Allò que el vent ens dugué

Breu estudi sobre l'aerobiologia de l'Institut La Garrotxa

Alumne: Manel López i Melià
Curs: 2n de Batxillerat Científic i Tecnològic
Assessores: Concepció Ferrés i Gurt
i Rosa Pons i Sayols
Data de lliurament: 16 d'octubre de 2012
Centre: Institut La Garrotxa

a la Rosa, a la Roser
i a la Concepció

INTRODUCCIÓ **1**
PREGUNTES i HIPÒTESIS **3**
OBJECTIUS **4**
ESQUEMA DE TREBALL **5**

PART TEÒRICA **6**
a) AEROBIOLOGIA i PALINOLOGIA 7
b) EL REGNE DELS FONGS 11
Alternaria sp. 15
Aspergillus sp. 17
Cladosporium sp. 20
Penicillium sp. 22
c) INSTITUT LA GARROTXA 24
Situació 24
Plànols 25
Característiques climatològiques 29

PART PRÀCTICA **31**
a) PROCEDIMENTS 32
1. MOSTREIGS 32
Material 33
Metodologia 35
Localització dels mostreigs 36
Temporització 37
2. RESSEMBRA 40
Material 41
Metodologia 42
3. IDENTIFICACIÓ 43
Material 43
Metodologia 44
b) RESULTATS 52
1. MOSTREIGS 52
2. RESSEMBRA 56
3. IDENTIFICACIÓ 59
Localitzacions 66
ELIMINACIÓ DE RESIDUS 77
ENTREVISTES 79
Al·lergòleg Dr. Bartra 79
Micòleg Dr. Torres 84
Infermera Sra. Boix 88

CONCLUSIONS 92

ANNEXES **96**
SOBRE MATERIALS UTILITZATS 96
1. FUNCIONAMENT DEL MICROFLOW 96
2. COMPOSICIONS QUÍMIQUES 98
Rosa de Bengala 98
Agar Sabouraud 99
Mycoline 102
SOBRE ELS EXPERIMENTS 103
3. ALTRES EXPERIMENTS 103
Vestidor: colònies del sostre 103
Contaminació a l'HEPA 106

POSSIBLES AMPLIACIONS **111**
BIBLIOGRAFIA **113**
AGRAÏMENTS **116**

INTRODUCCIÓ

PRESENTACIÓ DEL TREBALL:

Em plau donar-vos la benvinguda al treball (fullegeu-lo amb tota llibertat). Si s'anomena *Allò que el vent ens dugué* és perquè s'ha centrat en l'estudi de partícules biogèniques aerotransportades, concretament en espores fúngiques.
Dins el món de la microbiologia hi trobem l'aerobiologia, que s'encarrega de l'estudi de les partícules biogèniques aerotransportades. Aquestes partícules són aixecades pels corrents d'aire i es mouen lluny del seu lloc de procedència (i qui sap si mai tornen a tocar el terra). La majoria d'aquestes partícules són espores fúngiques i pòl·lens (la palinologia és la branca de la microbiologia que estudia aquests últims).
Encara que no ho sembli, el poder patogen d'aquestes espores és immens: algunes són potencialment infeccioses i poden causar micosis letals, altres tenen un poder al·lergogen elevat, i moltes poden resistir mesos sense perdre les seves propietats. Algunes són capaces de mantenir-se latents durant anys!

Siguin quines siguin les propietats d'aquestes espores (d'això se n'encarrega la micologia), el que s'estudiarà en aquest treball seran els canvis de concentracions d'espores per volum d'aire en interiors i exteriors de l'Institut La Garrotxa. Mitjançant el MICROFLOW, el mostrejador microbiològic d'aire, es podran fer anàlisis aerobiològiques de diverses aules, vestidors, sales i espais del centre, i es realitzaran experiments per comprovar si ventilant un interior augmenta o disminueix la càrrega fúngica de l'aire.
Més tard, de les colònies que esdevindran de les espores mostrejades, se'n podran prendre mostres i se les classificarà taxonòmicament.

Pot ser que l'aire de l'Institut on més de 1000 persones passem més de 1000 hores a l'any estigui carregat d'espores fúngiques algunes perjudicials per la nostra salut?

EVOLUCIÓ DEL TREBALL:

EL TEMA DE TREBALL i LES PRIMERES TROBADES AMB PROFESSIONALS

Respecte a "què" he estudiat se n'ha de comentar algun detall: no té gairebé res a veure amb el que inicialment havia escollit per tema del treball de recerca.
De fet, ha donat moltes voltes:

1. La idea principal era estudiar l'*Aspergillus*, un conjunt d'espècies de floridures molt perilloses a nivell d'infeccions pulmonars. S'haurien fet preses de mostres de les orelles d'alumnes de l'institut i relacionar-ne la presència del fong amb casos d'otitis. També s'havia pensat estudiar la presència de fongs a les fosses nassals.

La idea d'estudiar aquest fong em va venir d'una pràctica de Biologia del primer trimestre, en la qual vam observar preparacions de miceli i esporangis de *Penicillium* i d'*Aspergillus*, i vaig descobrir que tant la microscòpia com la morfologia d'aquests fongs m'agradaven molt.
El Dr. Bartra, al·lergòleg de l'Hospital Clínic de Barcelona, em va recomanar fer enrere aquestes propostes, ja que haurien estat difícils de dur a terme i que l'*Aspergillus* seria difícil d'identificar. També em va deixar bibliografia, entre la qual hi havia la tesi doctoral de la Sra. Mariana Buss[1], que em va donar la idea de fer el treball sobre l'aerobiologia.
Àdhuc em va comentar de centrar-me en una altra espècie fúngica més fàcil de reconèixer, com l'*Alternaria*, o alguna espècie més abundant a l'aire, com el *Cladosporium*.

2. Segona idea: adéu *Aspergillus*, hola alternativa (*Alternaria*). Es van sospesar les opcions i els camins que podia seguir el treball i es va decidir deixar enrere el camp de la medicina i les patologies dels fongs en qüestió i acotar el projecte només a la presència d'aquests fongs a l'aire dels espais de l'institut: aerobiologia.

[1] Titulada *Estudio Epidemiológico de Alergia a Hongos y Otros Neumoalérgenos, en estudiantes de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, con Relación a los Niveles Fúngicos Ambientales.*

Després de la xerrada amb el Dr. Torres, micòleg de l'IMIM, durant la qual es van tractar molt els temes de l'aerobiologia, ja se sabien els materials i aparells que s'utilitzarien.

3. A part de l'Alternaria també s'estudiarien els altres tres fongs: *Penicillium*, *Aspergillus* i *Cladosporium*. Es farien mostreigs de l'aire de l'institut amb el MICROFLOW (dels laboratoris SIGMA, utilitzat anteriorment per Jordi Oliveras i Rafael Bassaganyes[2]) i s'utilitzarien plaques RODAC Rosa de Bengala. Es determinarien les espècies de floridures que fossin més abundants a l'aire. Es compararien mostreigs d'exterior amb interior. Etc.

Finalment, vaig entrevistar a la Sra. Irene Boix, la Infermera Supervisora de Quiròfan de l'Hospital Sant Jaume d'Olot per preguntar-li sobre les anàlisis aerobiològiques que es realitzen a les sales de l'hospital.
El tema de treball va quedar completament decidit.

Vaig contactar amb la Professora Belmonte, directora de l'ICTA (Institut de Ciència i Tecnologia Ambientals) i professora de Botànica a la UAB, per explicar-li el que pensava fer i demanar-li opinió. També vaig aprofitar per demanar-li si podia fer l'estada en empresa al seu departament a través del Programa Argó.
Em va acceptar.

ESTRUCTURA DEL TREBALL

Com molts treballs, aquest s'estructura en tres parts bàsiques:

- La recerca bibliogràfica, en la qual s'ha cercat informació de bibliografia especialitzada, de revistes, de tesis i de pàgines web fiables per tal de compondre una part teòrica que serveixi de base de coneixements per a la següent part:
- La recerca experimental, en la qual mitjançant metodologies s'han realitzat experiments i anàlisis que han respost moltes preguntes i han confirmat o refutat hipòtesis. També s'han fet entrevistes a professionals que han aportat molta informació.
- Les conclusions, en les quals s'engloben les comprovacions de les hipòtesis plantejades.

