podhorských lesích. Byly nalezeny spory hub rodů *Boletaceae*, *Cladosporium*, *Puccinia*, *Ustilago*, *Conoplea*.



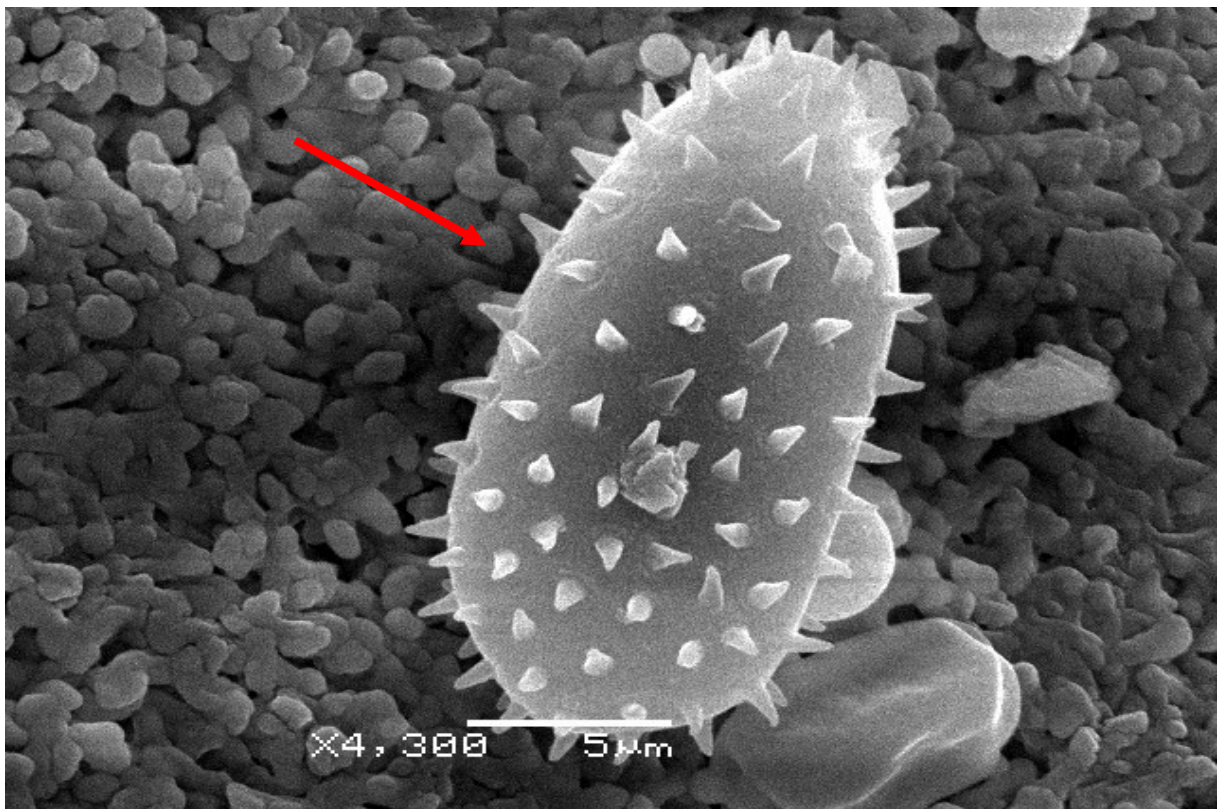
Obr.19 SEM snímek: spora rodu *Tilletia*. Vzorek 45A, lokalita Láz, doba odběru 24.8.09 – 26.8.09.



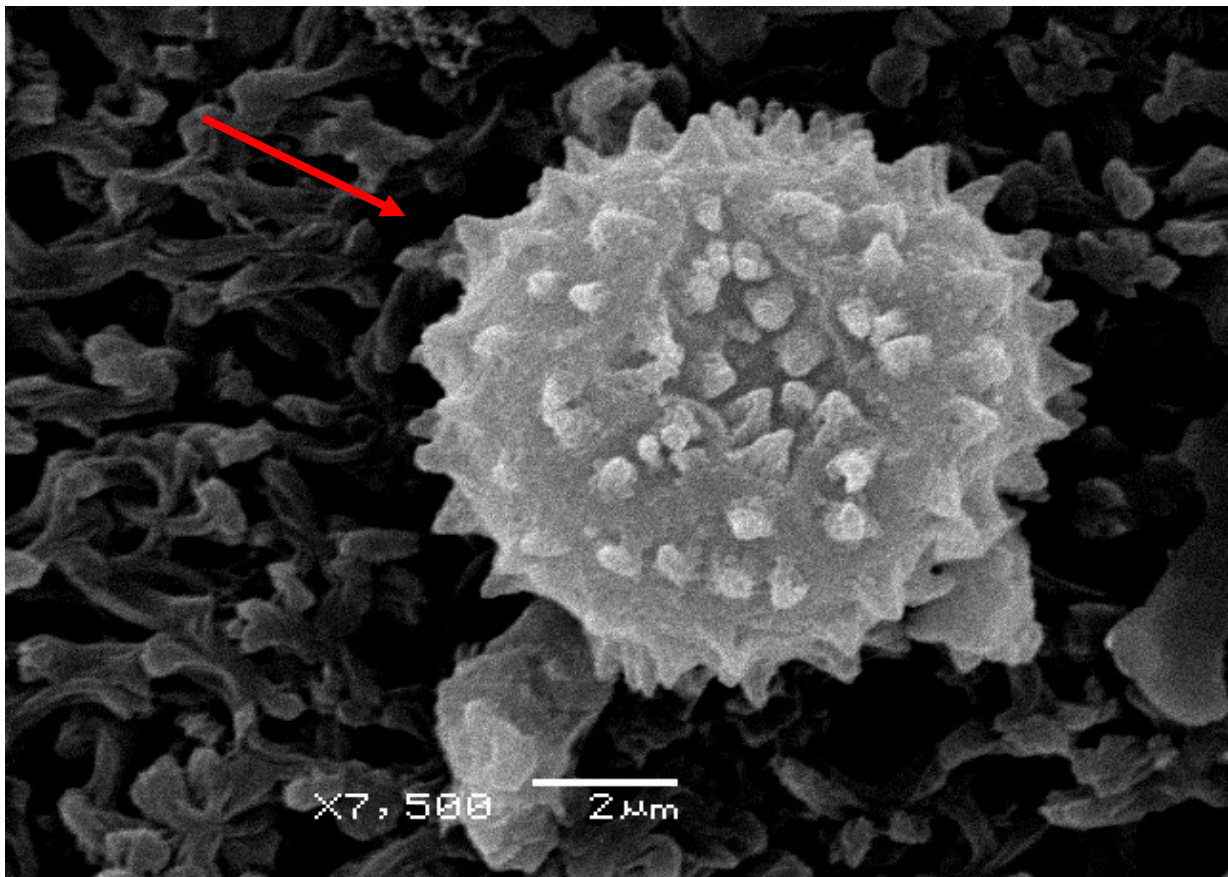
Obr.20 SEM snímek: spora druhu *Lactarius Trivialis*. Vzorek 45A, lokalita Láz, doba odběru 24.8.09 – 26.8.09.



