

# Aerobiología en hospitales de Guayaquil: microorganismos resistentes a cobre

Carlos Banchón<sup>1</sup>, Tamara Borodulina<sup>1</sup>, Linda Diaz<sup>2</sup>, Amano Yasuji<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ingeniería Ambiental, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Agraria del Ecuador, 59304, Av. 25 de Julio y Pio Jaramillo, Guayaquil-Ecuador

<sup>2</sup>Plataforma de Microscopía Electrónica y Confocal - Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) – Dr. Leopoldo Izquieta Pérez – Guayaquil-Ecuador

**Abstract**— the present work reports the presence of bacteria and fungi in particulate matter suspended in the exterior of three hospitals in Guayaquil, during the month of March 2019, winter time. The isolated microbial diversity was tolerant to a toxic copper concentration of 3.1 mM. From the particulate material, a greater number of bacterial than fungal species was isolated. However, the fungal species found are related to nosocomial diseases. This is a seed study that aims to lay the foundations for the characterization of microbial diversity through bioprospecting studies, based on aerodynamic factors (wind speed), climatic factors (temperature and relative humidity) and physical composition (content of dust in the air) to correlate the viability of formation of bioaerosols in particulate material in Guayaquil hospitals. Therefore, one of the objectives of the present work is the investigation of the influence of the heavy metal copper in the formulations of culture media to evaluate the microbial tolerance. And due to the potential risk of lack of air control in health institutions, the main objective of the present work is to evaluate the growth conditions of microorganisms present in the suspended particulate material surrounding three hospitals in Guayaquil.

**Index Terms**—nosocomial, pathogens, airborne, SEM

## I. INTRODUCTION

EN el año 2007, aproximadamente 1265 casos de infecciones en periodos post-operatorios fueron reportados en 75 países (Alghamdi *et al.*, 2014; Chikere, Omoni, & Chikere, 2008; Gilbert, Veillette, & Duchaine, 2010). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 55 hospitales de 14 países un 8,7% de los pacientes hospitalizados presentaban infecciones nosocomiales (Hambraeus, 1988; Lai, Emberlin, & Colbeck, 2009). Estas enfermedades son atribuidas a la carente gestión de calidad del aire, debido al movimiento browniano del material particulado que es medio de transporte de esporas microbianas (Khan, Karuppaiyil, Manoharachary, Kunwar, & Waghay, 2009). El denominado bioaerosol es material particulado suspendido en el aire portador de bacterias, hongos, virus y toxinas; y es responsable de contagio de enfermedades (Atkinson, Mills, Walton, & Anderson, 2015; Goldwater, Manoharan, & Jacobs, 1961; Jaffal, 1997; León, 2016).

Debido a su facilidad de transporte, las bacterias permanecen en el espacio aéreo durante días o semanas, el tiempo suficiente para completar ciclos reproductivos. Los bioaerosoles persisten la bruma y neblina (Marchisio, Caramiello, & Mariuzza, 1989).

Generalmente, proteobacterias y firmicutes son filos dominantes en el aire (Tormo Molina, Gonzalo Garijo, Muñoz Rodríguez, & Silva Palacios, 2002); aunque en Nueva York, existe una mayor abundancia relativa de actinobacterias (Li *et al.*, 2019). Los bioaerosoles dependen de las condiciones atmosféricas dominantes; por ejemplo, las bacterias son eliminadas de la atmósfera ya sea por deposición seca o húmeda por la adherencia a edificios, plantas, agua, superficies, el suelo y otras superficies en contacto con el aire (Smets, 2016).

En Ecuador, es inexistente una estadística actualizada sobre casos de muerte debido a contaminación hospitalaria. Se ha reportado que microorganismos como *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus coagulosa*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* son responsables de algunos casos de afectación a pacientes. A pesar de las trágicas consecuencias, nuestro país carece de estudios en Aerobiología que verifiquen las tragedias reportadas. Y es la falta de datos sobre diversidad microbiana, y el impacto del parque automotor en la calidad del aire circundante a hospitales, lo que impide tomar medidas efectivas para la inversión económica en procesos de esterilización y desinfección hospitalaria.