FI DEL TREBALL

El món de la micologia és molt complicat, i cada vegada ho és més, ja que es descobreixen nous fongs i es troben relacions genètiques entre espècies que anteriorment es creia que eren diferents. En aquest treball s'utilitza nomenclatura i conceptes tradicionals, perquè sinó seria un embolic per a tots els que no són micòlegs (com un servidor).
M'he trobat que la majoria d'hipòtesis i preguntes no podien ser comprovades ni respostes ja que em faltava informació i detalls d'experiments.
La veritat és que quan es comença un treball de recerca, sobretot si tracta d'un tema força desconegut, es va a les palpentes, i en el meu cas no hi ha hagut excepció: no tenia clar què era el que buscava exactament i no sabia què em podia trobar, i si trobava quelcom interessant ho repassava per esbrinar de què es tractava, i en comptes d'acotar el treball, s'eixamplava encara més. Per aquesta raó estic finalitzant un treball que potser es desvia un xic del tema central, i que inclou diversos annexes amb altres estudis (petits experiments que es van realitzar paral·lelament als experiments principals).
Tot i així, estic content de la feina feta i de tot el que he pogut fer gràcies a munts de persones que han ofert la seva ajuda amablement (vegeu *Agraïments* a la pàgina 116).

[2] En els seus treballs de recerca anomenats *Estudi de la qualitat microbiològica de l'IES La Garrotxa* i *Qualitat Microbiològica de l'aire de l'IES La Garrotxa*, respectivament, en els quals estudiaven l'aerobiologia de l'institut al complet: UFC tant bacterianes com fúngiques.

PREGUNTES i HIPÒTESIS

PREGUNTES:

* Hi ha partícules biogèniques a l'aire?
* Hi ha espores fúngiques a l'aire? Poden ser perjudicials per a la salut?
* Com es pot saber la concentració d'un fong a l'aire?
* Quins són els gèneres taxonòmics d'espores fúngiques més freqüents trobats a l'aire?
* Té relació si obrim portes i finestres d'un espai tancat amb l'increment de la càrrega fúngica de l'aire?
* Els canvis d'humitat poden fer augmentar el nº d'espores fúngiques d'un espai?
* Té a veure la càrrega fúngica de l'aire amb la micoflora d'un espai interior?
* Com es pot identificar un fong?
* La morfologia d'un fong varia segons el medi on creix?
* Hi haurà el mateix tipus de fongs aerotransportats a tots els espais de l'Institut?
* Hi haurà la mateixa concentració de fongs aerotransportats a tots els espais de l'Institut?
* Poden haver-hi aules de l'Institut amb una càrrega fúngica tal que poden arribar a ser perilloses per a persones al·lèrgiques?
* Es fan controls i anàlisis d'aire als hospitals per controlar els agents aerobiològics perillosos?

HIPÒTESIS:

- A l'aire hi ha partícules biogèniques, d'entre les quals espores fúngiques que poden ser perjudicials per a la salut.
- L'obertura de portes i finestres en un espai interior provoca un increment en el nombre i la diversitat d'espores fúngiques a l'aire.
- Canvis ambientals com l'augment de la humitat també influeixen en la càrrega fúngica de l'aire.
- El vent pot afavorir l'increment de càrrega fúngica gràcies als corrents d'aire que provoca (porta espores de l'exterior i aixeca espores del terra).
- El nº de finestres i portes obertes d'un interior influeix en el nº d'espores fúngiques que hi ha per l'aire.
- A tots els espais de l'Institut s'hi trobaran els mateixos gèneres de fongs aerotransportats.
- A tots els espais de l'Institut s'hi trobaran les mateixes concentracions de fongs aerotransportats.
- La proporció entre concentracions dels diferents gèneres de fongs de l'exterior serà la mateixa que la de l'interior (si a fora predomina *Cladosporium*, a dins també hi predominarà).
- La morfologia dels fongs és variable segons el medi on creixen.
- Les concentracions d'espores fúngiques són diferents a cada lloc (estan condicionades per la climatologia, la meteorologia, la vegetació i l'entorn, etc.).

CONCLUSIONS-HIPÒTESIS DE LA TESI DOCTORAL DE LA SRA. MARIANA BUSS:

- La càrrega fúngica a l'exterior d'*Alternaria*, d'*Aspergillus*, de *Cladosporium* i de *Penicillium* (i d'altres fongs) sempre és superior a la d'interior.
- L'activitat humana influeix en l'increment de la càrrega fúngica d'un interior tant per la mobilització de partícules del terra com per la presència d'espores a la roba de les persones.

OBJECTIUS

OBJECTIUS GENERALS:

- Plantejar-se preguntes.
- Formular hipòtesis a partir de les preguntes plantejades i a partir de les conclusions de la Tesi Doctoral de la Sra. Mariana Buss.
- Establir un esquema de treball que em permeti organitzar el projecte.
- Cercar bibliografia que em respongui preguntes.
- Idear una recerca experimental que em respongui preguntes.
- Demostrar o refutar hipòtesis mitjançant els resultats obtinguts.

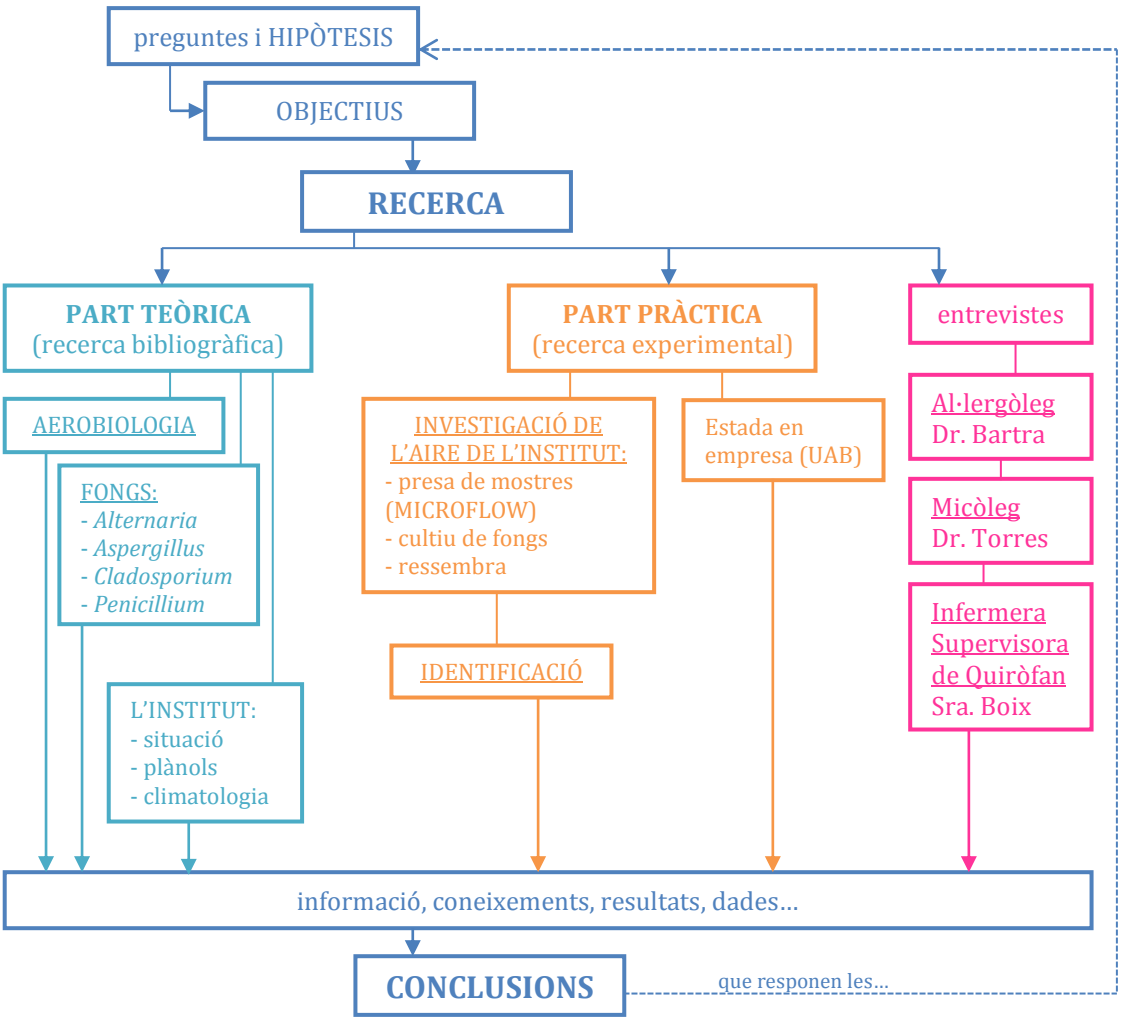
OBJECTIUS TEÒRICS:

- Introduir-se en el món de l'aerobiologia, de la palinologia i de la micologia.
- Conèixer les característiques dels fongs aerotransportats més perillosos a nivell d'al·lèrgies i dels més comuns i ubics a l'aire.
- Descobrir com funciona la Xarxa Aerobiològica de Catalunya (XAC) i quins són els serveis que ofereixen a la població.
- Estudiar els espais de l'institut i la seva climatologia.

OBJECTIUS PRÀCTICS:

- Comprovar la presència d'espores de fongs aerotransportats a l'aire de diferents espais de l'institut.
- Observar com la morfologia dels fongs pot canviar molt segons si creixen en un medi o en un altre.
- Establir quin o quins són els fongs aerotransportats més freqüents als diferents espais de l'institut.
- Comparar quantitativa i qualitativament la presència de fongs aerotransportats a l'exterior i a l'interior d'un espai tancat, com una aula.
- Relacionar els resultats obtinguts amb les característiques dels espais de l'institut i la meteorologia local dels dies de l'última setmana.
- Investigar si l'apertura de portes i finestres, la presència humana, els canvis d'humitat i el vent tenen relació amb l'increment de fongs aerotransportats a l'interior d'espais tancats.

ESQUEMA DE TREBALL



la hipòtesi d'en Hobbes

PART TEÒRICA

a) AEROBIOLOGIA i PALINOLOGIA

ORÍGENS:

Anton van Leeuwenhoek

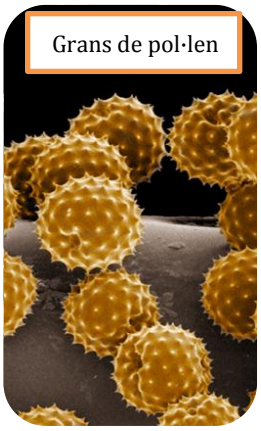
A l'aire sempre hi ha hagut pòl·lens i espores i moltes altres partícules biològiques. Com ha passat també amb els microbis, aquestes partícules biològiques aerotransportades han passat inadvertides durant milers d'anys, fins que amb les millores del microscopi òptic simple de van Leeuwenhoek s'inicien els estudis de microbiologia el 1674.

Anys més tard, el 1865, un físic britànic, **Charles H. Blackley** (1820-1900), conegut pels seus estudis sobre l'al·lèrgia al pol·len, va començar a realitzar tests cutanis d'al·lèrgia (normalment anomenats *skin tests*) fent proves amb la seva pròpia pell[3].

Charles H. Blackley

Anys més tard, aquest mateix investigador, feia volar estels que captaven pòl·lens de l'aire en portaobjectes. Va diferenciar els mostreigs que havia realitzat i va declarar que es troba pol·len en més concentració a nivells alts que no pas en baixos i també va assegurar que el pol·len pot ser transportat a kilòmetres de distància pel vent.

El 1873 es va publicar el seu treball, anomenat "Recerca experimental de les causes i naturalesa de la rinitis al·lèrgica"[4] i el 1880 es publica "Al·lèrgia al pol·len: les seves causes, tractament i prevenció efectius, recerques experimentals"[5]. Els seus descobriments marquen un inici en l'estudi del pol·len – va ser el primer a considerar-lo causant de la rinitis al·lèrgica. És per això que és considerat el pare de l'aerobiologia i de la palinologia.



Grans de pol·len

Però, **què són exactament l'aerobiologia i la palinologia**?

<< S'ha definit l'aerobiologia com **l'ecologia de l'atmosfera** >>, segons el PIA (Punt d'Informació Aerobiològica).

Segons F. C. Meier el 1930, **l'aerobiologia és la branca de la biologia que estudia les partícules biològiques aerotransportades**. S'encarrega també de l'estudi de la concentració d'aquestes partícules a l'aire, els seus modes de vida i supervivència i la repercussió que provoquen al seu entorn.
Són exemples de partícules aerotransportades els pòl·lens, les espores, alguns bacteris, etc.

Respecte la definició d'*Aerobiologia Andalucía Oriental*, es diu que l'aerobiologia...
<< Es pues, una ciencia multidisciplinar que incluye ciencias básicas y aplicadas, tales como la patología vegetal, palinología, alergología, bioclimatología, calidad de ambientes interiores, etc. Es en la medicina, donde ha estado desde un principio fuertemente ligada, debido a que **la presencia del polen y las esporas en el aire provoca la aparición de síntomas alérgicos** (polinosis) entre la población. >>

[3] Casualment, el seu test va donar resultat positiu.
[4] Originalment, el segle XIX, es descrivia la rinitis al·lèrgica com a *catarrhus aestivus* – "refredat d'estiu", literalment. Aquesta nomenclatura, però, no existeix en català.
[5] En anglès, l'al·lèrgia al pol·len s'anomenava generalment *hay fever* – "febre del fenc", literalment.

Evidentment, a causa del gran poder al·lergogen de moltes d'aquestes partícules, l'aerobiologia entra en contacte directe amb la medicina. I degut a que la majoria de partícules aerotransportades són vegetals (els pòl·lens i les espores es troben en gran concentració i són pràcticament ubics a l'aire de tot el món), l'aerobiologia i la botànica han donat una nova branca de la biologia: **la palinologia**, que **s'encarrega de l'estudi i la dispersió aèria dels pòl·lens i de les espores** (tant de molses i falgueres com de fongs).

Malgrat tot, fins els anys 40, després del *Symposium on extramural and intramural aerobiology*, l'aerobiologia no pren força.

SITUACIÓ ACTUAL:

A NIVELL HOSPITALARI

Des que es va començar a estudiar la perillositat d'algunes espores aerotransportades, els criteris d'higiene als hospitals van haver de tornar-se més estrictes. El problema era que per assegurar la higiene total, el mètodes de neteja i esterilització havien de ser molt eficients i precisos.

Aspergil·losis (fotografia del *Department of Natural Resources*)

Es van començar a donar **casos de contaminacions fúngiques als hospitals** que posaven en perill els pacients, sobretot els immunodeprimits, ja que aquests no tenien defenses immunològiques per defensar-se de possibles infeccions per microbis.
Arreu d'Espanya es coneixen brots fúngics que **van provocar la mort de desenes de malalts**: el desembre de 1998 a Vigo i el gener de 1999 a Saragossa, a una localitat de Biscaia, casos alarmants a l'Hospital Clínic de Barcelona i dos centenars d'infectats a Palma – deu dels quals van morir[6], la qual cosa va provocar diverses investigacions jurídiques a Madrid.

