

Edita: Dep.de Biología Vegetal y Ecología. UCO. ESPAÑA.

**HANDLING AND EVALUATION OF
THE DATA FROM THE
AEROBIOLOGICAL SAMPLING.**

**MANEJO Y EVALUACION DE LOS
DATOS OBTENIDOS EN LOS
MUESTREOS AEROBIOLOGICOS.**

**Unidad de Monitorizaje Aerobiológico
de la Universidad de Córdoba- España.**

**Eugenio Domínguez Vilches,
Carmen Galán Soldevilla,
Francisco Villamandos de la Torre &
Félix Infante Garcia-Pantaleón.**

Córdoba. Marzo-1.992

Monografías REA/EAN Num.1

HANDLING AND EVALUATION OF DATA OBTAINED FROM THE AEROBIOLOGICAL SAMPLING

1.0 INTRODUCTION

1.1 Purpose of the SOP

The SOP describes the method used to obtain data from aerobiological samples as quickly as possible, their storage in a specifically designed databank and how to manage as many statistically reliable conclusions as possible.

1.2 Sources and description of method collection

This SOP is based on the modifications made to the BURKARD sampling method and to the data analysis carried out by the UMA-UCO, Spain. It was developed by Prof. E. Domínguez-Vilches, Dr. C. Galán, Dr. F. Villamandos and Dr. F. Infante.

The computer and statistical analyses were developed with the Dbase IV software package. The analysis is based on the study of the pollen grains and fungal spores trapped by the BURKARD spore-trap sampler. The band is prepared according to the manufacturer's instructions with the modification described in Section 6.0.

Counting considers partial control and extrapolation expressed by Prof. J. Hirst as "Design errors and compromises".

In this study, the readings of the samples are partially carried out in partial way with four scanning of 48 x 0.45mm. The selection of this system was essentially due to two reasons:

a) As what is being sought are daily and seasonal variations, it is necessary to conti-

nuously record what occurs without considering continuity solutions.

b) By estimating the total population to be sampled as the total number of pollen from each species for a single year, the sample provides a reliable value and an acceptable estimated error for what is required. By applying the formula:

$$n = \frac{Z^2 pq N}{e^2(N-1) + Z^2 pq}$$

Being:

Z: Values of z after the level of significance.

p & q: Case probabilities (0.5 the less favorable).

e: Sampling absolute error.

N: Size population.

n: Sample size.

The result of the extrapolation implies that the data obtained from the four scanings and considering the surface of the reading with a 40x lens, must be multiplied by 12.88 for the total number of the day as well as for each hour.

1.3 Databanks

The software package used to design the databases, screens and statistical applications and programs for the computerization of the transformations, calculations of the sums and averages and standardized data was Dbase IV.

In order to easily carry out the statistical comparisons and analyses, as well as to optimize the size of the data bases, the following design was developed:

a) Databank for the seasonal variations. It is based on a two dimensional matrix in which the rows correspond to consecutive days starting in January 1982 and the columns to different variables, including the meteorological data for that day and the count of each taxa: 1 total/m³/day and 2: standardized value in thousands for the days which belong to a given taxon

b) Databank for the daily variations. It is likewise organized on a two dimensional matrix, the rows representing days and the variables corresponding to the hourly data for the pollen and a database for each taxon.

1.4 References

GALAN, C., F. INFANTE, E. RUIZ DE CLAVIJO, F. GUERRA, R. MIGUEL & E. DOMINGUEZ (1989). Allergy to pollen grains from *Amaranthaceae* and *Chenopodiaceae* in Córdoba, Spain. Annual and daily variation of pollen concentration. *Allergy* 63:1-4.

GALAN, C., J. CUEVAS, F. INFANTE & E. DOMINGUEZ (1989). Seasonal and diurnal variation of pollen from *Gramineae* in the atmosphere of Córdoba (Spain). *Allergol. et Immunopathol.* 17:245-249.

TRUJILLO, D., F. INFANTE, C. GALAN & E. DOMINGUEZ (1990). Seasonal and daily variation of *Aspergillus* Mich ex Fries spores in the atmosphere of Córdoba (Spain). *Allergol. et Immunopathol.* 18: 167-173.

TRUJILLO, D., F. INFANTE, E. DOMINGUEZ & C. GALAN (1990). Influencia del método de muestreo en los resultados de la investigación aeromicológica. Comparación de dos muestreadores volumétricos. *An. Asoc. Palinol. Leng. Esp.* 5:55-63

GALAN, C., R. TORMO, J. CUEVAS, F. INFANTE & E. DOMINGUEZ (1991). Theoretical daily variation patterns of airborne pollen in the Southwest of Spain. *Grana* 30: 201-209

2.0 APPLICABILITY

This method is currently being used for the SOP of a study entitled "Modelos de variación estacional e intradiurna de polen y esporas alergógenos" financed by the Health Research Foundation of the Spanish CICyT.

This SOP saves considerable time and does not require the operator to carry out manual

calculations. He only has to identify and count a single taxon. The data from the four scanings are directly taken from the work sheet and the program carries out the statistical calculations and presents the screens with the concentration data expressed in grains/m³/hour.

3.0 DEFINITIONS

PSG: Plastic slide grid. It has the same size of a standard microscope slide and is made from a transparent plastic sheet (used for overhead projectors) in which 24 transversal lines at 2mm intervals have been drawn with black ink (O=0.1mm) to record the deposition spaces for each hour of the day.

UMA-UCO: Aerobiological Monitoring Unit. University of Córdoba-Spain.

Sheet for data recording: This is a sheet where the 24 daily transections and the four sampling fields appear. The operator write down the name of taxon he is working with (Appendix 1).