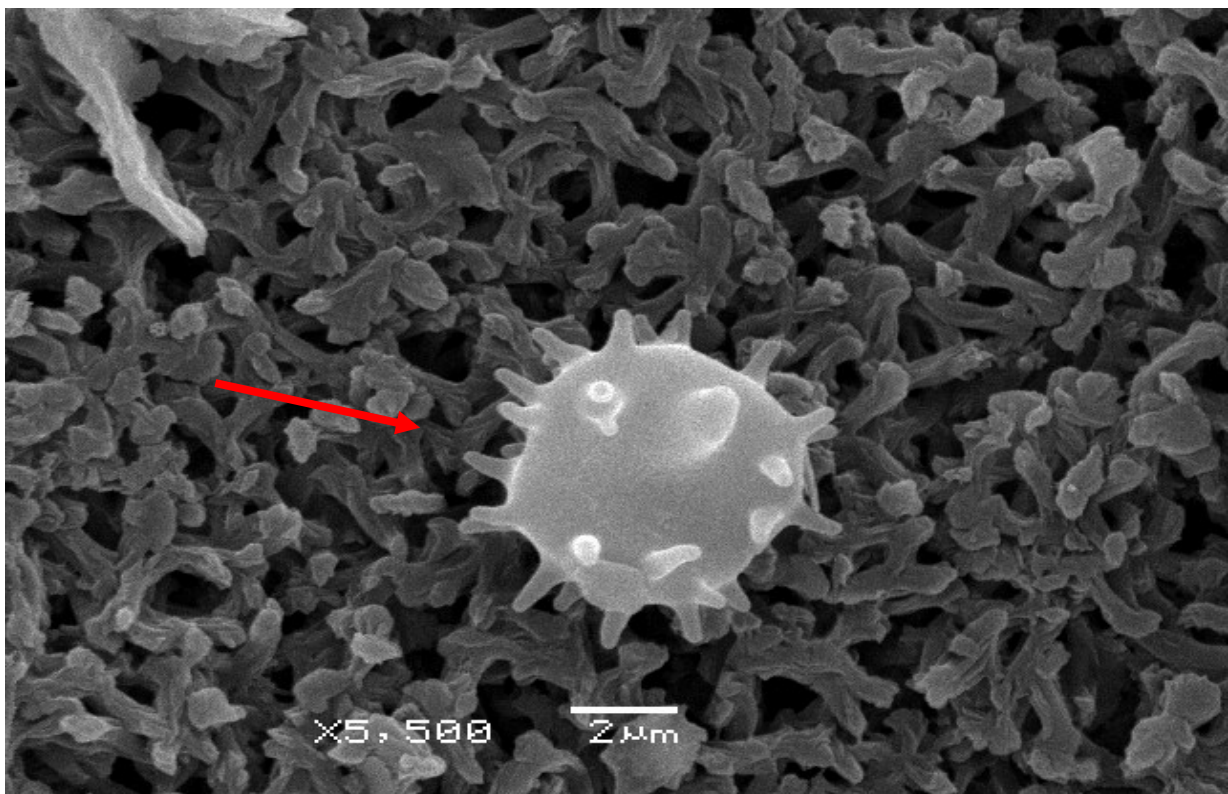
Obr.21 SEM snímek: spora rodu *Melampsora* (1) a neidentifikovaná spora (2). Vzorek 45A, lokalita Láz, doba odběru 24.8.09 – 26.8.09.



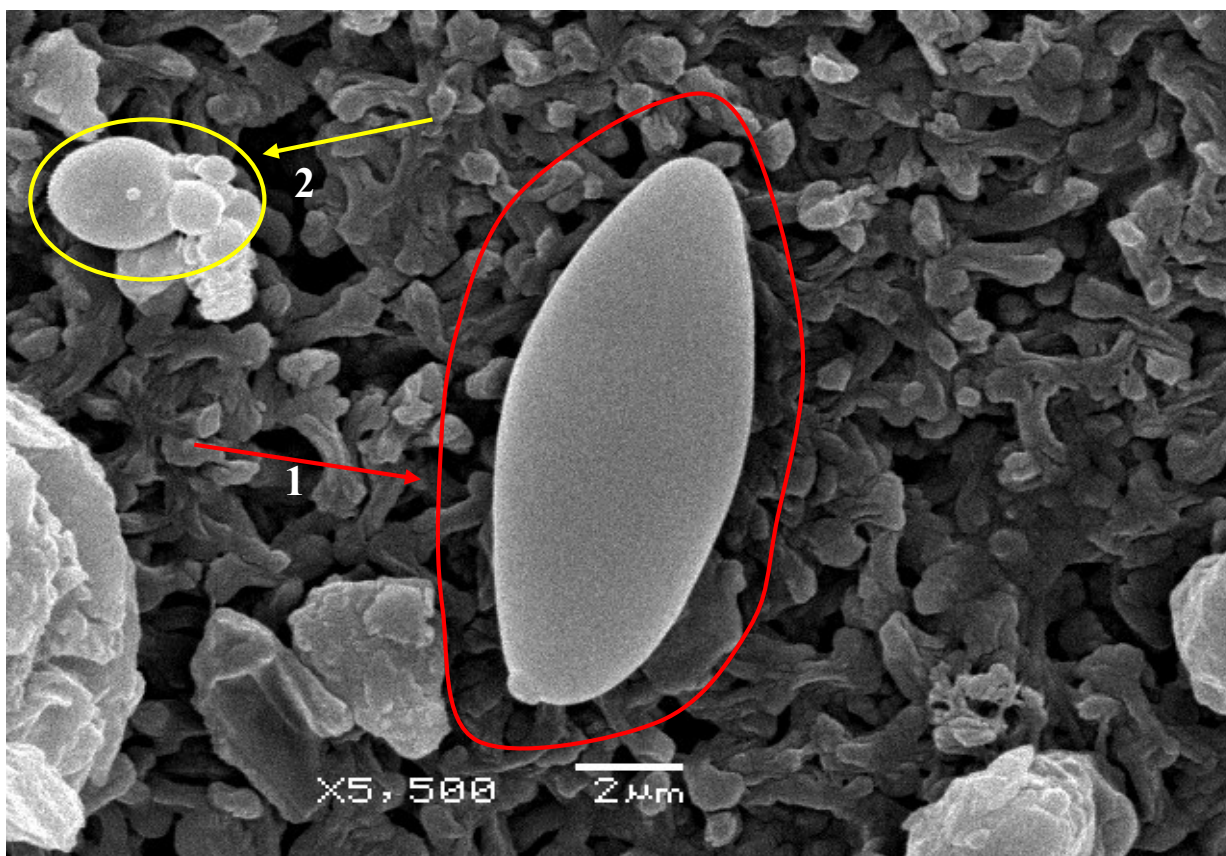
Obr.22 SEM snímek: spora rodu *Puccinia*. Vzorek 45A, lokalita Láz, doba odběru 24.8.09 – 26.8.09.