Howard Carter i la tomba de Tutankamon

Mentrestant, també a finals de segle XX, diversos investigadors van descobrir la presència de fongs latents a les tombes dels antics faraons egipcis. Entre aquests investigadors destaquen el doctors Ezzeddin Taha, Nicola Di Paolo i G. Kramer, que van identificar espècies com *Aspergillus niger* o *Aspergillus flavus* a les restes de les mòmies.
Aquests descobriments van demostrar que **les misterioses morts dels arqueòlegs** que van entrar per primera vegada a les tombes no van ser causades per malediccions faraòniques, sinó que **es van deure a infeccions sistèmiques per part de fongs** com *Aspergillus sp.* (aspergil·losis pulmonars invasives, per exemple).

A partir de l'any 2000, però, les coses van canviar. Els criteris d'higiene dels hospitals i els seus sistemes de renovació d'aire van canviar radicalment[7] i els nivells d'espores fúngiques perilloses es van començar a controlar mitjançant anàlisis d'aire periòdiques.
Malgrat que van repetir-se algunes situacions (rebrots a Vigo, a l'Hospital Sant Pau de Barcelona, etc.), les mesures que es van prendre van ser més efectives: tancar els quiròfans i fer-ne una neteja exhaustiva i cercar pels conductes de ventilació.

[6] Informació extreta de diverses notícies d'entre 1998 i 1999 de l'hemeroteca de *La Vanguardia* (paraula clau: *Aspergillus*).
[7] Veure l'entrevista a la Sra. Irene Boix a la pàgina 86.

Avui en dia, doncs, aquest tipus de casos se solucionen fàcilment, a les nostres comarques. Malauradament, **als països en via de desenvolupament, el problema de la contaminació aerobiològica encara no s'ha resolt**.

D'altra banda, s'ha seguit estudiant l'al·lèrgia al pol·len i a altres partícules aerotransportades i les persones amb al·lèrgia han rebut recomanacions per tal d'evitar o minimitzar els efectes que aquestes partícules els puguin generar.
Les societats d'immunologia i d'al·lergologia de Catalunya s'encarreguen d'estudiar i tractar aquests casos.

CONTROL AMBIENTAL

Els estudis de captació diària de partícules aerotransportades que fa la **XAC** (**Xarxa Aerobiològica de Catalunya**) proporcionen a la població una informació molt interessant: des de calendaris pol·línics que mostren les variacions de diferents espècies de pòl·lens a l'aire fins a gràfiques de tendències d'UFC/m^3 d'algunes espècies de fongs durant tot l'any.

NOTA: les UFC/m^3 són les espores en un m^3 que poden originar una colònia (Unitats Formadores de Colònies).

També elaboren previsions setmanals, remarcant quines espècies de pòl·lens i de fongs poden arribar a concentracions més altes en els pròxims dies.

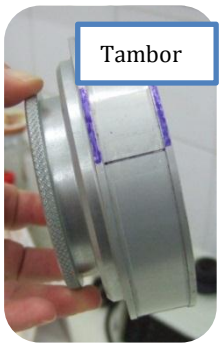
LA XAC: la Xarxa Aerobiològica de Catalunya (XAC) **es va constituir el 1983** per la unió de la Unitat de Botànica de la Universitat Autònoma de Barcelona i la Unitat Docent d'Al·lergologia de l'Hospital de la Vall d'Hebron de Barcelona, i amb el suport econòmic dels Laboratorios LETI, S.A.. A partir de l'any 2006 la XAC **es va integrar a l'ICTA** (**Institut de Ciència i Tecnologia Ambientals**) i comença a comptar amb altres suports.

Al llarg dels anys de col·laboració s'ha estudiat el contingut pol·línic i d'espores a l'atmosfera de diversos punts de la geografia catalana i balear; concretament, de vuit localitats: Barcelona, Bellaterra-UAB, Girona, Lleida, Manresa, Roquetes-Observatori de l'Ebre, Tarragona i Vielha.

Cadascuna de les estacions aerobiològiques compta amb un **captador esporo-pol·línic**, que funciona contínuament i que proporciona una mostra per dia. Un cop al laboratori de Palinologia de la UAB, les mostres són analitzades al microscopi òptic per tal de comptar i determinar els pòl·lens i les espores de fongs. Les dades es publiquen i es divulguen per tal d'informar a la població de l'estat actual i la predicció de futur dels nivells de pòl·lens i espores al·lergògens.

Dos captadors al terrat de la Unitat de Botànica, a la UAB (Bellaterra)

Durant l'estada en empresa a la UAB, es va recollir informació sobre com es realitzen els comptatges. El procediment habitual és el següent:



a. Un captador (el gris) està programat per prendre mostres d'aire cada dia, i l'altre (el verd) succiona cada setmana, sense aturar-se, per si de cas l'altre captador no ha funcionat bé. Dins els captadors hi ha un tambor que gira mitjançant un sistema de rellotgeria. L'aire que entra per un petit bisell impacta directament sobre el tambor, que té al voltant una cinta impregnada de silicona.
b. Cada dia a les 8:30h del matí s'extreu el tambor del captador gris i se'n desenganxa la cinta, que té recollides les mostres aerobiològiques de les últimes 24 hores.

Pòl·lens tenyits vistos al microscopi

c. Sobre un regle calibrat (en el qual 2 mil·límetres equivalen a 1 hora de succió) es talla la cinta i s'enganxa en un portaobjectes amb oli de silicona.
d. Al damunt de la mostra s'hi aboquen unes gotes de fucsina, un colorant que tan sols tenyeix els pòl·lens de color rosa. Així la identificació es fa molt més ràpida.
e. Es tapa amb un cobreobjectes i s'etiqueta la preparació.
f. Els analistes de la XAC, el David Navarro, la Rut Puigdemunt i l'Elena Gabarra, observen la preparació al microscopi i anoten els pòl·lens i les espores fúngiques que hi troben. Hi tenen molta experiència, per la qual cosa no els és difícil diferenciar els diferents tipus de pol·len.

D'entre totes les partícules biològiques aerotransportades en destaquen dues: els pòl·lens i les espores fúngiques. Les primeres són les cèl·lules sexuals de les plantes superiors, els espermatòfits, equivalents als espermatozoides dels animals. Les segones són produïdes per fongs, tant basidiomicets com deuteromicets, i són capaces de produir un nou individu elles soles.

Aquest treball s'ha centrat en les espores més que en els pòl·lens, ja que representen un perill més important a nivell hospitalari i es troben en més concentració a l'aire, a més a més.

Per aquesta raó en les següents pàgines s'introdueix breument el lector al món dels fongs i de les floridures, i s'explicaran les característiques més importants dels quatre gèneres més comuns a l'aire: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* i *Penicillium*.

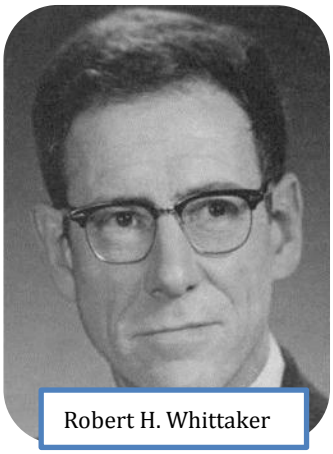
Table 3. Most frequent species of *Alternaria, Aspergillus, Cladosporium* and *Penicillium* found indoors and outdoors. (Expressed as percentages)

Isolated species	Indoor N=431	Outdoor N=150
Alternaria alternata	37.1	62.66
Aspergillus flavus	9.5	9.3
Aspergillus niger	19.25	25.3
Aspergillus versicolor	16	9.3
Cladosporium cladosporioides	34.1	34.6
Cladosporium herbarum	38.5	39.3
Penicillium chrysogenum	26.2	22
Penicillium frequentans	10.2	12
Penicillium funiculosum	12.7	13.3

Taula del treball de la Sra. Sílvia Gómez de Ana (URMIM, IMIM i UAB), amb la col·laboració de la Professora Belmonte i el Dr. Torres, en la qual veiem les espècies més freqüents d'aquests quatre gèneres.

b) EL REGNE DELS FONGS

HISTÒRIA: originàriament, els fongs s'incloïen al regne de les plantes (Aristòtil, s. IV a.C.), i ha estat així fins que el 1969 Robert H. Whittaker va proposar diferenciar plantes de fongs, i va crear el cinquè regne: el regne dels fongs (aquests, però, se segueixen relacionant amb tots els estudis de botànica).