Medical questionnaire file (Appendices 2 & 3): Medical form for the introduction of all those factors which may seasonal features and which are later statistically crossed with the pollen and spore concentration data.

Meteo file: The same but for climatic data (Appendix 4).

4.0 RESPONSIBILITIES

There is a general coordinator who oversees the aerobiological and medical teams which are made up of a:

4.1 Aerobiological team:

A scientific coordinator for each group of taxa (higher plants and fungi).

4.1.1 Three doctoral students in charge of counting the pollen grains of 1 or 2 taxa.

4.1.2 Three PhD researchers responsible for identifying and counting the fungal spores.

4.1.3 A technician in charge of introducing the data in the computer and carry out periodical security backups.

4.1.4 Two students from the Department in charge of recording the meteorological data and introducing it into the corresponding database.

4.2 Medical team:

Allergy Unit from the Cordoba University Hospital. Four physician who carry out the allergy tests and supply and control the medical records and provide the data for the medical databank.

4.3 A computer expert

Supervises all the databanks and makes any necessary change or creates the necessary software programs.

5.0 EQUIPMENT

5.1 Material

5.1.1 Three BURKARD spore traps, one on top of the School of Sciences building, another on the ground level of the same building and a third in the city center. This one is only operates in spring.

5.1.2 Microscopes

5.1.3 Compatibles PC's (AT-286 and 386) with hard disk of more than 40 Mb for aerobiological, medical and meteo databanks and data processing.

5.1.4 Word processor (Microsoft Word v.5.0) and Dbase IV programs for easy data management. Harvard Graphics for graphs elaboration importing the data from the databanks (ASCII format).

5.1.5 Printers. Every PC is attached to one or more printers for easy reading and correction of data.

5.2 Reagents

The usual recommended by BURKARD.

6.0 STANDARD OPERATING PROCEDURE

The basic sampling is carried out on a BURKARD installed on the roof of a building located in the outskirts of the city. For comparisons, there is also one at ground level and another in the city center, although it is only used in spring. Sampling is carried out weekly. The procedure and material used are those recommended by the manufacturer of the sampler with some variation aimed at improving some of the problems encountered with the HIRST type sampling method and are as follows:

6.1 Placement of the adhesive substance on the Melinex band.

In order to avoid the air bubbles which appear when the sample is deposited and to obtain as thin a sample as possible, all the instrument to be used, including the drum, the substance itself and the thick application brush, are placed for 1 hour in an oven at 60°C. Once this temperature is reached, they are taken out of oven and immediately applied, by slightly and continuously turning the drum without stopping. This way, a very fine and uniformed layer is obtained.

6.2 Mounting of the preparations.

Once the layers corresponding to each day are cut and mounted on the slides with the fusine-jelly, they are placed between two pieces of glass slightly bigger than the slide and a thickness of approximately 4mm. They are then clipped with two clothes pins until the gel solidifies. In this way, the preparation turns out very thin and all the residual gel is eliminated, thus permitting a better observation in the microscope with any type of lens.

6.3 Identification and counting.

In order to determine the precise time counting was carried out, the PSG is placed under the slide and held down by tape on the tips before the observation in the microscope is undertaken.

7.0 RECORDS

The counts can be directly introduced into the database or first recorded on a data sheet

(Appendix 5). The computer automatically transforms the data to grains/m³/hour.

7.1 Location/Placement of forms

All the data are first analyzed by the aerobiological team and then compared with the medical team. Simultaneously and on a weekly

basis, the information is sent to Vienna (European Pollen Information Network) via fax so they can include it in the network for the prevention of pollenosis, and which as of next spring will start publishing, initially with grasses, a European prediction map.

MANEJO Y EVALUACION DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LOS MUESTREOS AEROBIOLOGICOS

1.0 INTRODUCCION

1.1 Propósito del Procedimientos de operaciones estandard (SOP).

Este SOP describe el procedimiento de obtención de datos procedentes de los muestreos aerobiológicos con el mínimo gasto de tiempo posible, su almacenamiento en un banco de datos con estructura propia y el manejo de dichos datos para obtener el máximo de conclusiones estadísticamente fiables.

1.2 Fundamento y descripción del método de muestreo.

Este SOP tiene como fundamento, las modificaciones al método de muestreo BURKARD y el de análisis de datos realizado por la UMA-UCO-Spain y ha sido desarrollado por el Prof.E.Domínguez-Vilches y los Dres. C.Galán, F.Villamandos y F.Infante.

El método de tratamiento informático y análisis estadístico usa como punto de partida el paquete Dbase IV y ha sido desarrollado por nosotros.

Nuestros análisis se basan en el estudio de los granos de polen y las esporas de hongos captadas mediante el uso del BURKARD spore-trap sampler, donde la cinta captadora se prepara siguiendo las instrucciones del fabri-

cante con algunas modificaciones como se relata en 6.0.

Los conteos tienen en cuenta los fundamentos del control parcial y extrapolación expresados por el Prof.J.Hirst que tienen en cuenta el "Desing errors and compromises".

En nuestro caso, la lectura de la muestra se efectúa de forma parcial realizando cuatro barridos de 48 x 0.45mm. La elección de este sistema se debe esencialmente a dos razones:

a) Al ir buscando variaciones tanto intradiurnas como estacionales, necesitamos un registro continuo de lo que ocurre sin soluciones de continuidad.

b) Estimando la población total a muestrear como el número total de polen de cada especie durante un año, la muestra que tomamos nos da un valor de fiabilidad y un error estimado aceptables a nuestras pretensiones. Aplicando la fórmula:

$$n = \frac{Z^2 pq N}{e^2(N-1) + Z^2 pq}$$

Siendo:

Z: Valores de z según el nivel significación.
p & q: Probabilidad (0.5 para la menos favorable).

e: Error absoluto del muestreo.