Obr.23 SEM snímek: spora rodu *Ustilago*. Vzorek 48A, lokalita Láz, doba odběru 24.8.09 – 26.8.09.



Obr.24 SEM snímek : spora rodu *Aspergillus*. Vzorek 48A, lokalita Láz, doba odběru 24.8.09 – 26.8.09.

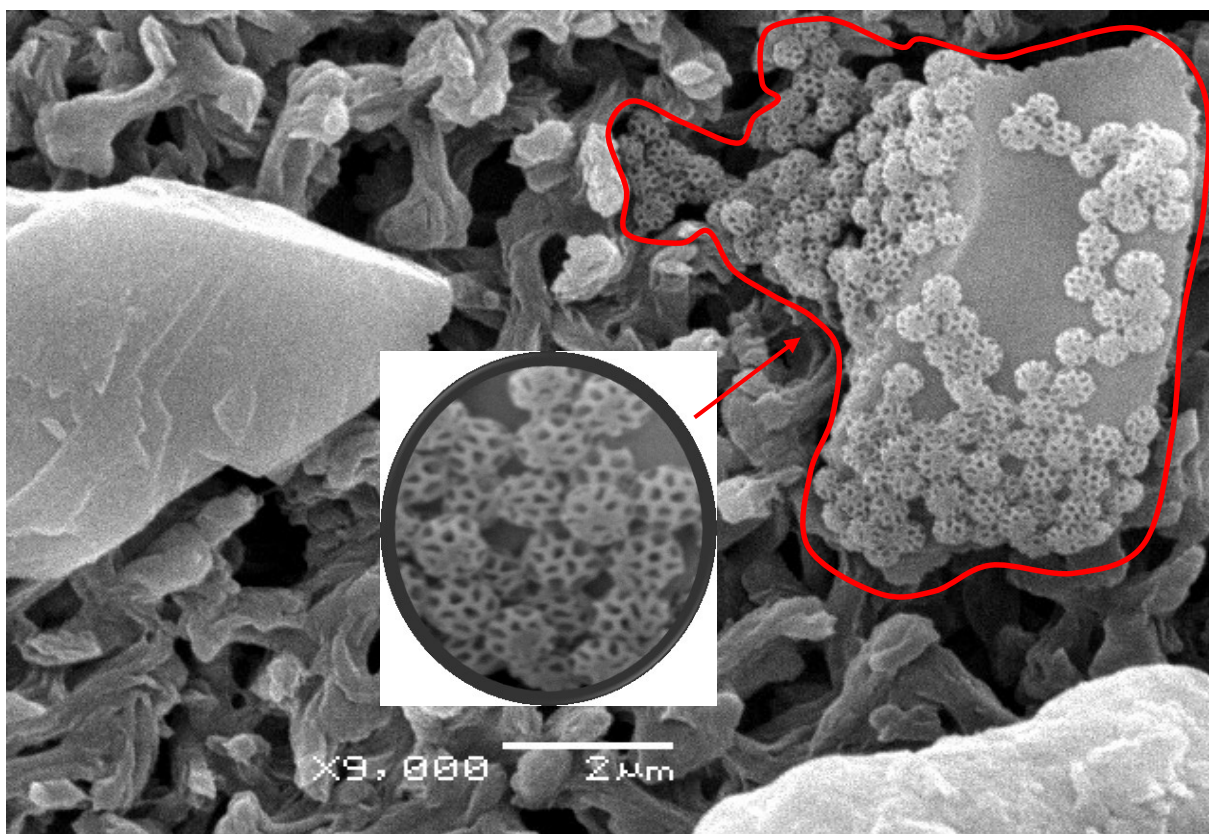


Obr.25 SEM snímek : spora rodu *Boletaceae*. Vzorek 45A, lokalita Láz, doba odběru 24.8.09 – 26.8.09.

Společně pro všechny lokality byl nejčastěji se vyskytujícím rodem *Cladosporium*, který byl přítomen ve všech vzorcích. Tento výsledek se shoduje s výsledky v pracích, kde byla zkoumána koncentrace spor hub. O něco méně bylo objeveno houbových spor rodů *Puccinia* a *Ustilago*. Spory hub rodu *Melampsora*, které parazitují hlavně na listech rostlin rodu *Populus*, byly objeveny jenom v lokalitách Láz a Březno, kde právě roste hodně topolů.

Zajímavým nálezem byly brochosomy, což jsou bílkovinné sekreční částice (0,2 - 20 μm) hmyzu čeledi *Cicadellidae* (Rakitov a kol, 2013). Brochosomy jsou produkovány malpigickými trubicemi ve velkém množství na povrchu integumentu a vytvářejí film sloužící k odpuzování vody a lepkavých látek (Rakitov, 2002). Další možnou funkcí brochosomových filmů je přímá nebo nepřímá ochrana proti připojení a klíčení spor hub (Rakitov, 2002).

V sérii kampaní bylo zjištěno, že v městském teplém vzduchu (během léta a na začátku září) jsou brochosomy nejrozšířenějšími bioaerosolovými částicemi (Wittmaack, 2005). Právě tímto faktem můžeme vysvětlit nález brochosomů ve vzorkách A32 a A31 z Prahy. Zatímco v Lázu byl objev brochosomů podmíněn malou početností velkých částic bioaerosolu (např. pyl). Podle Wittmaacku, 2002 díky tomu nedochází k zakrytí malých brochosomů a navíc usnadňují jejich detekci. V Březnu brochosomy pozorovány nebyly.



Obr.26 SEM snímek : sekreční částice brochosomy. Vzorek 48A, lokalita Láz, doba odběru 30.8.09 – 1.9.09.