Robert H. Whittaker

Actualment existeixen sis regnes: Animals, Plantes, Fongs, Protoctists i Arquebacteris i Eubacteris (que Whittaker reunia en un sol regne: el de les Moneres o Bacteris).

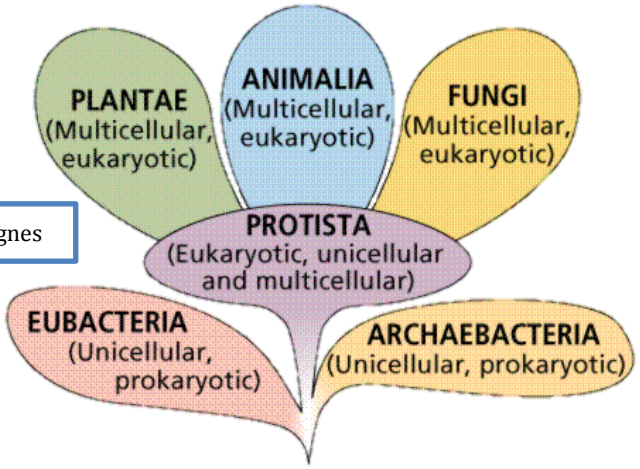
DEFINICIÓ: el regne dels fongs engloba organismes **eucariotes**, **heteròtrofs** i de **digestió externa** – aboquen substàncies catalitzadores a l'exterior per digerir els aliments adjacents i absorbeixen els nutrients que n'esdevenen.

Les cèl·lules estan protegides per una paret cel·lular de quitina, un glúcid holòsid homopolisacàrid estructural que també constitueix l'exosquelet dels artròpodes.

De cap manera els fongs són plantes: en el cas que ho fossin podrien créixer sense necessitat de matèria orgànica al seu voltant. Les cèl·lules fúngiques, a més a més, no s'assemblen en res a les vegetals – ni tenen paret cel·lular de cel·lulosa ni presenten cloroplasts.

Hi ha fongs unicel·lulars, com els llevats, **però la majoria són pluricel·lulars**. Dins els pluricel·lulars n'hi ha de diverses varietats: basidiomicets (coneguts popularment com a bolets), ascomicets (com les tòfones o els pets de llop) i les floridures, dins de les quals trobem els zigomicets i els deuteromicets.

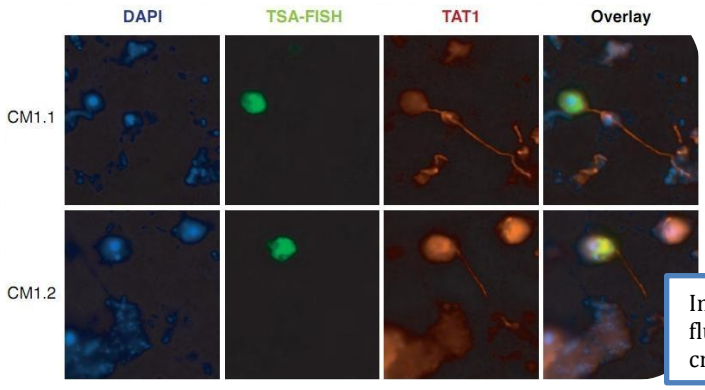
A la pàgina següent es pot veure un esquema amb una petita explicació de cada tipus de fong.



Esquema dels 6 regnes

Bastant recents estudis moleculars realitzats a l'Institut de Ciències del Mar, CSIC (a Barcelona), han descobert un nou grup evolutiu de fongs: s'anomenen **criptomicets**.

Es tracta d'individus unicel·lulars de vida lliure, d'entre 3 i 5µm de diàmetre, que poden presentar o no flagel. Tot i no presentar paret de quitina (característica de tota la resta de fongs), se suposa que realitzen processos de digestió externa, per la qual cosa s'inclouen dins el regne de fongs, però se situen a la branca de fongs més antics – tenint en compte que l'avantpassat comú de tots els eucariotes es tractava d'una forma unicel·lular fagòtrofa (fa fagocitosi per nodrir-se), **es poden considerar els criptomicets un estat entremig en l'evolució** que va acabar donant els fongs que avui dia coneixem[8].



Imatges vistes pel microscopi de fluorescència (tècnica FISH) de criptomicets.

[8] Informació extreta de la revista *Investigación y Ciencia* del setembre de 2012. Veure *BIBLIOGRAFIA* a la pàgina 108.

FONGS (regne)

Unicel·lulars

Llevats: les cèl·lules mesuren entre 6 i 12µm, morfologia cel·lular simple: arrodonida, allargada o cilíndrica.
Reproducció per **gemmació**: la cèl·lula mare forma una gemma (protuberància) a la paret cel·lular que esdevindrà una nova cèl·lula (foto: llevats amb cicatrius vistos per un MES).

Es coneixen llevats beneficiosos per a la indústria i patògens:
-El *Saccharomyces cerevisiae* permet la producció de cervesa mitjançant la fermentació, una funció del metabolisme.
-La *Candida albicans* pot infectar zones ferides de la mucosa bucal, o pot provocar peu d'atleta, otomicosis...

Pluricel·lulars

Ascomicets (tipus): de forma i estructura similars a la dels basidiomicets.

Basidiomicets (tipus): de forma i estructura similars a la dels ascomicets.

Tant els ascomicets com els basidiomicets comparteixen la mateixa estructura: el miceli, format per hifes vegetatives septades que constitueixen la base de l'individu, s'aixeca del terra i forma el cos fructífer, normalment en forma de barret, que produeix les espores.

Reproducció per **ascs**, unes estructures allargades en forma de bastó que contenen vuit **ascòspores** cada un.
Es coneixen ascomicets com els pets de llop o les tòfones.

Reproducció per **basidis,** unes estructures en forma de maça que formen quatre **basidiòspores**.
Alguns basidiomicets presenten miceli d'hifes binucleades.
Els basidiomicets són popularment coneguts com a bolets.

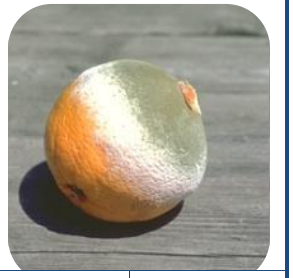
Floridures

Zigomicets (classe): formats per un miceli d'hifes no septades (**hifes sifonades**), aquests fongs es reprodueixen tant asexual com sexualment.
Es tracta d'un cicle haplont, en el qual tan sols la zigòspora (originada per la unió de dos micelis d'individus diferents) és diploide.
L'individu resultant es pot reproduir mitjançant mitòspores.

Es coneixen zigomicets com per exemple el *Rhizopus sp.*, que se sol trobar al pa.

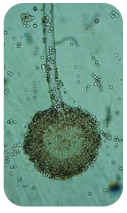
Deuteromicets:

Formes asexuals d'Ascomicets i de vegades de Basidiomicets.