N: Tamaño de la población.

n: Tamaño de la muestra.

El resultado de nuestra extrapolación significa que los datos obtenidos en la suma de estos cuatro barridos y teniendo en cuenta la superficie de lectura de un objetivo de 40x deben ser multiplicados por 12.88, tanto para el total del día como para cada hora.

1.3 Banco de datos.

El software utilizado en todas las operaciones es Dbase IV, sobre el que se confeccionan tanto las bases de datos y pantallas, como las aplicaciones y programas estadísticos para conseguir la automatización de las transformaciones, cálculo de sumatorios y medias y obtención de datos estandarizados.

Con objeto de poder realizar cómodamente las comparaciones y análisis estadísticos, así como optimizar los tamaños de las bases de datos, llegamos pasando por una serie de pasos intermedios a la confección de dos tipos finales de estas:

a) Banco de datos para las variaciones estacionales. Se estructuran en una matriz bidimensional en las que las filas corresponden a días consecutivos desde enero de 1982, y las columnas corresponden a las diferentes variables, que incluyen datos meteorológicos del día y conteos para cada taxon: 1 total/m³/día y 2: valor estandarizado en tanto por mil para aquellos días que pertenecen a la sesión de ese taxon.

b) Banco de datos para las variaciones intradiurnas. Se organizan igualmente en forma de matriz bidimensional, representando las filas días pero, correspondiendo las variables a lo datos hora a hora del polen y una base de datos para cada taxon.

1.4 Referencias

GALAN, C., F. INFANTE, E. RUIZ DE CLAVIJO, F. GUERRA, R. MIGUEL & E. DOMINGUEZ (1989) Allergy to pollen grains from Amaranthaceae and Chenopodiaceae in Córdoba, Spain. Annual and daily variation of pollen concentration. *Allergy* 63:1-4.

GALAN, C., J. CUEVAS, F. INFANTE & E. DOMINGUEZ (1989) Seasonal and diurnal variation of pollen from Gramineae in the atmosphere of Córdoba (Spain). *Allergol. et Immunopathol.* 17:245-249.

TRUJILLO, D., F. INFANTE, C. GALAN & E. DOMINGUEZ (1990) Seasonal and daily variation of *Aspergillus Mich ex Fries* spores in the atmosphere of Córdoba (Spain). *Allergol. et Immunopathol.* 18: 167-173.

TRUJILLO, D., F. INFANTE, E. DOMINGUEZ & C. GALAN (1990) Influencia del método de muestreo en los resultados de la investigación aeromicológica. Comparación de dos muestreadores volumétricos. *An. Asoc. Palinol. Leng. Esp.* 5:55-63

GALAN, C., R. TORMO, J. CUEVAS, F. INFANTE & E. DOMINGUEZ (1991) Theoretical daily variation patterns of airborne pollen in the Southwest of Spain. *Grana* 30: 201-209

2.0 APLICABILIDAD

Este método se utiliza actualmente para el SOP del estudio titulado "Modelos de variación estacional e intradiurna de polen y esporas alergógenos" financiado por la Fundación para la Investigación Sanitaria de la CICYT.

Este SOP permite un ahorro considerable de tiempo y no necesita de la realización de cálculos por parte del operador que sólo tiene que como misión la identificación y conteo de un sólo taxon. Los datos de los 4 barridos se introducen en bruto desde la hoja de trabajo y es el propio programa el encargado de realizar los cálculos estadísticos y producir las pantallas con los datos de concentraciones expresadas en granos/m³/hora.

3.0 DEFINICIONES

PSG: Regleta de plástico reticulada. Es una pieza del mismo tamaño que el portaobjetos de tamaño standard de material plástico transparente (tiras de acetato para overhead transparencias) en las que se trazan con tinta china (= 0.1mm) 24 líneas paralelas transversales a intervalos de 2mm que cubren los espacios de deposición de cada hora del día.

UMA-UCO: Unidad de Monitorizaje Aerobiológico de la Universidad de Córdoba-España.

Hoja de toma de datos: Es una hoja donde aparecen los 24 transectos diarios y los cuatro campos donde se realizan los muestreos. El operador marca a su vez el taxon con el que está trabajando (Apéndice1).

Archivo del Cuestionario Médico (Apéndices 2&3): Ficha médica para la introducción de todos aquellos factores que puedan marcar una estacionalidad y que luego se cruzarán estadísticamente con los datos de concentración de polen y esporas.

Archivo meteo: Igual pero con los datos climáticos (Apéndice 4).

4.0 RESPONSABILIDADES

Existe un coordinador general del que dependen los subgrupos aerobiológicos y médico que a su vez están formados por:

4.1 Equipo Aerobiológico:

Un coordinador científico para cada grupo de taxones (Plantas Superiores y hongos).

4.1.1 Tres técnicos a nivel de estudiantes de doctorado responsables del conteo de los granos de polen de 1/2 taxones.

4.1.2 Tres investigadores a nivel de Postdoctorado responsables de la identificación y conteo de las esporas de los hongos.

4.1.3 Un técnico encargado de la introducción de los datos en el ordenador y de la producción regular de copias de seguridad.

4.1.4 Dos alumnos internos encargados de la recogida de datos meteorológicos y su introducción en la base de datos correspondiente.

4.2 Equipo médico

Unidad de Alergia del Hospital Universitario de Córdoba. Cuatro Doctores que atienden a los enfermos que acuden a dicha unidad, realizan los test de alergias, suministran y controlan las cartillas médicas y proveen de datos al banco de datos médico.

4.3 Experto en ordenadores

Supervisa todas las tareas de crecimiento del banco de datos y modifica y crea el software necesario.