La actividad celular de bioaerosoles depende de condiciones ambientales y actividades humanas (Womiloju, Miller, Mayer, & Brook, 2003). Esta actividad es función del grado de contaminación del aire debido a compuestos orgánicos volátiles (COVs), gases de combustión como CO, NO<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub>, y además a metales pesados (Haas *et al.*, 2013). Por tanto, uno de los objetivos del presente trabajo es la investigación de la influencia del metal pesado cobre en las formulaciones de medios de cultivo para evaluar la tolerancia relativa de microorganismos aéreos a este metal pesado. Y debido al potencial riesgo de la falta de control del aire en centros de salud, el objetivo principal del presente trabajo se enfoca en evaluar condiciones de crecimiento de microorganismos presentes en el material particulado suspendido circundante a tres hospitales de Guayaquil.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de polvo ambiental en exteriores de tres hospitales de Guayaquil, Ecuador en época invernal. Por motivos de confidencialidad, no se incluyen detalles sobre la posición geográfica de los hospitales. El material particulado

fue tomado en cuatro puntos ubicados en las aceras de dos calles principales (avenidas en las que circula transporte público) y dos calles secundarias (con bajo flujo vehicular).

Se tomaron muestras de material particulado suspendido mediante dispositivo (casero) portátil de succión con un caudal de recolección de aire de aprox. 288 L durante 8 horas de monitoreo (Marchisio *et al.*, 1989). El material particulado (tamaño de partícula de aprox. 10  $\mu\text{m}$ ) fue recogido en portaobjetos de dimensiones 2 x 2 cm (Goldwater *et al.*, 1961). Posteriormente, la muestra fue cuidadosamente depositada en cajas Petri con los respectivos medios de cultivo.

Se formularon medios de cultivo con una concentración de cobre de 200 mg/L (3,1 mM). Además, para la bioprospección de microorganismos, de las mismas muestras de material particulado de periferias de los tres hospitales centinelas, se utilizaron placas Petrifilm® (3M, USA) para coliformes totales con indicador violeta rojo bilis. Se utilizó agar nutritivo para aislamiento de bacterias (200 mg/L sulfato de cobre, 5 g/L peptona, 1 g/L extracto de levadura, 5 g/L cloruro sódico, 15 g/L agar, a pH 7); y agar sabouraud para aislamiento de hongos (200 mg/L sulfato de cobre, agar, 15 g/L, peptona de caseína 5 g/L, cloranfenicol 0,05 g/L, dextrosa 40 g/L, digerido péptico de tejido animal 5 g/L).

Previa observación en microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL-JSM 5310, las muestras fueron fijadas con tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) durante 24 horas. Luego, se realizó una deshidratación mediante congelación con t-butanol 100%, a 25°C, durante 6 horas, aplicable para el congelado seco del espécimen. Se continuó con el montaje y pegamento de la muestra con cinta de carbón doble adhesiva, y posterior recubrimiento de la muestra con oro durante 20 segundos, lo que aumentó la emisión secundaria de electrones en la observación microscópica. Durante la observación en SEM, se tomaron fotografías con un tiempo de exposición de 100 segundos por cada foto.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se presentan los resultados de cuántas especies (en función de las diferentes morfologías de sus colonias) crecieron bajo las condiciones climáticas invernales del presente monitoreo. Según la Fig. 1, en el agar nutritivo crecieron bacterias en presencia de 200 mg/L de cobre (3,1 mM), lo cual nos permitió determinar que el medio de cultivo, a pesar de la condición tóxica, sí es medio de crecimiento de bacterias del material particulado suspendido. En ninguna de las muestras se encontró presencia de coliformes totales.

El cobre se requiere en pequeñas cantidades para el crecimiento y funcionamiento de los microorganismos ya que es un cofactor para actividades enzimáticas (Trevors & Cotter, 1990). No obstante, concentración elevada de cobre es factor para la inhibición del crecimiento microbiano. En el presente estudio, se demuestra que una concentración de 3,1 mM de cobre (II) fue insuficiente para la inhibición del crecimiento de hongos y bacterias. Por ejemplo, una concentración de 0,006 mg de  $\text{Cu}^{+2}$  es tóxica para *Aerobacter aerogenes* (Smets, 2016).

La vida del bioaerosol se caracteriza por la escasez de

nutrientes y sustratos, afectación por radiación UV, desecación, altas temperaturas y cambios de pH, así como la presencia de especies reactivas de oxígeno (León, 2016; Saadoun, Tayyar, & Elnasser, 2008). Los mecanismos de sobrevivencia microbiana se atribuyen a la reparación del ADN y defensa por pigmentación; estos mecanismos favorecen la adaptación metabólica para sobrevivir la deficiencia de hierro (Raisi, Aleksandropoulou, Lazaridis, & Katsivela, 2013; Smets, 2016). Otro mecanismo de protección bacteriana es el estado de latencia, donde las esporas se transforman morfológicamente o sufren modificaciones de su pared celular; y así ralentizar o detener su actividad metabólica (Gandolfi, Franzetti, Bertolini, Gaspari, & Bestetti, 2011; Hall *et al.*, 2001; Hambræus, 1988; Harding, 2017). Así, estas transformaciones pueden mejorar la resistencia a las tensiones físicas como la radiación UV