Celomicets (classe):

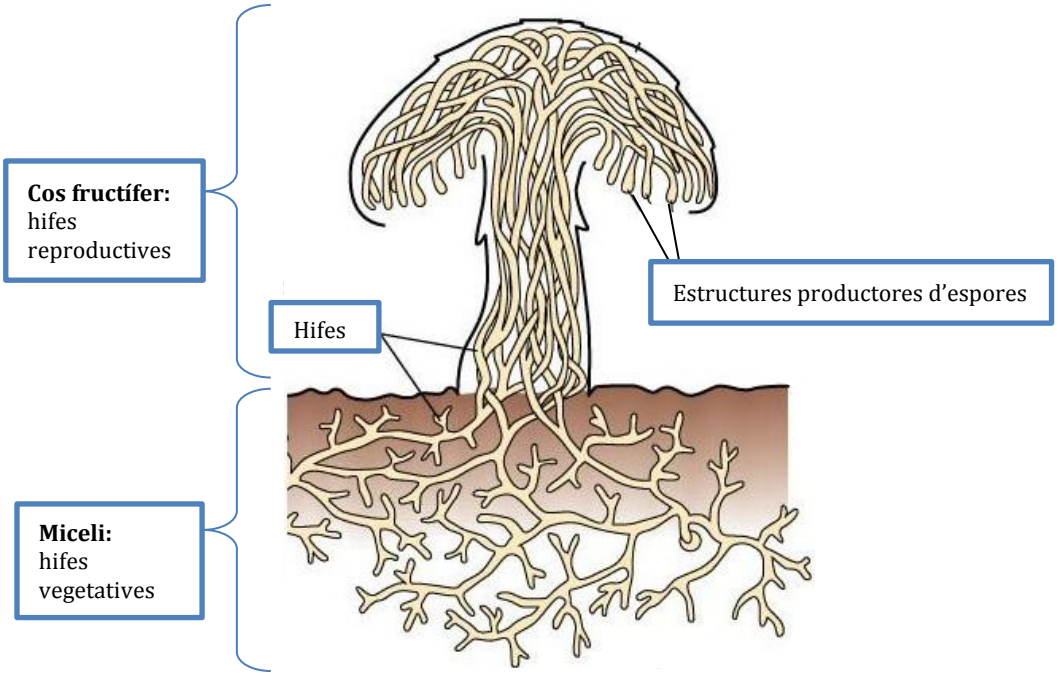
Hifomicets (classe):



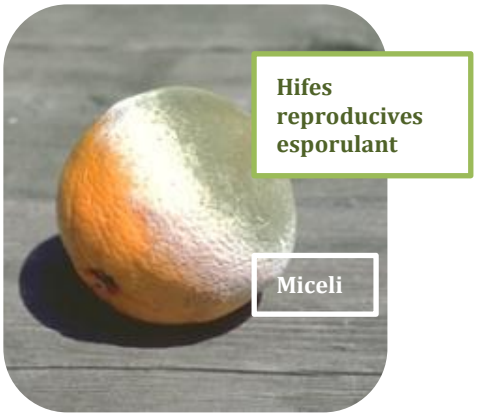
FONGS PLURICEL·LULARS:

Repassem les característiques dels fongs pluricel·lulars.

MORFOLOGIA: els fongs pluricel·lulars són d'estructura filamentosa, consisteixen en un conjunt d'**hifes** (successió de cèl·lules allargades en forma de fil) que es ramifiquen.
La majoria de fongs pluricel·lulars presenten dues parts: **miceli** (format per un grup d'hifes vegetatives) i hifes reproductives (que poden o no formar un **cos fructífer**).
REPRODUCCIÓ: es reprodueixen sexualment o asexual mitjançant **espores** (o **conidis** si són de reproducció asexual), cèl·lules que poden donar origen a un nou individu. No són llavors, ja que aquestes ja tenen un embrió format a l'interior.
NUTRICIÓ: recordem que són heteròtrofs, no autòtrofs! Els fongs filamentosos són normalment **sapròfits** (s'alimenten de restes d'altres éssers vius en descomposició), però també hi ha espècies que poden comportar-se com a **paràsits** i nodrir-se d'un altre ésser viu.



Com ja hem comentat en l'esquema (i com veiem en la imatge superior), en el cas dels basidiomicets i dels ascomicets el cos fructífer s'aixeca del miceli i, especialment en els basidiomicets, forma l'estructura típica de petit paraigua. No obstant, hi ha altres tipus de fongs pluricel·lulars que no formen cossos fructífers: són les floridures. Quan sentim aquesta paraula pensem en el pa florit, o una taronja amb una gran taca verda, o també en el rocafort.

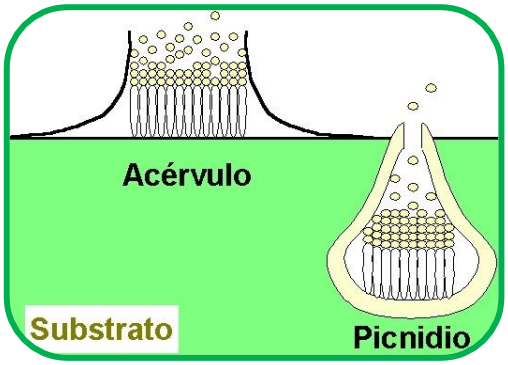


Encara que costi de creure, les floridures també es divideixen en dues parts. La diferència és que en el seu cas, no es forma cos fructífer, sinó tan sols hifes reproductives, que creixen damunt del miceli com una segona capa. L'acumulació d'espores sol enfosquir la zona d'hifes reproductives, de tal manera que és fàcil veure-la a ull nu (vegeu la taronja florida).

Dins de les floridures diferenciem deuteromicets i zigomicets. La característica que els permet separar els uns dels altres és principalment el tipus d'hifes: els zigomicets presenten hifes sifonades, sense septes, i els deuteromicets les presenten septades. A més, els zigomicets fan reproducció sexual mitjançant zigòspores. Els deuteromicets, en canvi, són difícils d'explicar (vegeu pàgina següent).

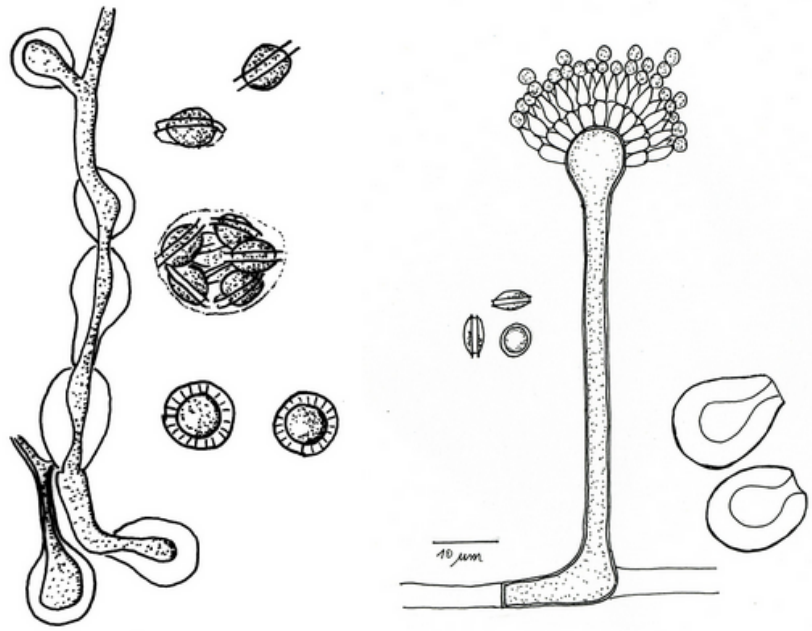
DEUTEROMICETS

Els deuteromicets, o fongs imperfectes, són un grup no taxonòmic en el qual s'han englobat espècies de floridures de reproducció asexual. Durant els últims anys, però, moltes d'aquestes espècies s'han relacionat amb tàxons d'Ascomicets i de Basidiomicets, és a dir, són **anamorfs** d'Ascomicets i de Basidiomicets, és a dir, són **fases asexuals** d'Ascomicets o Basidiomicets. Com ja he dit, aquest treball utilitza la nomenclatura tradicional, perquè en cas contrari resultaria un embolic per a qualsevol sense experiència en la micologia (com un servidor).



Dins els deuteromicets trobem dos classes d'espècies: les pertanyents als celomicets i les pertanyents als hifomicets. Podem distingir els celomicets dels hifomicets segons si hi ha o no cossos fructífers (picnidis, acèrvuls). Els **cossos fructífers** són estructures formades per hifes reproductives. A l'interior, els diversos conidiòfors formen munts de conidis, que surten per un ostíol, en el cas dels picnidis.