5.0 EQUIPOS

5.1 Materiales

5.1.1 Tres BURKARD spore traps, uno en lo alto del edificio de la Facultad de Ciencias, otro al nivel del suelo en el mismo lugar y un tercero en el Centro de la Ciudad activo sólo en primavera.

5.1.2 Microscopios

5.1.3 PCs Compatibles (AT-286 y 386) con disco duro al menos de 40 Mb para el procesamiento de los datos aerobiológicos, médicos y meteorológicos.

5.1.4 Procesador de textos (Microsoft Word v.5.0) y programa Dbase IV para el manejo de los datos. Harvard Graphics para la elaboración e importación de los datos con objeto de construir las gráficas (en formato ASCII).

5.1.5 Impresoras. Cada PC está conectado al menos a una impresora para la lectura y corrección de los datos.

5.2 Reactivos

Los recomendados por BURKARD.

6.0 PROCEDIMIENTO DE OPERACIONES ESTANDAR

El muestreo básico se lleva a cabo en un BURKARD instalado en lo alto de un edificio en las afueras de la ciudad. Con fines comparativos existe otro a nivel del suelo y otro en el centro de la ciudad que sólo se activa en primavera. La toma de muestra se lleva a cabo semanalmente. El procedimiento y materiales utilizados son los recomendados por el fabricante del muestreador con algunas modificaciones tendentes a mejorar algunos de los problemas derivados de los que adolecen los muestreadores tipo HIRST y que a continuación se detallan:

6.1 Colocación de la substancia adhesiva sobre la cinta de Melinex.

Con objeto de evitar los grumos que se ocasionan al depositarla y que sea lo mas delgada posible, todo el instrumental a utilizar,

esencialmente el tambor la propia substancia y el pincel grueso de aplicación se colocan durante 1 hora en un horno a 60°C. Una vez alcanzada la temperatura, se sacan del horno llevándose a cabo la aplicación inmediatamente girando el tambor lentamente pero sin interrupción. Con este sistema se obtiene una capa muy fina y uniforme.

6.2 Montaje de las preparaciones.

Una vez cortadas las tiras correspondientes a cada día y montadas sobre el PORTA con la fushina-jelly, se coloca el portaobjetos a modo de sandwich entre dos trozos de vidrio ligeramente mayores que el portaobjetos y de un grosor de unos 4 mm, aprisionándose el conjunto mediante dos pinzas de la ropa hasta que la gelatina se solidifique. El resultado es una preparación de escaso grosor donde se ha eliminado el exceso de gelatina lo que permite una mejor observación al microscopio con cualquier tipo de objetivo.

6.3 Identificación y conteo.

Para facilitar la situación de los conteos en una hora determinada, se coloca antes de la

observación al microscopio en la parte inferior del porta el PŞG que se une a este por los bordes mediante unos trozos de papel adhesivo.

7.0 DATOS

Los conteos se incluyen directamente en el ordenador, o se anotan en una hoja de toma de datos para su posterior volcado a la base de datos (Apéndice 5) realizándose automáticamente la transformación a granos/m³/hora.

7.1 Situación/Disposición de formularios

Todos los datos son evaluados primero por el equipo aerobiológico y posteriormente comparados con los del equipo médico. Al mismo tiempo, y con una cadencia semanal se envían a Viena (European Pollen Information Network) vía fax con objeto de integrarlos en la red de prevención de polinosis, la cual producirá a partir de la próxima primavera un mapa europeo de predicción empezando por las *Gramíneas*.

AEROMYCOLOGICAL SAMPLING METHODOLOGY

1.0 INTRODUCTION

1.1 Purpose of the SOP (operating procedures)

These SOP describe the procedures used to obtain data from samples of fungi present in different indoor and outdoor substrata (household dust, stored grain and air), through their isolation in culture media.

The techniques described are those used by the aeromycological team headed by Dr. Félix Infante-García-Pantaleón and made up by Dr. Carmen Galán-Soldevilla, Dr. Julia Angu-

lo-Romero, Dolores Trujillo-Jurado and Ana Mediavilla-Molina, all under the direction of Dr. Eugenio Domínguez-Vilches, Head of the Botanical Division of the Department of Plant Biology and Ecology of the University of Cordoba (Spain).

1.2 Sources of the method

These SOP are based on the capacity of the fungal spores and other propagules to germinate, develop the mycelium and sporulate in a suitable artificial culture medium. They facilitate the microscopic study of the colonies and enable the identification of the species.

It is necessary to taken into account that fungal species are affected by the acidity, nutrients and water content of the culture medium, hence, there is no medium in which all fungi can develop equally well. Indeed, it is advisable to use a wide range medium since it permits the collection of a greater number of species and at the same time does not markedly alter the final results.

1.3 Description of collection method

The collection method will vary depending on the substrata from which the fungi are to be isolated.

1.3.1. Household dust. The samples were taken with a portable vacuum cleaner. Both the filter and the dust particles were collected, stored in a sterile plastic bag, sealed and adequately labeled until it was processed in the laboratory (according to the direct sowing method described in Section 5.1.1). After each collection, the vacuum cleaner is cleaned with 70% alcohol in order to avoid contamination.

1.3.2 Stored seeds. For the study of fungi in stored grain and seeds for human consumption, the samples (wheat, soybean and sunflower) were directly taken in the silos, sheds, sacks, etc. and then placed in sterile plastic bags. Once sealed and suitably labeled, they were stored in a cold chamber at 5°C until they were processed (according to the dilution method described in Section 5.1.2).

1.3.3 Air. These SOP entailed two methods, both with the same end, the determination of the CFU's (Colony formation units) on a culture medium which permits their germination and development of a mycelium capable of sporulating. Their analysis provides more taxonomic information of the material collected and consequently, a better understanding of the the data obtained.