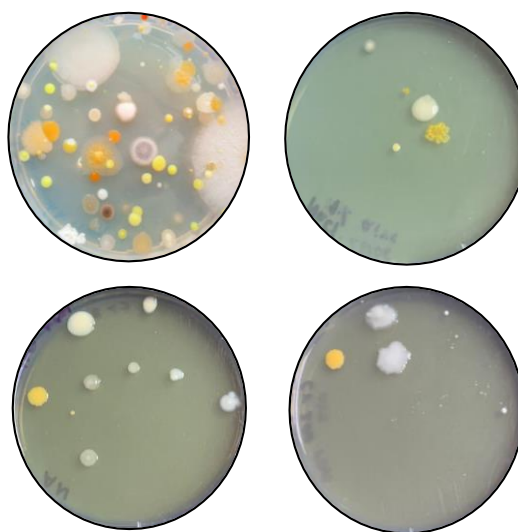


Fig. 1. Colonias de bacterias aisladas del polvo atmosférico de exteriores de hospitales de Guayaquil.

Las condiciones de humedad invernal se reportan en la Fig. 2 en función de los puntos de monitoreo de los tres hospitales y en función del conteo de diferentes especies de bacterias encontradas, según la morfología de la colonia y estructura microscópica. Se destaca el comportamiento de crecimiento de microorganismos en las vías principales con mayor tráfico vehicular. Cabe mencionar también que, no solamente es el tráfico vehicular uno de los factores que aumentan las poblaciones microbianas en el aire; también aportan el alto número de personas que se encuentran en los exteriores de los hospitales. La respiración y el derramamiento de millones de células de la piel contribuyen diariamente a los bioaerosoles en el entorno construido (Ulirsch *et al.*, 2007; Weber, 2003; Womiloju *et al.*, 2003; Xu & Yao, 2013). De hecho, la ocupación humana podría ser el factor más importante que afecte al número total y estructura comunitaria de los bioaerosoles en el entorno, especialmente en ambientes mal ventilados o muy ocupados (Prussin & Marr, 2015).

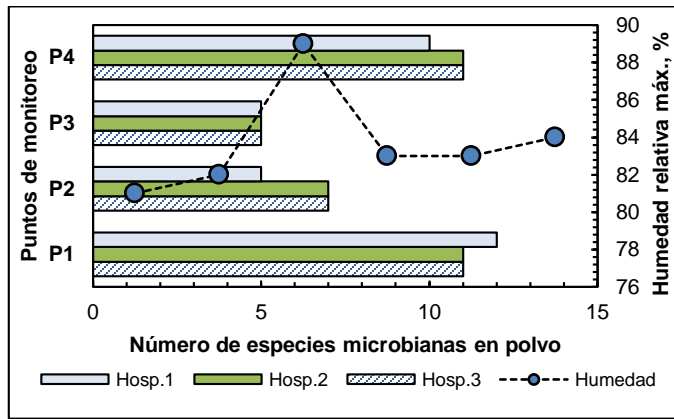


Fig. 2. Promedio de conteo de diferentes especies de bacterias en cuatro puntos de monitoreo en los exteriores de tres hospitales, en función de la humedad relativa de marzo 2019.

La Fig. 3 reporta las condiciones del viento (dirección y velocidad) en Guayaquil durante marzo de 2019, mes del respectivo monitoreo. Además, se reporta el promedio de hongos y bacterias encontrados en los tres hospitales. Se observa que los puntos 1 y 3 fueron avenidas principales, con flujo vehicular de transporte público (denominado Metrovía). Sin embargo, el conteo de hongos y bacterias no fue necesariamente alto, en referencia al punto 4 (calle secundaria); en donde se encuentran las puertas principales de los hospitales.

En el presente estudio, el conteo más alto de hongos viables fue de 24 unidades formadoras de colonias (UFC) m<sup>-3</sup> en muestras de material particulado durante 8 horas de monitoreo. Según reportes, se ha encontrado hasta una concentración promedio de hongos viables en el aire de 80 UFC m<sup>-3</sup> en muestras recolectadas de escuelas, hospitales, residencias, y naves industriales; sin embargo, en algunos casos las concentraciones fueron tan altas como 104 UFC m<sup>-3</sup> (Prussin & Marr, 2015). Especialmente en hospitales, la resuspensión de microorganismos del piso, vestimenta y muebles actúa como fuente secundaria. Estudios han demostrado que el aire exterior afecta al microbioma del aire interior (Chikere *et al.*, 2008; Gao, 2016; Prussin & Marr, 2015; Spiegelman, 1968).