Totes les espècies que abans es consideraven pertanyents als Deuteromicets, ara estan relacionades amb una o més espècies d'Ascomicets i Basidiomicets.
La següent imatge, extreta de *Plantas y Hongos* (veure *Webgrafia* a partir de la pàgina 113) mostra l'aspecte microscòpic del teleomorf (forma perfecta: es reprodueix sexualment) d'*Aspergillus nidulans*, i una taula amb espècies d'Ascomicets i de Basidiomicets amb els seus respectius anamorfs (entre els quals l'*Aspergillus*, l'*Alternaria*, el *Cladosporium* i el *Penicillium*).



Teleomorpho: *Emericella nidulans* Anamorfo: *Aspergillus nidulans*

Orden	Familia	Teleomorfo	Anamorfo
Capnodiales	*Davidiellaceae*	*Davidiella*	*Cladosporium*
Capnodiales	*Mycosphaerellaceae*	*Mycosphaerella*	*Cercospora, Septoria*
Capnodiales	*Mycosphaerellaceae*	*Cymadothea*	*Polythrincium*
Pleosporales	*Pleosporaceae*	*Pleospora*	*Stemphyllium*
Pleosporales	*Pleosporaceae*	*Lewia*	*Alternaria*
Pleosporales	*Pleosporaceae*	*Cochliobolus*	*Curvularia*
Pleosporales	*Pleosporaceae*	*Pyrenophora*	*Drechslera*
Eurotiales	*Trichocomaceae*	*Eurotium, Sartorya, Emericella*	*Aspergillus*
Eurotiales	*Trichocomaceae*	*Eupenicillium*	*Penicillium*

Alternaria sp.

L'*Alternaria* és un fong de distribució universal, generalment relacionat amb les al·lèrgies respiratòries, ja que és considerat un dels causants més comuns de rinitis i asma deguts a espores de transport aeri.

<< De 100 casos d'al·lèrgia a fongs, 99 són provocats per *Alternaria* >> segons l'al·lergòleg Dr. Bartra.

Es troba *Alternaria* com a sapròfit o paràsit en plantes i material vegetal.

MORFOLOGIA:

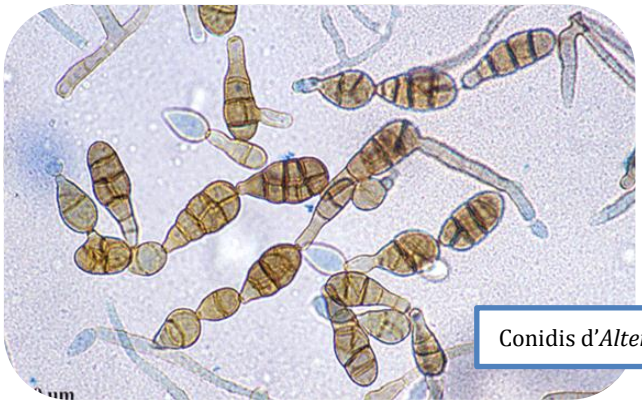
VISTA MACROSCÒPICA: les colònies del gènere *Alternaria* són constituïdes per micelis de color marró fosc o grisosos (fuliginosos). Això és deu al pigment melànic de la paret de les hifes i conidis. En medis agar Sabouraud, són d'aparença cotonosa, de color gris-verd en la joventut, i més fosques després de madurar.

Colònies d'*Alternaria sp*

TEXTURA	
pilosa	cotonosa

COLOR	
verd olivaci	gris

VISTA MICROSCÒPICA: els conidiòfors presenten d'1 a 3 septes, són simples o ramificats, poden ser rectes o torçats (flexuosos) amb un o més porus apicals (a l'extrem).

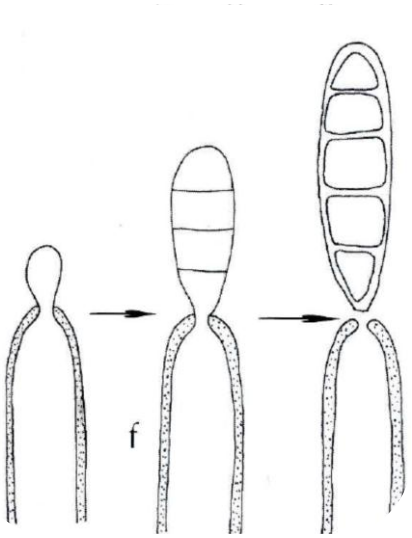


Conidis d'*Alternaria sp*

Els **conidis** d'*Alternaria* són de color marró grogós o daurat tirant a fosc, forma de pera (piriformes), claviformes (en forma de pica: ♠), rostrats (amb una punxeta a la punta, com si tingués nas), i multiseptats, amb septes longitudinals i transversals: aspecte enrajolat (**dictiospores**). La seva mida varia entre 12 i 50 micròmetres de llargada (són, per tant, macròspores). En algunes espècies, les espores formen cadenes, i en altres, no. Són porospores, ja que neixen d'un porus al conidiòfor. Poden ser de paret llisa o rugosa, i poden presentar prolongació apical generalment hialina (incolora).

El **conidiòfor** pot originar un únic conidi a través d'un únic porus i mantenir-se així, o pot ser geniculat, fer una prolongació lateral al costat del conidi ja existent, i formar un altre conidi. Aquesta nova branca pot ser la base d'altres extensions geniculades.
Un conidi per sí mateix també pot donar lloc a nous conidis: la zona apical del conidi pot tenir la mateixa funció que el conidiòfor, i com aquest, a través d'un porus, donarà lloc a un nou conidi amb la base bombada, arrodonida.
Per tant, es poden formar cadenes de conidis al cim d'un sol conidiòfor.

Cadena de conidis d'*Alternaria*
en un microscopi electrònic de rastreig.



Formació de porospores

Les cadenes d'espores, doncs, es poden originar:

- per CREIXEMENT PROXIMAL: el conidiòfor origina un nou conidi pel mateix porus, i l'antic conidi segueix enganxat a la punta del nou conidi.
- per CREIXEMENT DISTAL: la punta de l'antic conidi, comportant-se com a conidiòfor, origina un nou conidi a través d'un porus.

Aspergillus sp.

El gènere *Aspergillus* inclou fongs filamentosos hialins, dels quals se'n coneixen cap a 900 espècies. Tots són contaminants ambientals comuns i es troben a gairebé tot arreu, i a més algunes espècies poden infectar humans i provocar aspergil·losis com otomicosis, queratitis... Solen aparèixer en forma de brots hospitalaris després d'obres i remodelacions.
Els investigadors Rapper i Fennell els van classificar en 18 categories, segons les característiques morfològiques que presentaven, de les quals 12 estan relacionades amb patologies humanes.

ASPERGILOSIS			
85%	**5-10%**	**2-3%**	**<2%**
A. fumigatus	*A. flavus*	*A. niger* i *A. terreus*	*A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. glaucus*, *A. clavatus*, *A. cervinus*, *A. candidus*, *A. flavipes* i *A. ustus*

Es comporten com a patògens oportunistes en pacients immunodeprimits: afectats del SIDA, trasplantats, pacients oncològics...

Les espècies d'*Aspergillus* poden créixer en tots els medis de cultiu, gairebé, però la majoria són sensibles a l'actidiona. Els més patògens són termòfils i necessiten temperatures al voltant dels 37ºC per créixer (amb excepció d'alguns mesòfils que es desenvolupen a temperatures de 25ºC).
Per a identificar les espècies d'*Aspergillus* és recomanable utilitzar medis de cultiu com el Czapek (en medi Sabouraud, la majoria d'*Aspergillus* creixen exuberantment, però no tots desenvolupen els seus trets característics).

MORFOLOGIA:

VISTA MACROSCÒPICA: degut a la gran varietat d'aspectes macroscòpics, és possible identificar una espècie d'*Aspergillus* a simple vista. Tot i així, sempre és millor fer una observació microscòpica, per sortir de dubtes.