1.3.3.1 Gravimetric Method. It is based on the capacity of suspended air particles to deposit themselves on a horizontal surface through the force of gravity. The apparatus used in this method is cheap and easy to carry. The results cannot be set forth quantitatively as it is not possible to express them as

a unit of air volume. Moreover, it is affected very much by the size of the spores and the turbulences since the deposition usually decreases as the speed of the wind increases. These characteristics make it recommendable for indoor studies, in simultaneous sampling and when several habitats want to be compared.

1.3.3.2 Volumetric Method. This system is based on the impact that a known volume of air has on a given surface. The most interesting aspect of this method is that it permits the determination of the amount of CFU's present in the atmosphere per unit of air volume. Albeit, it has certain inconveniences such as the price, size and dependence on an electrical source of the apparatus. It is also less suitable to carry and does not permit the simultaneous studies of different sites.

2.0 APPLICABILITY

These methods are being used in different research projects, some of which are financed by Government Agencies. Several of the results of these researchs are included in the references (6.2).

Since they form part of different studies, these SOP will not consider the computer or statistical methodologies being used in each specific case, as these depend on the objectives proposed and on the data obtained.

3.0 DEFINITIONS

SOP: Operating procedures. Techniques used in our studies.

CFU: Colony formation unit. Any type of fungal propagule capable of forming a colony in an artificial culture medium.

MEA: Malt extract agar 2 %. A wide range mycological culture medium, on which many types of fungal species can grow.

BIAS: Biological air sampler: Volumetric trap used in aeromycology and described in Section 5.1.3.2.

4.0 EQUIPMENT

4.1 Materials

BIAS. Portable meteorological station. Autoclave. Laminar flow cabinet. Stoves. Optic microscopes and lenses. Glassware and other small material. PC computers and printers. Software (word processor, graphics program, database and statistical programs, etc.).

4.2 Reagents

4.2.1 Culture media. Malt extract agar 2 % (TUIE, 1969). Malt extract agar 5 % (JOLY, 1964). Czapek agar 30 % saccharose (RAPER & FENNELL, 1965). Potato dextrose agar (TUIE, 1969). Sabouraud agar (TUIE, 1969).

4.2.2 Others. Tween 80. Blue cotton lactophenol.

5.0 OPERATING PROCEDURE

5.1 Sampling

5.1.1 Household dust. The "Direct sowing" method consists in weighing a given amount of dust (10 mg) free of hairs, fibers, fabrics, dirt, sand, etc. The 10 mg are more or less evenly spread throughout the surface of the culture medium (MEA) contained in Petri dishes (140 mm in diameter). Once labeled, sealed with sealing tape and incubated in a downright position for approximately seven days, the number of colonies are counted, isolated in axenic cultures and identified.

5.1.2 Stored seeds. A modified "dilution method" (LACEY & DUTKIEWICZ, 1976) was carried out. A sample of 5 g of grain mixed with 5 ml of saline solution was used. The mixture was shaken and diluted at a ratio of 1/10. From this solution, 1 ml is transferred with a pipette and inoculated in a Petri dish (9 mm in diameter) containing MEA. The same process described in Section 5.1.1 is followed until the colonies are identified.

5.1.3 Air.

5.1.3.1 Gravimetric method. One of the most commonly found methods described in the literature was used. That is, the exposure of the sample for 20 minutes in Petri dishes containing culture medium (MEA). The same process mentioned in Section 5.1.1 was used until the colonies were identified.

5.1.3.2 Volumetric method. The trap used was the BIAS, a modification of Bourdillon's apparatus. It is made up of a vacuum pump which suction the air through a collector which end in an opening that makes the sample fall into a Petri dish (140 mm in diameter) containing MEA and where the UFC's will adhere. The pump turns completely during suctioning time which can be previously determined (20 minutes). The same procedure described in Section 5.1.1 is followed until the colonies are identified.

5.2 Identification.

In order to determine the colonies, a macroscopic study of their characteristics is necessary (texture, size, shape, color, odor, exudates, pigments, habit, etc). The optical microscopic study is then carried out by placing a preparation of water or blue cotton lactophenol between the slide and slide cover. This technique lets us determine the morphology of the hypha and perdurable and reproduction structures. In species with very intense sporulation, it is advisable to mix Tween 80 diluted to 0'03 % with part of the colony in a tube. Due to the tensoactive properties of Tween, the preparations will be much more transparent.

Other techniques which can also help in the identification of the colony, is the preparation of microcultures following the technique described by DADE & GUNNELL (1969).

Many bibliographical references can be given for the identification of the colony, however, the essential for most genera capable of growing in culture medium are: GILMAN (1963), SIMMONS (1967), ELLIS (1971, 1976), BARNET & HUNTER (1972), LANIER & col.(1978), CARMICHEL & col.(1980), ARX (1981).

6.0 REFERENCES

6.1 Cited in the text

ARX, J.A. (1981). The genera of fungi sporulating in pure culture. J.Cramer.

BARNET, H.L. & B.B. HUNTER (1972). *Illustrated genera of imperfect fungi*. Burgess Publishing Company.

CARMICHEL, J.W., W.B. KENDRICK, I.L. CONNERS & L. SIGLER (1980). *Hyphomycetes*. University Alberta Press.

DADE, H.A. & J. GUNNELL (1969). *Class work with fungi*. C.A.B.

ELLIS, M.B. (1971). *Dematiaceous hyphomycetes*. C.M.I.

ELLIS, M.B. (1976). *More Dematiaceous hyphomycetes*. C.M.I.

GILMAN, J.C. (1963). *Manual de los hongos del suelo*. Compañía Editorial Continental.

JOLY, P. (1964). *Le genre Alternaria*. Paul Lechevalier.