Sobre la diversidad fúngica, se encontró en el hospital 1 la presencia de *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Cladosporium spp.*; en el hospital 2: *Aspergillus spp.*, *Trichoderma spp.*, *Cladosporium spp.*; y en el hospital 3: *Aspergillus spp.*,

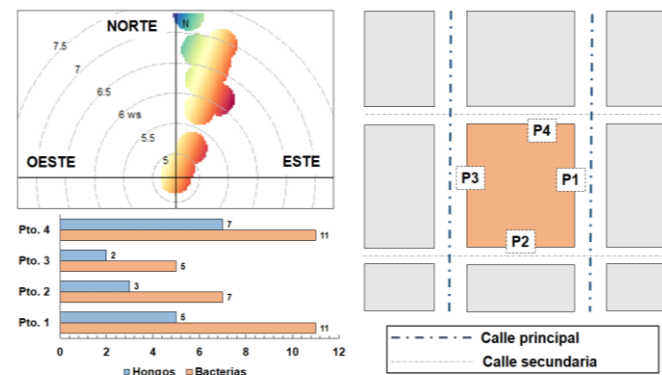


Fig. 3. Dirección y velocidad del viento en función del número de especies microbianas encontradas (hongos y bacterias), según puntos de monitoreo.

*Aureobasidium spp.*, *Cladosporium spp.* respectivamente. En el siguiente diagrama de Venn (Fig. 4), se exponen las semejanzas y diferencias del número de especies de hongos encontradas en común en los tres hospitales. Esto a manera de comparar los conjuntos de datos, y así encontrar correlaciones para predecir las probabilidades de ocurrencia de presencia de hongos en el aire. En el presente caso, *Aspergillus spp.* fue el denominador común presente en el material particulado de los tres hospitales.

Se identificó la presencia de hongos con tolerancia al cobre (metal pesado de efecto tóxico a elevadas concentraciones por encima de 0.005 mM), en meses de invierno, con una humedad relativa promedio entre 65 y 85%, sin ninguna preferencia por la dirección del viento dominante (Nornoreste).

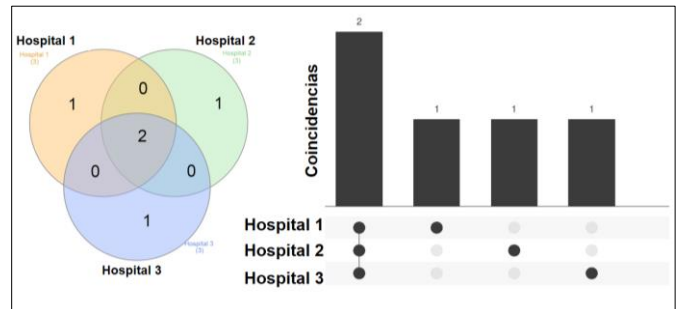


Fig. 4. Diagrama de Venn sobre semejanzas y diferencias del conteo de diferentes especies de hongos en tres hospitales.

En promedio, se determinó que el número de especies bacterianas fue mayor que el número de especies de hongos (Fig. 5). Según los resultados aquí expuestos, se argumenta que, el aumento de partículas en el aire producto de la velocidad y dirección del viento promueve el aumento de diferentes concentraciones de microorganismos en función de la época del año, condición meteorológica y ambiental. Es de vital importancia, promover estudios para evaluar la diversidad microbiana patógena en relación con el materia particulado (Haas *et al.*, 2013).

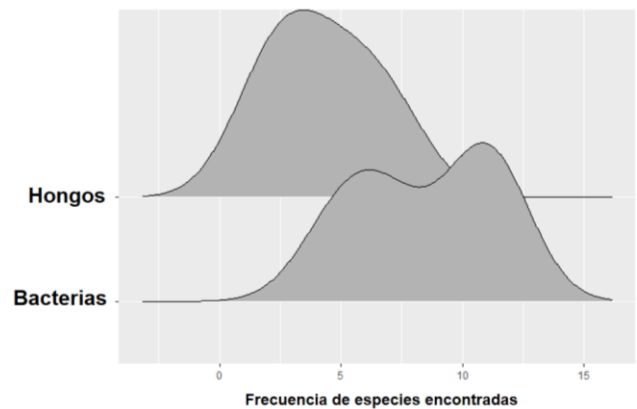


Fig. 5. Frecuencia de diferentes especies microbianas (bacterias y hongos) encontradas en tres hospitales de Guayaquil.