7.3. Korelace mezi koncentrací spor hub a navázkou aerosolu

U vzorků z Prahy, Březnu a Lázu nebyla pozorována ani pozitivní, ani negativní korelace mezi navázkou aerosolu a koncentrací spor hub ve vzduchu. Koncentrace spor se postupně zvyšovala. Předpokládáme, že to bylo způsobeno stoupající teplotou vzduchu.

7.4. Výpočet procenta deformovaných spor hub

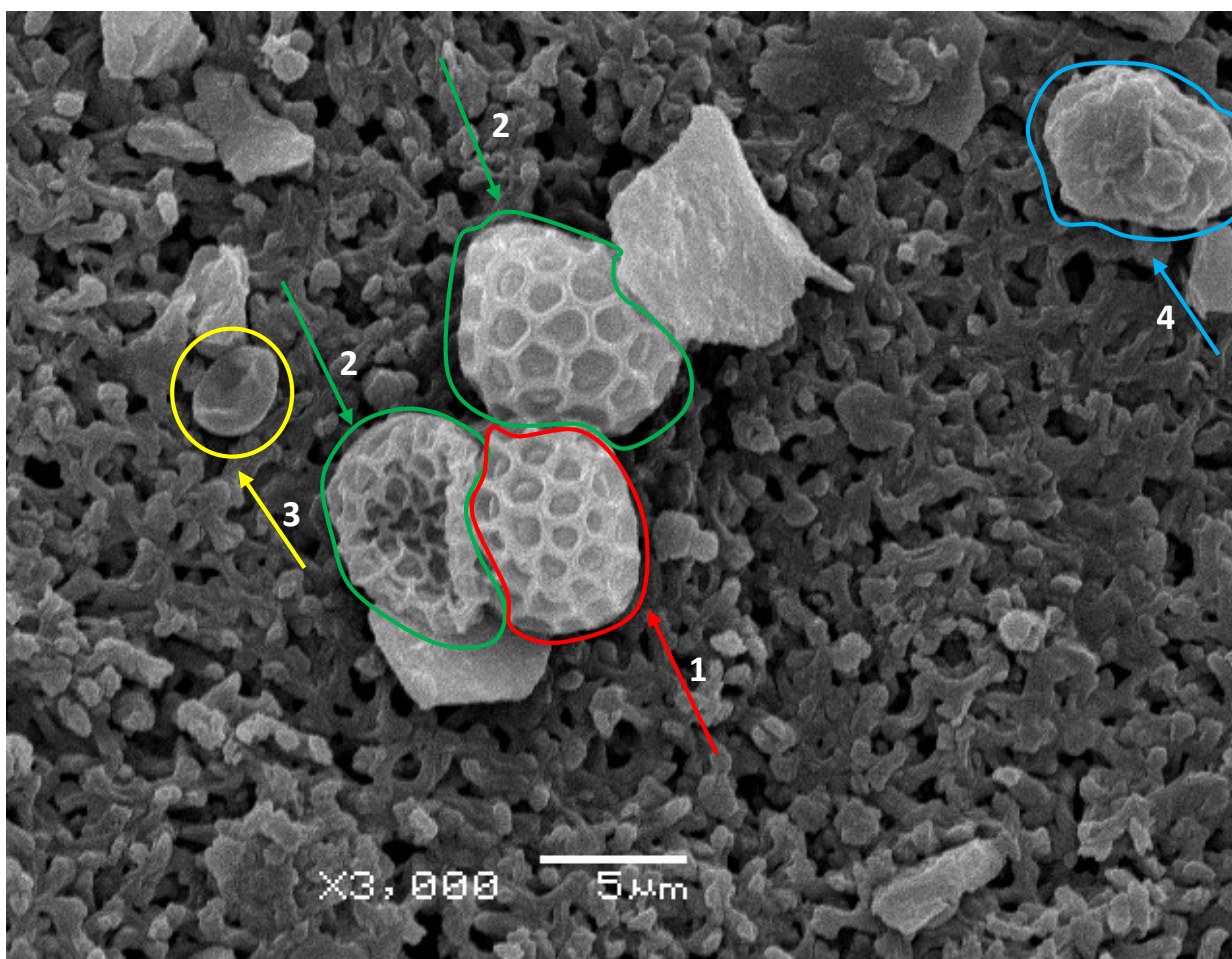
Deformace spor hub mohou ztěžovat identifikaci během analýzy pomocí mikroskopu (Vijai Kumar Gupta a kol, 2013). Deformovaná morfologická struktura spor hub může být způsobena dehydratací (Vijai Kumar Gupta a kol, 2013). Sime a kol, uvádí že Lacto-Cotton Blue je schopen rehydratovat vysušené a deformované spory, aby získaly původní tvar. Proces může trvat několik hodin nebo celou noc. Houby jsou také citlivé na světlo, ale mnohé z nich jsou chráněny pigmenty absorbujícími světlo (Roy G. Driesche a kol, 1996). Podle Harriet Burge a kol, 2011 ani zvětšení rychlosti průtoku vzduchu přes impaktor nemůže způsobit deformity spor hub.

Zvýšení průtokové rychlosti by mělo zlepšit shromažďování jednotlivých spor a agregátů inerciálním impaktováním. Avšak zvyšující se impakční rychlost může být dostačující k rozdělení agregátů během impakce (Trunov a kol, 2001).

Pro analýzu deformovaných spor hub byly analyzovány všechny snímky. Na snímcích byly spory jak deformované, tak i nepoškozené, které byly následně spočítány. Vzorec pro zjištění procenta deformit :

$$\frac{\text{množství spor deformovaných}}{\text{celkové množství spor}} * 100 = \text{procento deformovaných spor hub}$$

V Praze procento deformovaných spor hub bylo 48% z celkového množství spor. V Březnu a Lázu procento deformit bylo 23% a 25% resp. Lze pozorovat zmenšení procenta deformovaných spor hub. Z největší pravděpodobnosti je to dáno zlepšením podmínek (větší vlhkost vzduchu) a uvolňováním “nových” spor, u kterých ještě nedošlo k dehydrataci.



Obr.27 SEM snímek spor hub rodu *Tilletia*. Nedeformovaná spora (1) vs deformovaná spora (2), Neidentifikovaná spora (3), neidentifikovaný bioaerosol (4). lokalita Laz , doba odběru 24.8.09 - 26.8.09.

8. Závěr

Za prvé, dokázali jsme, že 1. frakci vysokoobjemového kaskádního impaktoru HiVol BGI-900 je vhodná pro odběr vzorků bioaerosolu a jejich další analýzu. Tento druh impaktoru prokázal nízkou míru poškození bioaerosolu během vzorkování, a to díky tomu, že má malou tlakovou ztrátu na trysce a přitom je schopen zachytit velký reprezentativní objem aerosolu, který je nutný pro další analýzu.