LACEY J. & J. DUTKIEWICZ (1976). *Methods for examining the microflora of moulding hay*. *J. Appl. Bact.* 41:13-27.

LANIER, L., P. JOLY, P. BONDOUX & A. BALLAMERE (1978). *Mycologie et Pathologie forestières. I. Mycologie forestière*. Masson.

RAPER, K.B. & D.I. FENNELL (1965). *The genus Aspergillus*. Williams & Wilkins.

SIMMONS, E.G. (1967). *Tipification of Alternaria, Stemphylium and Ulocladium*. *Mycol.* 59:67-92.

TUITE, J. (1969). *Plant pathological methods, fungi and bacteria*. Burgess Publ.

INFANTE, F., E. RUIZ DE CLAVIJO, C. GALAN & E. DOMINGUEZ (1987). *Estudio comparativo de Alternaria Nees ex Fries. en el aire de exterior e interior en la ciudad de Córdoba*. *An. Asoc. Palinol. Lengua Española* 3:5-11.

INFANTE, F., E. DOMINGUEZ, E. RUIZ DE CLAVIJO & C. GALAN (1987). *Incidence of Alternaria Nees ex Fries. in dwelling of Córdoba City (Spain)*. *Allergol. Immunopathol.* 15(4):221-224.

INFANTE, F. & E. DOMINGUEZ (1988). *Annual variation of Cladosporium spores in home habitats in Córdoba, Spain*. *Ann. Allerg.* 60(3):256-261.

INFANTE, F., C. GALAN, E. DOMINGUEZ & E. RUIZ DE CLAVIJO (1988). *Contribución al estudio aeromicológico de la atmósfera de la ciudad de Córdoba*. *Género Cladosporium Link ex Fr. Rev. Ibérica Micol.* 5(3):118-126.

TRUJILLO, D., F. INFANTE, C. GALAN & E. DOMINGUEZ (1990). *Seasonal and Daily variation of Aspergillus Mich. ex Fr. spores in the atmosphere of Córdoba (Spain)*. *Allergol. Immunopathol.* 18(3):167-173.

TRUJILLO, D., F. INFANTE, E. DOMINGUEZ & C. GALAN (1990). *Influencia del método de muestreo en aeromicrología: comparación de dos muestreadores volumétricos*. *An. Asoc. Palinol. Lengua Española* 5:53-61.

6.2 Other

METODOLOGÍA DEL MUESTREO AEROMICOLÓGICO

1.0 INTRODUCCION

1.1 Propósito del SOP (procedimiento operativo)

Este SOP describe los procedimientos para la obtención de datos procedentes de muestreos de hongos presentes en diferentes substratos tanto de interior como de exterior (polvo doméstico, semillas almacenadas y ai-

re), mediante su aislamiento en medios de cultivo.

Estas técnicas son las empleadas por el equipo aeromicológico dirigido por el Dr. Félix Infante García-Pantaleón y cuyos miembros son las Dras.: Carmen Galán Soldevilla y Julia Angulo Romero, y las Lcdas.: Dolores Trujillo Jurado y Ana Mediavilla Molina, todos ellos bajo la dirección del Dr. Eugenio Domínguez Vilches, jefe de la División de Botánica

del Departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de Córdoba (España).

1.2 Fundamento del método

Este SOP se fundamenta, en la capacidad de las esporas de hongos y otros propágulos fúngicos, de germinar, desarrollar el micelio y esporular en un medio de cultivo artificial adecuado. A partir de este se podrá abordar un estudio microscópico de las colonias desarrolladas, lo que permitirá la identificación de la especie a la que corresponde.

Hay que contar, con que las especies fúngicas están influenciadas por la acidez, nutrientes y contenido en agua del medio de cultivo utilizado, por lo que no existe ningún medio en el cual todos los hongos puedan desarrollarse igualmente bien, por ello es conveniente la utilización de un medio de amplio espectro, que nos permita la recolección de un mayor número de especies y nos altere los resultados lo menos posible, pues el medio utilizado condicionará los datos finales.

1.3 Descripción del método de recolección

Según el substrato del cual se quieran aislar los hongos, variará el método de recolección.

1.3.1 Polvo doméstico. Para ello utilizamos una aspiradora portátil. Tras el muestreo, el filtro y el polvo recogido en él, se guarda en bolsas de plástico estériles selladas y rotuladas convenientemente, para su posterior procesado en el laboratorio (método de siembra directa descrito en 5.1.1). Tras la recogida de cada muestra, se limpia la aspiradora con alcohol al 70 %, con el fin de evitar contaminaciones de una recogida a otra.

1.3.2 Semillas almacenadas. Para el estudio de la presencia de hongos en grano y semillas almacenadas para el consumo, se tomaron muestras ("trigo", "soja" y "girasol") directamente de los silos, tolvas, sacos, etc, en bolsas de plástico estériles; éstas, una vez selladas y rotuladas convenientemente, se guardan en el frigorífico a unos 5°C hasta el momento de su procesado (método de las diluciones descrito en 5.1.2).

1.3.3 Aire. En este SOP, describimos dos métodos, ambos con el mismo fin, recoger las UFC (unidades formadoras de colonias) sobre un medio de cultivo que permita su germinación y posterior desarrollo, para formar un micelio capaz de esporular, lo que permite un mayor conocimiento taxonómico del material recolectado y por tanto una mayor precisión en los datos obtenidos.

1.3.3.1 Método gravimétrico. Se fundamenta en la capacidad que tienen las partículas suspendidas en el aire, de depositarse por acción de la gravedad sobre una superficie horizontal. Es barato y de fácil transporte; por otra parte no permite expresar resultados de forma cuantitativa, al no poder referir los resultados a unidad de volumen de aire; además se ve muy afectado por el tamaño de las esporas y las turbulencias, pues al aumentar la velocidad del viento, la deposición queda disminuida. Todas estas características hacen que se recomiende para estudios de interiores, y concretamente para realizar muestreos simultáneos y poder comparar varios hábitats.