En Hospital 1, mediante microscopía se identificó al hongo *Fusarium spp.* (Fig. 6). Por ejemplo, es conocido que *Fusarium chlamydosporum* se ha descrito como un agente etiológico en la fungemia asociada a catéter en un paciente con linfoma linfocítico y como agente etiológico en una infección invasiva en un paciente con anemia aplásica. Las hifas son septadas e hialinas (Hambraeus, 1988). Sus conidióforos son monofialidos

y polifialidos simples o ramificados (fialidos con más de una abertura no delimitada por un tabique) (Hay, Clayton, & Goodley, 1995). Características de *Fusarium* es que los microconidios son abundantes, en forma de huso, septados, que miden 6-26 x 2-4  $\mu\text{m}$  y los macroconidios son raros, 3-5 septados, en forma de hoz, 30-38 x 3-4.5  $\mu\text{m}$  miden (Hurst & Crawford, 2007).

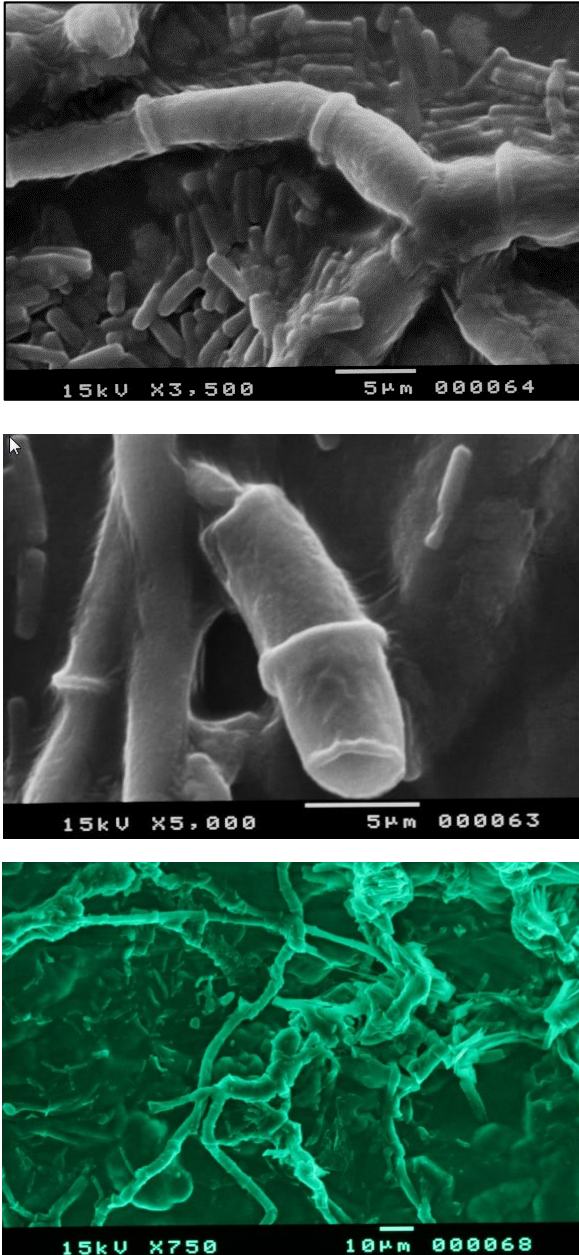


Fig. 6. Imagen SEM de hongo *Fusarium* spp.. aislado de material particulado suspendido en hospital 1.

Las colonias de hongos de la muestra P1, hospital 2, mostraron un crecimiento cubierto de masas viscosas de conidios, crema o rosa, que luego se transformaron a negras (Khan *et al.*, 2009). Las hifas son hialinas y septadas, y forman cadenas de artroconidia de una a dos células, de paredes gruesas y pigmentadas de forma oscura (Hurst & Crawford, 2007). *Aureobasidium pullulans* es un oligótrofo que se encuentra en

ambientes con fluctuaciones de actividades de agua, como ocurre en la filósfera (Zalar *et al.*, 2008).

Por ejemplo, *Aureobasidium pullulans* tiene una distribución mundial y se suele aislar como un saprófito, ocasionalmente de la piel y las uñas; también se ha descrito como un agente causal poco frecuente de phaeohyphomycosis, queratitis micótica y peritonitis en pacientes en diálisis peritoneal ambulatoria continua (Zalar *et al.*, 2008).