Za druhé, dokázali jsme, že impakční substrát PUF lze využít pro přípravu homogenně rozloženého vzorku pro tvarovou analýzu bioaerosolu pomocí SEM za použití vhodné metody extrakce atmosférického aerosolu.

Za třetí, během SEM analýzy jsme ve vzorcích aerosolu objevili velké množství částic biologického původu. Byly identifikovány částice a spory hub, rostlinný pyl, sekreční produkty hmyzu (tzv. brochozomy) a organické úlomky. Nejméně spor hub bylo nalezeno v Praze. Na lokalitách Březno a Láz bylo objeveno přibližně stejné množství spor. Spory hub se podařilo identifikovat do 9 rodů, 1 čeledi a 1 druhu. Nejčastěji se vyskytující spory hub patřily do rodu *Cladosporium*. Ve vzorcích zimního odběru z Prahy také byl nalezen bioaerosol, kdy zevrubná mikroskopická analýza dalších stupňů nepotvrdila existenci bioaerosolu. Většina toho bioaerosolu byla klasifikována jako pyl a spory hub. SEM analýza prvního stupně kaskádního impaktoru může být použita pro analýzu bioaerosolu.

Za čtvrté, nebyl nalezen velký rozdíl v kvalitě spor hub mezi vzorky. Kvantita výskytu houbových spor závisela na období odběru vzorků aerosol, klimatických podmínkách a výšce umístění impaktoru.

9. Seznam použité literatury

A.Adhikari, J.Jung, T.Reponen, J.S.Lewis, E.C.Degrasse, L.F.Grimsley, G.L.Chew, A.S.Grinspun. Aerosolization of fungi, (1→3)-β-d glucan, and endotoxin from flood-affected materials collected in New Orleans homes. *Environmental Research*. 2009, 109(3), 215-224

M.J.Aira, F.J.Rodriguez-Rajo, M. Fernandez-Gonzalez a kol. Spatial and temporal distribution of *Alternaria* spores in the Iberian Peninsula atmosphere, and meteorological relationships: 1993–2009. *International Journal of Biometeorology*. 2013, 57(2), 265-274

P.A.Ariya, J.Sun, N.A.Eltouny, E.D.Hudson, C.T.Hayes, a G.Kos. Physical and chemical characterization of bioaerosols – Implications for nucleation processes. *International Reviews in Physical Chemistry*. 2009, 28(1), 1-32

D.E.Aylor. Release of *Venturia inaequalis* Ascospores during Unsteady Rain: Relationship to Spore Transport and Deposition. *Phytopathology* .1992, 82(5), P.532-540

S.N.Baxi, J.M.Portnoy, D.Larenas-Linnemann a kol. Exposure and Health Effects of Fungi on Humans. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2016, 4(3), 396-404

H.K.Baruah. 1961. The air spora of a cow shed. *J. Gen. Microbial*. 25, 482-491.

H.Brandl. Bioaerosols in Indoor Environment - A Review with Special Reference to Residential and Occupational Locations. *The Open Environmental & Biological Monitoring Journal* .2011, 4(1), 83-96

M.Braniš, I.Hůnová a kol. Atmosféra a klima: aktuální otázky ochrany ovzduší. V Praze: Karolinum, 2009, 351

P.Bridge, B.Spooner. *Plant and Soil*. 2001, 232(1/2), 147-154

J.K.M.Brown. Aerial Dispersal of Pathogens on the Global and Continental Scales and Its Impact on Plant Disease. *Science*. 2002, 297(5581), P. 537-541

L.B.Bullerman. Mycotoxins. Classifications. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* . Elsevier, 2003, 2003, s. 4080-4089

M.Burch, E.Levetin. Effects of meteorological conditions on spore plumes. *International Journal of Biometeorology*. 2002, 46(3), 107-117

H.A.Burge. Fungi: toxic killers or unavoidable nuisances? *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2001, 87(6),.52-56

H.A.Burge. An update on pollen and fungal spore aerobiology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2002, 110(4), 544-552

H.A.Burge. Fungal Aerosols.*The environmental reporter*. 2011.

R.K.Bush, J.M.Portnoy. The role and abatement of fungal allergens in allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2001, 107(3), S430-S440

A.Chehregani, A.Majde, M.Moin, M.Gholami, M.A.Shariatzadeh, H.Nassiri. Increasing allergy potency of *Zinnia* pollen grains in polluted areas. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2004, 58(2), 267-272

- M.C.Chi, C.S.Li. Fluorochrome in Monitoring Atmospheric Bioaerosols and Correlations with Meteorological Factors and Air Pollutants. *Aerosol Science and Technology*. 2007, 41(7), 672-678
- C.Crawford, T.Reponen, T.Lee, Y.Iossifova, L.Levin, A.Adhikari, S.A.Grinspun. Temporal and spatial variation of indoor and outdoor airborne fungal spores, pollen, and (1→3)-β-d-glucan. *Aerobiologia*. 2009, 25(3), 147-158
- C.S.Cox, C.M.Wathes. Chapter 11 .Boca Raton: Lewis Publishers, *Bioaerosols handbook*. 1995, 285-316
- Z.Cvetnic, S.Pepeljnjak. Distribution and mycotoxin-producing ability of some fungal isolates from the air. *Atmospheric Environment*. 1997, 31(3), 491-495
- A.M.Delort, P.Amato. Microbiology of aerosols. Hoboken, NJ: John Wiley, 2017, 39
- P.Demokritou, I.G.Kavouras, S.T.Ferguson, S.P.Koutrakis. Development of a High Volume Cascade Impactor for Toxicological and Chemical Characterization Studies. *Aerosol Science and Technology*. 2002, 36(9), 925-933
- V.R. Despres , J. F. Nowoisky, M. Klose, R. Conrad, M. O. Andreae., U. Poschl. Characterization of primary biogenic aerosol particles in urban, rural, and high-alpine air by DNA sequence and restriction fragment analysis of ribosomal RNA genes. *Biogeosciences*. 2007, 4(6), 1127-1141
- V.R. Despres , J.A. Huffman, S.M. Burrows a kol. Primary biological aerosol particles in the atmosphere: a review. *Tellus B: Chemical and Physical Meteorology*. 2012, 64(1), 15598
- P.Di Filippo, D.Pomata, C.Riccardi, F.Buiarelli, C.Perrino. Fungal contribution to size-segregated aerosol measured through biomarkers. *Atmospheric Environment*. 2013, 64, 132-140
- J.Douwes, B.Van Der Sluis, G.Doekes, F.Van Leusden, L.Wijnands, R.Van Strien, A.Verhoeff, B.Brunekreef. Fungal extracellular polysaccharides in house dust as a marker for exposure to fungi: Relations with culturable fungi, reported home dampness, and respiratory symptoms. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1999, 103(3), 494-500
- W. O Ellis, J.P.Smith, B.K.Simpson, J.H.Oldham, P.M.Scott. Aflatoxins in food: Occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1991, 30(4), 403-439
- S.Fernandez-Rodriguez, R.Tormo-Molina, N.Lemonis, B.Clot, D.J.O'connor, J.R.Sodeau. Comparison of fungal spores concentrations measured with wideband integrated bioaerosol sensor and Hirst methodology. *Atmospheric Environment*. 2018, 175, 1-14