1.3.3.2 Método volumétrico. Consiste en hacer incidir un volumen conocido de aire sobre una superficie. El mayor interés de este sistema es que permite conocer la cantidad de UFC presentes en la atmósfera por unidad de volumen de aire. En contra, estos sistemas se ven afectados por su precio, tamaño y dependencia de una fuente eléctrica, lo que los hacen menos indicados para su transporte y estudios simultáneos en varios sitios.

2.0 APLICABILIDAD

Estos métodos los usamos para diferentes estudios, algunos de ellos financiados por organismos oficiales, y como resultados de algunos de ellos se encuentran publicados los artículos que se reseñan en la bibliografía (6.2).

Por tratarse de trabajos diversos, no dedicamos en este SOP ningún apartado a metodología informática ni estadística, pues en cada caso particular se ha actuado de una manera diferente según los objetivos propuestos y los datos obtenidos.

3.0 DEFINICIONES

SOP: Técnica utilizada en nuestros trabajos.

UFC: Unidades formadoras de colonias. Cualquier tipo de propágulo fúngico capaz de formar una colonia en medio de cultivo artificial.

AEM: Agar extracto de malta al 2 %. Medio de cultivo micológico de amplio espectro, sobre él pueden crecer muchas de las especies de hongos que lo hacen sobre medio de cultivo.

BIAS: Biological air sampler: Captador volumétrico utilizado en aeromicrología y descrito en el capítulo 5.1.3.2.

4.0 EQUIPO

4.1 Materiales

BIAS. Estación meteorológica portátil. Autoclave. Cabina de flujo laminar. Estufas. Microscopio óptico y lupas. Pequeño material y fungible. Equipo informático (Compatibles PCs e impresoras). Software (procesador de textos, programa de gráficos, base de datos, paquete estadístico, etc).

4.2 Reactivos

4.2.1 Medios de cultivo. Agar extracto de malta 2 % (TUIITE, 1969). Agar extracto de malta 5 % (JOLY, 1964). Agar Czapek 30 % sacarosa (RAPER & FENNELL, 1965). Patata dextrosa agar (TUIITE, 1969). Sabouraud agar (TUIITE, 1969).

4.2.2 Otros. Tween 80. Lactofenol azul de algodón.

5.0 PROCEDIMIENTO OPERATIVO

5.1 Muestreo

5.1.1 Polvo doméstico. El método de "siembra directa", consiste en pesar una determinada cantidad de polvo (10 mg) desprovista de pelos, fibras textiles, partículas groseras de tierra, arena, etc. Posteriormente los 10 mg se reparten más o menos uniformemente por la superficie del medio de cultivo (AEM) contenido en cajas de Petri (140 mm de diámetro). Estas se rotulan, sellan con parafilm, y se incuban en posición invertida durante unos siete

días, transcurridos los cuales se procede al conteo de las colonias desarrolladas, a su aislamiento en cultivos asépticos y a su identificación.

5.1.2 Semillas almacenadas. Utilizamos una modificación del "método de las diluciones" (LACEY & DUTKIEWICZ, 1976). Tomamos 5 g de muestra de grano que se mezclan con 5 ml de solución salina, se agita la mezcla y se diluye 1/10. De dicha solución se pipetea 1 ml que se inocula en una placa de Petri (9 mm de diámetro) conteniendo AEM. Estas siguen el mismo proceso que en el caso anterior (5.1.1) hasta la identificación de las colonias.

5.1.3 Aire

5.1.3.1 Método gravimétrico. Nosotros utilizamos uno de los métodos más citados en la bibliografía, la exposición durante 20 minutos de cajas de Petri conteniendo medio de cultivo (AEM). Estas siguen el mismo proceso que en el caso anterior (5.1.1) hasta la identificación de las colonias.

5.1.3.2 Método volumétrico. El captador empleado por nosotros es el BIAS, modificación del aparato de Bourdillon. Consiste en una bomba de vacío que succiona el aire a través de un colector, este termina en hendidura y lo hace incidir sobre una caja de petri (140 mm de diámetro) que contiene AEM y donde quedarán adheridas las UFC. Esta da una vuelta completa durante el tiempo de succión, que puede ser determinado previamente (20 minutos). Las placas siguen el mismo proceso que en el caso anterior (5.1.1) hasta la identificación de las colonias.

5.2 Identificación

Para la determinación de las colonias, es preciso un estudio macroscópico de sus características (textura, tamaño, forma, color, olor, exudados, pigmentos, hábito, etc). Posteriormente se realiza el estudio al microscopio óptico mediante la realización de preparaciones, con agua o lactofenol azul de algodón, entre porta y cubreobjetos. Esta técnica nos permitirá conocer la morfología de hifas y estructuras perdurantes y de reproducción. En especies con esporulación muy intensa es conveniente mezclar en un tubo, Tween 80 diluido al 0'03 % con un trozo de la

colonia; debido a las propiedades tensoactivas del Tween, las preparaciones serán mucho más claras.

Otras técnicas que pueden usarse para ayudar a la identificación es la preparación de microcultivos según la técnica de DADE & GUNNELL (1969).

Muchas referencias bibliográficas pueden darse para la identificación, pero como citas básicas para la mayoría de los géneros que crecen en medio de cultivo, son: GILMAN (1963), SIMMONS (1967), ELLIS (1971, 1976), BARNET & HUNTER (1972), LANIER & col.(1978), CARMICHEL & col.(1980), ARX (1981).