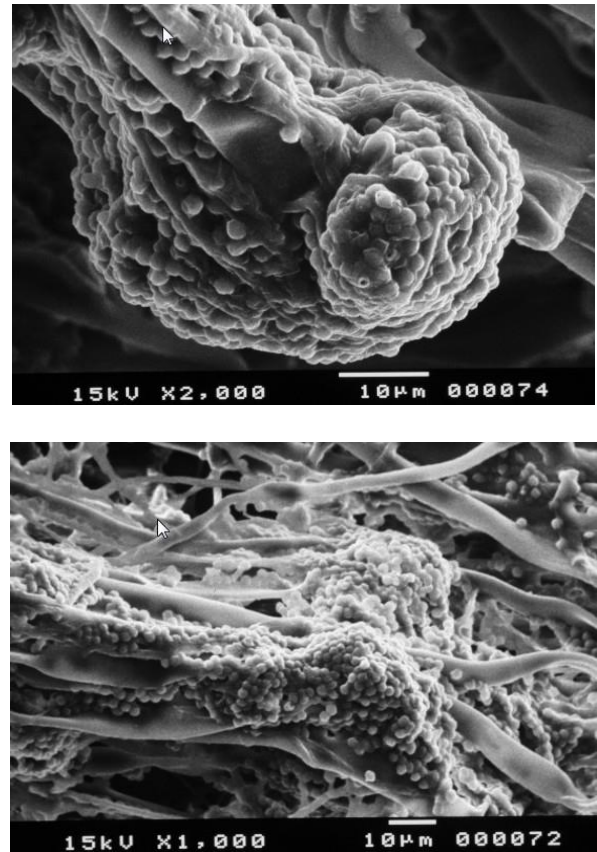


Fig. 7. Imagen SEM de especie de *Aureobasidium* en muestra P1, hospital 2.

En muestras del punto P1, del hospital 3, se aisló *Aspergillus* spp. con las características de hifas septadas e hialinas (Viegas *et al.*, 2011), mientras que los conidióforos formados del pie basal ubicada en las hifas de soporte y que terminan en una vesícula en el ápice (Lalgé, 1999). El *Aspergillus* es un hongo filamentoso y común de encontrar en la atmósfera.

Por lo general, el *Aspergillus* se aísla del suelo, residuos vegetales y del aire. Si bien se ha descrito un estado teleomórfico solo para algunas de las especies de este hongo, se acepta que otros son mitospóricos, sin ninguna producción de esporas sexuales conocida (Hurst & Crawford, 2007).



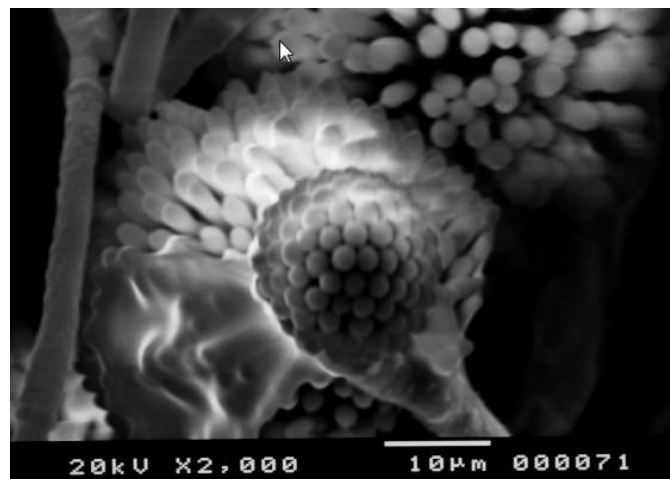
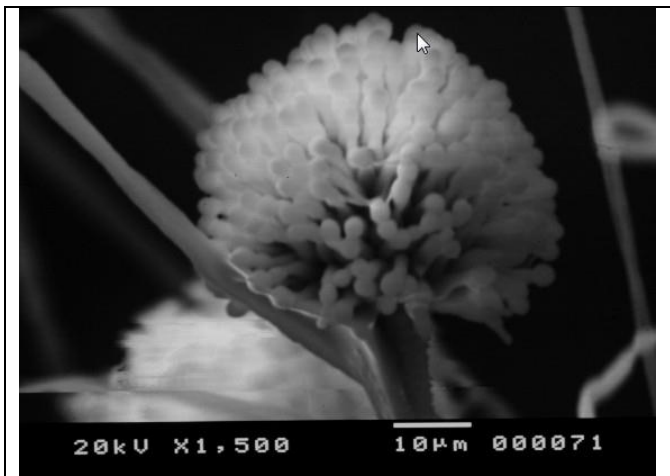


Fig. 8. Imagen SEM de especie de *Aspergillus spp.* en muestra P4, hospital 3.