- M.E.B.Flores, P.G.Medina, S.P.D.Camacho, M.D.J.U.Beltran, M.D.C. De La Cruz Otero, I.O.Ramirez, M.E.T.Hernandez. Fungal spore concentrations in indoor and outdoor air in university libraries, and their variations in response to changes in meteorological variables. *International Journal of Environmental Health Research*. 2013, 24(4), 320-340
- J.Frohlich-Nowoisky , D. A. Pickersgill, V. R. Despres., U. Poschl. High diversity of fungi in air particulate matter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, 106(31), 12814-12819
- J.Frohlich-Nowoisky J., T. C. J. Hill, B. G. Pummer, P. Yordanova, G. D. Franc., U. Poschl. Ice nucleation activity in the widespread soil fungus *Mortierella alpina*. *Biogeosciences*. 2015, 12(4), 1057-1071
- J.Frohlich-Nowoisky, C. J. Kampf, B. Weber a kol. Bioaerosols in the Earth system: Climate, health, and ecosystem interactions. *Atmospheric Research*. 2016, 182, 346-376
- A.Ganthaler , S. Mayr., J. Hantula. Temporal variation in airborne spore concentration of *Chrysomyxa rhododendri*: correlation with weather conditions and consequences for Norway spruce infection. *Forest Pathology*. 2015, 45(6), 443-449
- D.G.Georgakopoulos, V.Despres, J.Frohlich-Nowoisky a kol. Microbiology and atmospheric processes: biological, physical and chemical characterization of aerosol particles. *Biogeosciences*. 2009, 6(4), 721–737.
- G.S.Gilbert, D.R. Reynolds. Nocturnal Fungi: Airborne Spores in the Canopy and Understory of a Tropical Rain Forest1. *Biotropica*. 2005, 37(3), 462-464
- M.M.Giner, J.S.C. Garcia, C.N. Camacho. Airborne *Alternaria* spores in SE Spain (1993-98). *Grana*. 2001, 40(3), 111-118
- M.Golofit-Szymczak, R.L.Gorny. Bacterial and Fungal Aerosols in Air-Conditioned Office Buildings in Warsaw, Poland—The Winter Season. *International Journal of Occupational Safety and Ergonomics*. 2010, 16(4), 465-476
- B.J.Green, E.R.Tovey, J.K.Sercombe, F.M.Blachere, D.H.Beezhold, D.Schmechel. Airborne fungal fragments and allergenicity. *Medical Mycology*. 2006, 44(s1),.245-255
- D.J.Gretchen. *Journal of Pollination Ecology*, 9(13), 2012, 96-107
- W.D.Griffiths, G.A.L.Decosemo. The assessment of bioaerosols: A critical review. *Journal of Aerosol Science*. 1994, 25(8), 1425-1458

- A.Grinn-Gofron, A.Strzelczak, T.Wolski. The relationships between air pollutants, meteorological parameters and concentration of airborne fungal spores. *Environmental Pollution*. 2011, 159(2), 602-608
- A.Grinn-Gofron, A.Strzelczak. Changes in concentration of *Alternaria* and *Cladosporium* spores during summer storms. *International Journal of Biometeorology* . 2013, 57(5), 759-768
- V.K.Gupta, M.G.Tuohy, M.Ayyachamy, K.M.Turner, A. O'donovan. Laboratory protocols in fungal biology: current methods in fungal biology. *New York, NY: Springer. Fungal biology*, 2013, 128-130
- D.L.R.Haga, R. Iannone, M. J. Wheeler a kol. Ice nucleation properties of rust and bunt fungal spores and their transport to high altitudes, where they can cause heterogeneous freezing. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*. 2013, 118(13), 7260-7272
- D.L.R.Haga, S. M.Burrows, R.Iannone a kol. Ice nucleation by fungal spores from the classes Agaricomycetes, Ustilaginomycetes, and Eurotiomycetes, and the effect on the atmospheric transport of these spores. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 2014, 14(16), 8611-8630
- C.W.Haig, W.G.Mackay, J.T.Walker, C.Williams. Bioaerosol sampling: sampling mechanisms, bioefficiency and field studies. *Journal of Hospital Infection*.2016, 93(3), 242-255
- P.Heikkilä, T.Salmi, M.Kotimaa. Identification and counting of fungal spores by scanning electron microscope. *The Annals of Occupational Hygiene*. 1988
- H.Burge, Bioaerosol Sampling, Sampling for Fungal Aerosols: Principles of Sample Collection, *EMLab P&K*. 2011
- D.A.Healy, D.J.O'connor, A.M.Burke, J.R. Sodeau. A laboratory assessment of the Waveband Integrated Bioaerosol Sensor (WIBS-4) using individual samples of pollen and fungal spore material. *Atmospheric Environment*. 2012, 60, 534-543
- A.Hoekstra, V.Maltsev, G.Videen, ed. Optics of Biological Particles. *Dordrecht: Springer Netherlands*, 2007,31-61
- C.Y.Huang, C.C.Lee, F.C.Li, Y.P. Ma, H.J.J. Su. The seasonal distribution of bioaerosols in municipal landfill sites: a 3-yr study. *Atmospheric Environment*. 2002, 36(27), 4385-4395
- A.Hubert. Pollen-grains in the Air. *Nature* . 1974, 10(253), 355-355
- J.A.Huffman, B.Treutlein, U.Poschl. Fluorescent biological aerosol particle concentrations and size distributions measured with an Ultraviolet Aerodynamic Particle Sizer (UV-APS) in Central Europe. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 2010, 10(7), 3215-3233
- J.A.Huffman, A.J.Prenni, P.J.Demott a kol. High concentrations of biological aerosol particles and ice nuclei during and after rain. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 2013, 13(13),6151-6164