6.0 BIBLIOGRAFIA

6.1 Citadas en el texto.

ARX, J.A. (1981). The genera of fungi sporulating in pure culture. J.Cramer.

BARNET, H.L. & B.B. HUNTER (1972). Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Company.

CARMICHEL, J.W., W.B. KENDRICK, I.L. CONNERS & L. SIGLER (1980). *Hyphomycetes*. University Alberta Press.

DADE, H.A. & J. GUNNELL (1969). Class work with fungi. C.A.B.

ELLIS, M.B. (1971). Dematiaceous hyphomycetes. C.M.I.

ELLIS, M.B. (1976). More Dematiaceous hyphomycetes. C.M.I.

GILMAN, J.C. (1963). Manual de los hongos del suelo. Compañía Editorial Continental.

JOLY, P. (1964). Le genre *Alternaria*. Paul Lechevalier.

LACEY J. & J. DUTKIEWICZ (1976). Methods for examining the microflora of moulding hay. J. Appl. Bact. 41:13-27.

LANIER, L., P. JOLY, P. BONDOUX & A. BALLAMERE (1978). Mycologie et Patholo-

gie forestieres. I. Mycologie forestière. Masson.

RAPER, K.B. & D.I. FENNELL (1965). The genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins.

SIMMONS, E.G. (1967). Tipification of *Alternaria*, *Stemphylium* and *Ulocladium*. Mycol. 59:67-92.

TUITE, J. (1969). Plant pathological methods, fungi and bacteria. Burgess Publ.

6.2 Otras.

INFANTE, F., E. RUIZ DE CLAVIJO, C. GALAN & E. DOMINGUEZ (1987). Estudio comparativo de *Alternaria* Nees ex Fries. en el aire de exterior e interior en la ciudad de Córdoba. An. Asoc. Palinol. Lengua Española 3:5-11.

INFANTE, F., E. DOMINGUEZ, E. RUIZ DE CLAVIJO & C. GALAN (1987). Incidence of *Alternaria* Nees ex Fries. in dwelling of Córdoba City (Spain). Allergol. Immunopathol. 15(4):221-224.

INFANTE, F. & E. DOMINGUEZ (1988). Annual variation of *Cladosporium* spores in home habitats in Córdoba, Spain. Ann. Allerg. 60(3):256-261.

INFANTE, F., C. GALAN, E. DOMINGUEZ & E. RUIZ DE CLAVIJO (1988). Contribución al estudio aeromicológico de la atmósfera de la ciudad de Córdoba. Género *Cladosporium* Link ex Fr. Rev. Ibérica Micol. 5(3):118-126.

TRUJILLO, D., F. INFANTE, C. GALAN & E. DOMINGUEZ (1990). Seasonal and Daily variation of *Aspergillus* Mich. ex Fr. spores in the atmosphere of Córdoba (Spain). Allergol. Immunopathol. 18(3):167-173.

TRUJILLO, D., F. INFANTE, E. DOMINGUEZ & C. GALAN (1990). Influencia del método de muestreo en aeromicrología: comparación de dos muestreadores volumétricos. An. Asoc. Palinol. Lengua Española 5:53-61.

Appendix 1

AEROBIOLOGICAL DATA FILE

TAXON NUM.:

DATE:DAY/MONTH/YEAR

1
2
3
4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1
2
3
4

13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1:Gramineae 2:Olea 3:Cupressaceae 4: Plantago 5:Urticaceae 6:Chenopod. 7:Ascosporae
8:Basidiosporae 9:Alternaria 10:Cladosporium 11:Ustilago 12:Aspergilli

REAL COUNTING PER HOUR FOR THE DAY: DAY/MONTH/YEAR

HOUR	** TAXON NUMERO: 3 **										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1:Gramineae 2:Olea 3:Cupressaceae 4: Plantago 5:Urticaceae 6:Chenopod. 7:Ascosporae
8:Basidiosporae 9:Alternaria 10:Cladosporium 11:Ustilago 12:Aspergilli

Appendix 1

METEO DATA FILE	DATE: DAY/MONTH/YEAR
-----------------	----------------------

```

      1
    16 2
   15 3
  14
 13-----
  12
   11 7
    10 8
  
```

no reg.: 1

HOUR	0		7		13		18	
WIND	DIR	VEL	DIR	VEL	DIR	VEL	DIR	VEL
	0	0	0	0	0	0	0	0
RAIN	0.00		0.00		90.00		0.00	
TEMP./HUM.	TEM	HUM	TEM	HUM	TEM	HUM	TEM	HUM
	8.8	94	8.0	100	11.0	87	11.0	93

Appendix 2

PROSPECTIVE DAILY FILE

Records Go To Exit

6:47:10 pm

número de registro del paciente: 0	FECHA: / /
---	------------------

	a	b	c	d		a	b	c	d
picor ocular	0	0	0	0	Otros (1)	0	0	0	0
irritación ocular	0	0	0	0	Otros (2)	0	0	0	0
Prurito nasal	0	0	0	0	Salidas al campo	0	0	0	0
Rinorrea	0	0	0	0	Salidas de la Ciudad	0	0	0	0
Estornudos	0	0	0	0	Medicamento 1	0	0	0	0
Obstruccion	0	0	0	0	Medicamento 2	0	0	0	0
Ahogo	0	0	0	0	Medicamento 3	0	0	0	0
Pitos	0	0	0	0	Medicamento 4	0	0	0	0
Tos	0	0	0	0	Medicamento 5	0	0	0	0
Picor faríngeo	0	0	0	0	Medicamento 6	0	0	0	0
Picor velo palatino	0	0	0	0	Medicamento 7	0	0	0	0
Epístasis	0	0	0	0					

Edit ||C:\...aerocli\DIARIO ||Rec 1/1 ||File || || Num