#### IV. CONCLUSIONES

El presente trabajo reporta la presencia de bacterias y hongos en material particulado suspendido en exteriores de tres hospitales de Guayaquil, durante el mes de marzo de 2019, época invernal. La diversidad microbiana aislada fue tolerante a una concentración tóxica de cobre de 3,1 mM. Del material particulado, se aisló un mayor número de especies bacterianas que fúngicas. Sin embargo, las especies fúngicas encontradas se relacionan con enfermedades nosocomiales. Por tanto, se propone la concientización de autoridades en el desarrollo de protocolos y diversas estrategias para la inhibición y control de brotes de patógenos en centros de salud; así como, la caracterización de la influencia y efecto de condiciones climáticas, factores físicos y químicos en función de diversidad microbiana, especialmente patógena. Así mismo, se propone el estudio de condiciones extremas de sobrevivencia microbiana bajo efectos físicos como la radiación UV y efectos químicos como resistencia a ozono, peróxido de hidrógeno, y catalizadores como óxido de titanio y demás metales pesados.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la participación de Carlos Cepeda y Méd. Wellington Espinoza (INSPI); de la Universidad Agraria del Ecuador al Ing. Diego Muñoz e Ing. Juan José Sabando.

#### ANEXOS

Banchon, C. (2019): Fungi found in environmental air at Hospitals. Figshare. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.8572316.v1>

Banchon, C. (2019): Meteorology and collected microorganisms. Figshare. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.8785985.v1>

#### REFERENCIAS

- [1] Alghamdi, M. A., Shamy, M., Redal, M. A., Khoder, M., Awad, A. H., & Elserougy, S. (2014). Microorganisms associated particulate matter: A preliminary study. *Science of The Total Environment*, 479-480, 109-116. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.006>
- [2] Atkinson, R. W., Mills, I. C., Walton, H. A., & Anderson, H. R. (2015). Fine particle components and health—a systematic review and meta-analysis of epidemiological time series studies of daily mortality and hospital admissions. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 25(2), 208-214. <https://doi.org/10.1038/jes.2014.63>
- [3] Chikere, C. B., Omoni, V. T., & Chikere, B. O. (2008). Distribution of potential nosocomial pathogens in a hospital environment. 5.
- [4] Gandolfi, I., Franzetti, A., Bertolini, V., Gaspari, E., & Bestetti, G. (2011). Antibiotic resistance in bacteria associated with coarse atmospheric particulate matter in an urban area: Antibiotic resistance in atmosphere. *Journal of Applied Microbiology*, 110(6), 1612-1620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05018.x>
- [5] Gao, W. (2016). Characterization of Potential Pathogenic Cladosporium Exposure Risks from Heating, Ventilation and Air Conditioning (HVAC) in Two Cities, China. *Medical Mycology*, 2(3), 8.
- [6] Gilbert, Y., Veillette, M., & Duchaine, C. (2010). Airborne bacteria and antibiotic resistance genes in hospital rooms. 10.
- [7] Goldwater, L. J., Manoharan, A., & Jacobs, M. B. (1961). Suspended Particulate Matter: Dust in "Domestic" Atmospheres. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 2(5), 511-515. <https://doi.org/10.1080/00039896.1961.10662890>
- [8] Haas, D., Galler, H., Luxner, J., Zarfel, G., Buzina, W., Friedl, H., Reinthaler, F. F. (2013). The concentrations of culturable microorganisms in relation to particulate matter in urban air. *Atmospheric Environment*, 65, 215-222. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.10.031>
- [9] Hall, M. A. L., Fluit, A. C., Blok, H. E. M., Box, A. T. A., Peters, E. D. J., Weersink, A. J. L., & Verhoef, J. (2001). Control of Nosocomial Multiresistant Enterobacteriaceae Using a Temporary Restrictive Antibiotic Agent Policy. 8.
- [10] Hamraeus, A. (1988). Aerobiology in the operating room—a review. *Journal of Hospital Infection*, 11, 68-76. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(88\)90169-7](https://doi.org/10.1016/0195-6701(88)90169-7)
- [11] Harding, C. M. (2017). Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. 12.
- [12] Hay, R. J., Clayton, Y. M., & Goodley, J. M. (1995). Fungal aerobiology: How, when and where? *Journal of Hospital Infection*, 30, 352-357. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(95\)90038-1](https://doi.org/10.1016/0195-6701(95)90038-1)
- [13] Hurst, C. J., & Crawford, R. L. (Eds.). (2007). *Manual of environmental microbiology* (3. ed). Washington, DC: ASM Press.
- [14] Jaffal, A. (1997). Hospital airborne microbial pollution in a desert country. *Environment International*, 23(2), 167-172. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(97\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(97)00003-2)
- [15] Khan, A. A. H., Karuppaiyil, S. M., Manoharachary, C., Kunwar, I. K., & Waghay, S. (2009). Isolation, identification and testing for allergenicity of fungi from air-conditioned indoor environments. *Aerobiologia*, 25(2), 119-123. <https://doi.org/10.1007/s10453-009-9114-x>
- [16] Lai, K., Emberlin, J., & Colbeck, I. (2009). Outdoor environments and human pathogens in air. *Environmental Health*, 8(Suppl 1), S15. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-8-S1-S15>
- [17] Latgé, J.-P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*, 12(2), 310-350.
- [18] León, M. G. F.-D. (2016). Diversity and characterization of airborne bacteria at two health institutions. 12.
- [19] Li, H., Zhou, X.-Y., Yang, X.-R., Zhu, Y.-G., Hong, Y.-W., & Su, J.-Q. (2019). Spatial and seasonal variation of the airborne microbiome in a rapidly developing city of China. *Science of The Total Environment*, 8.
- [20] Marchisio, V. F., Caramiello, R., & Mariuzza, L. (1989). Outdoor airborne fungi: Sampling strategies. *Aerobiologia*, 5(2), 145-153. <https://doi.org/10.1007/BF02486512>
- [21] Prussin, A. J., & Marr, L. C. (2015). Sources of airborne microorganisms in the built environment. *Microbiome*, 3(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0144-z>