- C.T.Ingold. Fungal spores: their liberation and dispersal. *Oxford: Clarendon Press*, 1971.
- Y.Iwanami, T.Sasakuma, Y.Yamada. Pollen: illustrations and scanning electron micrographs. *Berlin: Springer*, 1988, 8-17
- H.Kanaani, M.Hargreaves, J.Smith, Z.Ristovski, V.Agranovski, L.Morawska. Performance of UVAPS with respect to detection of airborne fungi. *Journal of Aerosol Science*. 2008, 39(2), 175-189
- K.Karlsson, P.Malmberg. Characterization of exposure to molds and actinomycetes in agricultural dusts by scanning electron microscopy, fluorescence microscopy and the culture method. *Scand. J. Work Environ. Health*, 15. 1989, 353–359
- I.G.Kavouras, P.Koutrakis. Use of Polyurethane Foam as the Impaction Substrate/Collection Medium in Conventional Inertial Impactors. *Aerosol Science and Technology*. 2000, 34(1), 46-56
- P.H.Kaye, K.Aptowicz, R.K.Chang, V.Foot, G.Videen. Angularly resolved elastic scattering from airborne particles. A.Hoekstra, V.Maltsev, G.Videen a kol. *Optics of Biological Particles*. *Dordrecht: Springer Netherlands*, 2007, 31-61
- A.Khattab, E.Levetin. Effect of sampling height on the concentration of airborne fungal spores. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2008, 101(5), 529-534
- A.Kolpakova, J.Hovorka, M.Klán. Pollen Characterization in Size Segregated Atmospheric Aerosol. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2017, 95(6), 062001
- K.Křížková, Tvorba informačního a výukového materiálu „Rozmnožování hub“. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta. 2017
- W.J.Langenberg. Relation of Weather Variables and Periodicities of Airborne Spores of *Alternaria dauci*. *Phytopathology*. 1977, 77(7), 879-883.
- A.K.Y.Lee, C.K.Chan, M.Fang, A.P.S.Lau. The 3-hydroxy fatty acids as biomarkers for quantification and characterization of endotoxins and Gram-negative bacteria in atmospheric aerosols in Hong Kong. *Atmospheric Environment*. 2004, 38(37), 6307-6317
- J.I.Levy, Y.Nishioka, K.Gilbert, C.Cheng, H.Burge. Variabilities in aerosolizing activities and airborne fungal concentrations in a bakery. *Am Ind Hyg Assoc J*. 1999, 317–325.
- C.Leyronas, P.C.Nicot. Monitoring viable airborne inoculum of *Botrytis cinerea* in the South-East of France over 3 years: relation with climatic parameters and the origin of air masses. *Aerobiologia*. 2013, 29(2), 291-299

- F.Liu, S.Lai, K.Reinmuth-Selzle a kol. Metaproteomic analysis of atmospheric aerosol samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016, 408(23), 6337-6348
- L.M.Mahieu, J.J.D.Dooy, F.A.V.Laer, H.Jansens, M.M. Ieven. A prospective study on factors influencing aspergillus spore load in the air during renovation works in a neonatal intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*. 2000, 45(3), 191-197
- A.Mari, P.Schneider, V.Wally, M.Breitenbach, B.Simon-Nobbe. Sensitization to fungi: epidemiology, comparative skin tests, and IgE reactivity of fungal extracts. *Clinical Experimental Allergy*. 2003, 33(10), 1429-1438
- M.Brundrett a kol. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Canberra, ACT: *Australian Centre for International Agricultural Research*, 1996.
- P.A.Maron, D.P.H.Lejon, E.Carvalho, K.Bizet, P.Lemanceau, L.Ranjard, C.Mougel. Assessing genetic structure and diversity of airborne bacterial communities by DNA fingerprinting and 16S rDNA clone library. *Atmospheric Environment*. 2005, 39(20), 3687-3695
- S.Marvanová, P.Kulich, R.Skoupý, F.Hubatka, M.Ciganek, J.Bendl, J.Hovorka, M.Machala. Size-segregated urban aerosol characterization by electron microscopy and dynamic light scattering and influence of sample preparation. *Atmospheric Environment* . 2018, 178, 181-190
- S.Matthias-Maser, R.Jaenicke. *Aerobiologia*. 1995, 16(2), 207-210
- C.E.Morris, D.C.Sands, C.Glaux, J.Samsatly, S.Asaad, A.R.Moukahel, F.L.T.Goncalves, E. K. Bigg. Urediospores of rust fungi are ice nucleation active at > -10 °C and harbor ice nucleation active bacteria. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 2013, 13(8), 4223-4233
- W.W.Nazaroff. Indoor bioaerosol dynamics. *Indoor Air*. 2016, 26(1), 61-78
- Y.L.Pan. Detection and characterization of biological and other organic-carbon aerosol particles in atmosphere using fluorescence. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*. 2015, 150, 12-35
- M.D.Petters, S.M.Kreidenweis. A single parameter representation of hygroscopic growth and cloud condensation nucleus activity. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 2007, 7(8), 1961-1971
- I.J.Pitt, A.D.Hocking. Fungi and food spoilage. 2nd ed. *Dordrecht: Springer*, 1987, 53 - 144
- F.D.Pope. Pollen grains are efficient cloud condensation nuclei. *Environmental Research Letters*. 2010, 5(4), 044015

- U.Poschl, S.T.Martin, B.Sinha a kol. Rainforest Aerosols as Biogenic Nuclei of Clouds and Precipitation in the Amazon. *Science*. 2010, 329(5998), 1513-1516
- Pouleur, S., Richard, C., Martin, J.-G., and Antouin, H.: Ice nucleation activity in *Fusarium acuminatum* and *Fusarium avenaceum*, *Appl. Environ. Microb.*, 58, 2960–2964, 1992.
- K.A.Pratt, P.J.Demott, J.R.French a kol. In situ detection of biological particles in cloud ice-crystals. *Nature Geoscience*. 2009, 2(6), 398-401
- A.J.Prenni, M.D.Petters, S.M.Kreidenweis a kol. Relative roles of biogenic emissions and Saharan dust as ice nuclei in the Amazon basin. *Nature Geoscience* . 2009, 2(6), 402-405
- A.Pringle, J.Heitman. Asthma and the Diversity of Fungal Spores in Air. *PLoS Pathogens*. 2013, 9(6), e1003371.
- V.Razmovski, T.J. O'meara, D.J.M.Taylor, E.R.Tovey. A new method for simultaneous immunodetection and morphologic identification of individual sources of pollen allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2000, 105(4), 725-731
- R.A.Rakitov. What are brochosomes for? An enigma of leafhoppers (Hemiptera, Cicadellae). *Denisia 04. 411*. 2002, 32
- R.A.Rakitov. Powdering of egg nests with brochosomes and related sexual dimorphism in leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 2004, 140(3), 353-381
- R.Rautemaa-Richardson, M.D.Richardson. Systemic fungal infections. *Medicine*. 2017, 45(12), 757-762
- T.Reponen, S A.Grinshpun, K.L.Conwell, J.Wiest, M.Anderson. Aerodynamic versus physical size of spores: *Measurement and implication for respiratory deposition*. *Grana*. 2001, 40(3), 119-125
- N.D.Read, K.M.Lord. Examination of living fungal spores by scanning electron microscopy. *Experimental Mycology*. 1991, 15(2),132-139
- R.G.Driesche, T.S.Bellows. Biological Control. Boston, MA: *Springer* US, 1996.
- N.J.Savage, C.E.Krentz, T.Konemann, T.T.Han, G.Mainelis, C.Pohlker, J.A.Huffman. Systematic characterization and fluorescence threshold strategies for the wideband integrated bioaerosol sensor (WIBS) using size-resolved biological and interfering particles. *Atmospheric Measurement Techniques* . 2017, 10(11), 4279-4302