- [22] Raisi, L., Aleksandropoulou, V., Lazaridis, M., & Katsivela, E. (2013). Size distribution of viable, cultivable, airborne microbes and their relationship to particulate matter concentrations and meteorological conditions in a Mediterranean site. *Aerobiologia*, 29(2), 233-248. <https://doi.org/10.1007/s10453-012-9276-9>
- [23] Saadoun, I., Tayyar, I. A. A., & Elnasser, Z. (2008). Concentrations of Airborne Fungal Contamination in the Medical Surgery Operation Theaters (OT) of Different Hospitals in Northern Jordan. 1(4), 4.
- [24] Smets, W. (2016). Airborne bacteria in the atmosphere: Presence, purpose, and potential. *Atmospheric Environment*, 8.
- [25] Spiegelman, J. (1968). The effect of central air filtration and air conditioning on pollen and microbial contamination. 42(4), 10.
- [26] Tormo Molina, R., Gonzalo Garijo, M. A., Muñoz Rodríguez, A. F., & Silva Palacios, I. (2002). Pollen and spores in the air of a hospital out-patient ward. *Allergologia et Immunopathologia*, 30(4), 232-238. [https://doi.org/10.1016/S0301-0546\(02\)79126-X](https://doi.org/10.1016/S0301-0546(02)79126-X)
- [27] Trevors, J. T., & Cotter, C. M. (1990). Copper toxicity and uptake in microorganisms. 8.
- [28] Ulirsch, G. V., Ball, L. M., Kaye, W., Shy, C. M., Lee, C. V., Crawford-Brown, D., Holloway, T. (2007). Effect of particulate matter air pollution on hospital admissions and medical visits for lung and heart disease in two southeast Idaho cities. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 17(5), 478-487. <https://doi.org/10.1038/sj.jes.7500542>
- [29] Viegas, C., Ramos, C., Almeida, M., Sabino, R., Veríssimo, C., & Rosado, L. (2011, junio 21). Air fungal contamination in ten hospitals' food units from Lisbon. 127-132. <https://doi.org/10.2495/FENV110131>
- [30] Weber, R. W. (2003). Meteorologic variables in aerobiology. 12.
- [31] Womiloju, T. O., Miller, J. D., Mayer, P. M., & Brook, J. R. (2003). Methods to determine the biological composition of particulate matter collected from outdoor air. *Atmospheric Environment*, 37(31), 4335-4344. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(03\)00577-6](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(03)00577-6)
- [32] Xu, Z., & Yao, M. (2013). Monitoring of bioaerosol inhalation risks in different environments using a six-stage Andersen sampler and the PCR-DGGE method. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(5), 3993-4003. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2844-1>
- [33] Zalar, P., Gostinčar, C., de Hoog, G. S., Uršič, V., Sudhaham, M., & Gunde-Cimerman, N. (2008). Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology* 61: 21–38, 18.