- R.C.Schnell, G.Vali. World-wide Source of Leaf-derived Freezing Nuclei. *Nature*. 1973, 246(5430), 212-213
- A.Sesartic, U.Lohmann, T.Storelvmo. Modelling the impact of fungal spore ice nuclei on clouds and precipitation. *Environmental Research Letters*. 2013, 8(1), 014029
- A.D.Sime, L.L.Abbott, S.P.Abbott. A mounting medium for use in Indoor Air Quality spore-trap analyses. *Mycologia*. 2017, 94(6), 1087-1088
- V.Shalaboda, S.Dmitrieva. “Методы экспресс-анализа пылицы растений и спор патогенных грибов Беларуси. *Практическое пособие*”, 2015. 5-37
- A.Sharma, E.Clark, J.D.Mcglathlin, S.K.Mittal. Efficiency of Airborne Sample Analysis Platform (ASAP) bioaerosol sampler for pathogen detection. *Frontiers in Microbiology*. 2015, 6
- K.R.Spurny. On the chemical detection of bioaerosols. *Journal of Aerosol Science*. 1994, 25(8), 1533-1547
- W.R.Stanley, P.H.Kaye, V.E.Foot, S.J.Barrington, M.Gallagher, A.Gabey. Continuous bioaerosol monitoring in a tropical environment using a UV fluorescence particle spectrometer. *Atmospheric Science Letters*. 2011, 12(2), 195-199
- P.J.Stennett, P.J.Beggs. Alternaria spores in the atmosphere of Sydney, Australia, and relationships with meteorological factors. *International Journal of Biometeorology*. 2004, 49(2), 98-105
- D.A.Sterling, R.D.Lewis. Pollen and Fungal Spores Indoor and Outdoor of Mobile Homes. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 1998, 80(3), 279-285
- B.Szponar 1,2., L.Larsson 1. Determination of Microbial Colonisation in Water-Damaged Buildings Using Chemical Marker Analysis by Gas Chromatography - Mass Spectrometry. *Indoor Air*. 2000, 10(1), 13-18
- M.Trunov, S.Trakumas, K.Willeke, S.A.Grinshpun, T.Reponen. Collection of Bioaerosol Particles by Impaction: Effect of Fungal Spore Agglomeration and Bounce. *Aerosol Science and Technology*. 2001, 34(6), 490-498
- J.P.G.Van Leuken, A.N.Swart, P.Droogers, A.Van Pul, D.Heederik, A.H.Havelaar. Climate change effects on airborne pathogenic bioaerosol concentrations: a scenarioanalysis. *Aerobiologia*. 2016, 32(4), 607-617
- A.M.Velez-Pereira. Concepción DE LINARES, Rosario DELGADO a Jordina BELMONTE. Temporal trends of the airborne fungal spores in Catalonia (NE Spain), 1995–2013. *Aerobiologia*. 2016, 32(1), 23-37

N.Von Blohn, S.K.Mitra, K.Diehl, S.Borrmann. The ice nucleating ability of pollen. *Atmospheric Research*. 2005, 78(3-4), 182-189

M.Wainwright, R.B.Hoover, A.Y.Rozanov, N.C.Wickramasinghe, J.V.Narlikar, P. Rajaratnam, J.Perkins. Bacteria in the stratosphere: confirmation of the presence of viable but noncultureable forms. 2004,.218

J.Webster, R.A.Davey, J.C.R.Turner. Vapour as the source of water in Buller's drop. *Mycological Research*. 1989, 93(3), 297-302

K.Wittmaack. Advanced evaluation of size-differential distributions of aerosol particles. *Journal of Aerosol Science*. 2002, 33(7), 1009-1025

K.Wittmaack. Brochosomes produced by leafhoppers-a widely unknown, yet highly abundant species of bioaerosols in ambient air. *Atmospheric Environment* . 2005, 39(6), 1173-1180

T.O.Womiloju, J.D.Miller, P.M.Mayer, J.R.Brook. Methods to determine the biological composition of particulate matter collected from outdoor air. *Atmospheric Environment*. 2003, 37(31), 4335-4344

S.A.Yankofsky, Z.Levin , T.Bertold, N.Sandlerman. *Journal Appl. Meteorol*. 1981, 20 1013-9
T.Zhang, G.Engling, C.Y.Chan a kol. Contribution of fungal spores to particulate matter in a tropical rainforest. *Environmental Research Letters*. 2010, 5(2), 024010

“An atlas of airborne pollen grains and common fungus spores of Canada“ by Bassett, I. John, 1978

“Atlas zur Bestimmung rezenter und fossiler Pollen und Sporen“, F. Jonas, 1952

“Atlas of Airborne Fungal Spores in Europe“by A. KäärikJ. KellerE. KifferJ. PerreauO. Reisinger, 1983

“Die Myxomyceten: Deutschlands und des angrenzenden Alpenraumes unter besonderer Berücksichtigung Österreichs.“ Band 1(Ceratiomyxales Echinosteliales Liceales Trichiales, 1993), Band 2(Physarales, 1995), Band 3(Stemonitales, 2000), by Hermann Neubert, Wolfgang Nowotny, Karlheinz Baumann

https://is.muni.cz/el/1431/jaro2014/Bi7535/um/ekolhub_7_sireni.txt

<http://www.pvl.cz/files/download/vodohospodarske-informace/vodni-dila-a-nadrze/laz.pdf>

<https://www.moldbacteria.com/>

<https://www.ncdc.noaa.gov/>