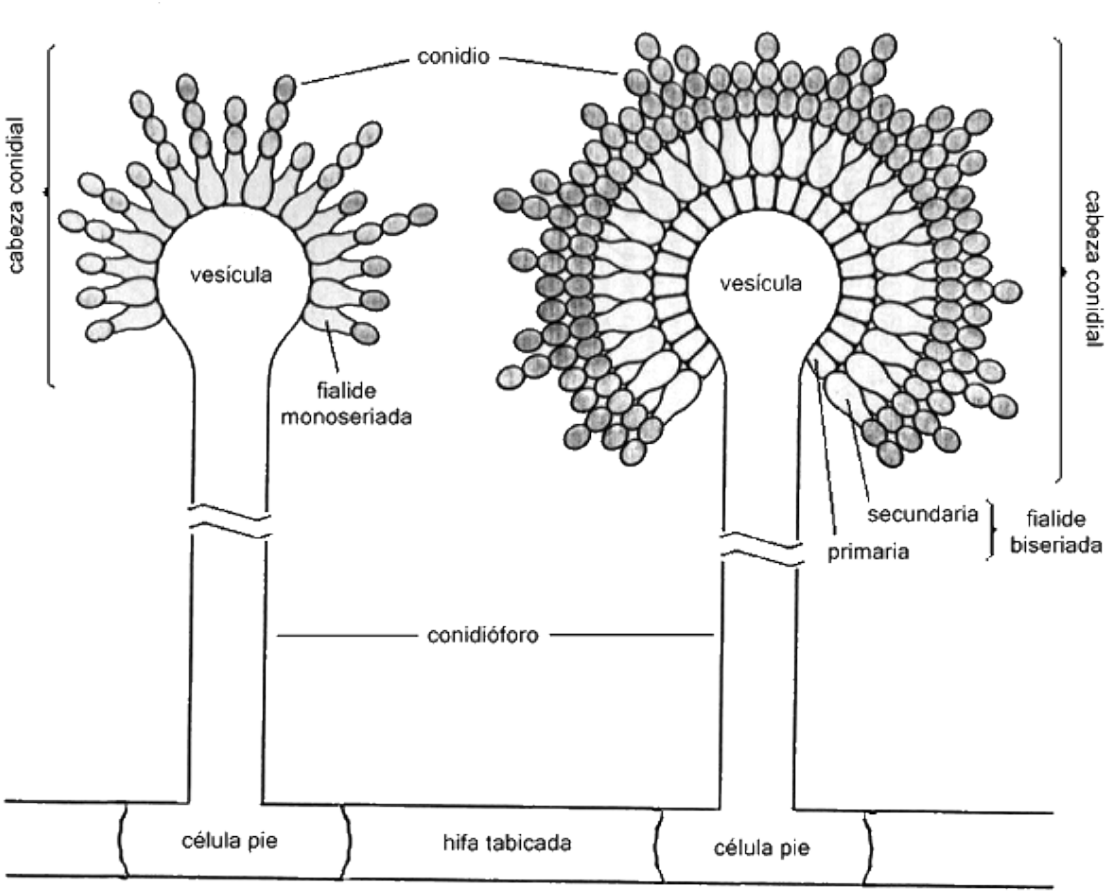
TEXTURA		
vellutada	cotonosa	granular

COLOR			
blanc o blavós	verd	marró	negre
A. fumigatus	*A. flavus*	*A. terreus*	*A. niger*

La coloració sol veure's a totes les estructures de la colònia: miceli, conidiòfors i espores.

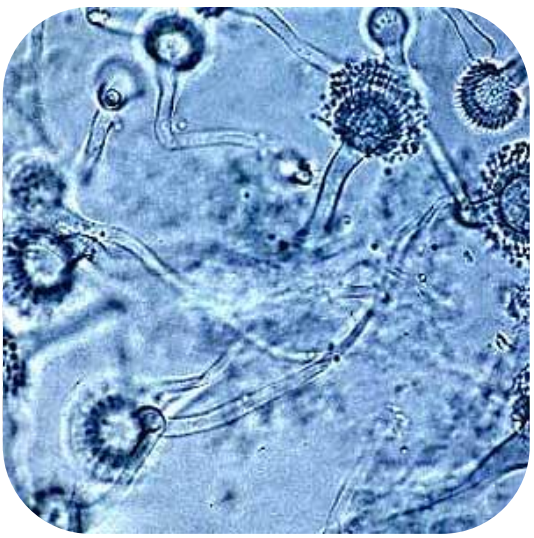
Colònies d'*Aspergillus niger*.

VISTA MICROSCÒPICA: gràcies als estudis de Rapper i Fennell sobre aquest gènere de fongs, amb tan sols veure les característiques microscòpiques (com els conidiòfors, els fiàlids, els conidis, etc.) d'una colònia d'*Aspergillus* podem identificar-ne l'espècie molt fàcilment.



El **conidiòfor** consisteix en una branca que s'aixeca de les hifes vegetatives del miceli (normalment en angle agut), que pot variar en els següents aspectes: longitud i diàmetre, presència o no de septes, pigmentació, rugositat (llis o amb berrugues o punxes).

El cap del conidiòfor (vesícula, fiàlids i conidis) és diferent en cada espècie i per tant essencial per a poder classificar-les. S'assembla a un asperges, l'instrument religiós de l'aigua beneïda (d'aquí li ve el nom).



Conidiòfors d'*Aspergillus flavus*.

La **vesícula** és l'ampliació distal final del conidiòfor, que pot presentar diverses formes: globosa, el·líptica, etc. i pot ser hialina o pigmentada.

Els **fiàlids** s'encarreguen de formar els conidis. Es poden trobar al voltant de tota la vesícula o en columna. Poden ser hialins o pigmentats.

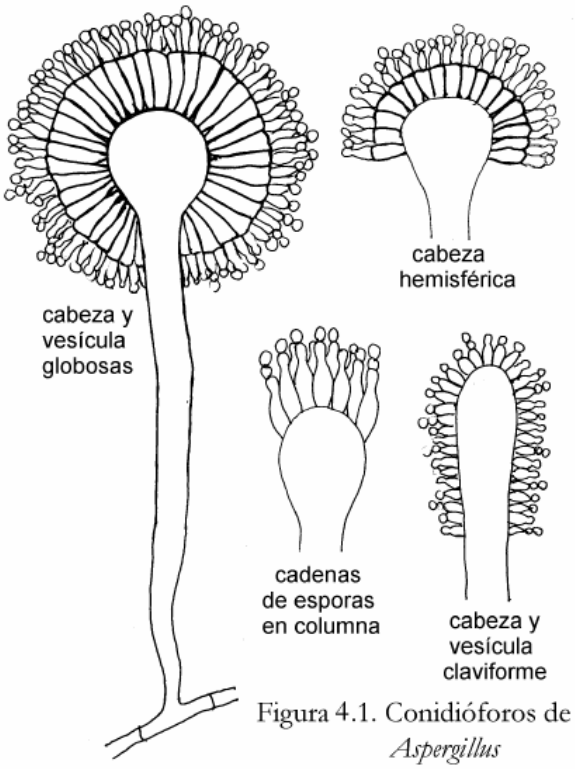


Figura 4.1. Conidióforos de *Aspergillus*

Els **conidis**, esfèrics o subesfèrics, sorgeixen dels fiàlids i poden formar cadenes de fins a uns 10 conidis. Hialins o pigmentats. La seva superfície pot ser llisa, rugosa, amb punxes, etc.

Cladosporium sp.

Aquest gènere engloba unes 40 espècies, la majoria de les quals es troben sobre restes vegetals o al terra com a patògenes. Algunes són fitopatògenes i capaces d'atacar cel·lulosa, pectina i lignina.
Tal com els altres tres, el *Cladosporium* és un fong de distribució universal, i és el taxó més abundant a l'aire de tot el món (si per metre cúbic d'aire hi tenim 10000 espores, més de 6000 són de *Cladosporium*).

És àmpliament citat com a causant d'asma, i fins i tot algunes espècies es poden comportar com a oportunistes i provocar infeccions pulmonars, afectar la pell, etc.
Tot i així, el màxim interès per aquests fongs és pel gran poder al·lergogen dels seus conidis, que es poden trobar a l'atmosfera, als exteriors i als interiors en concentracions molt altes.

MORFOLOGIA:

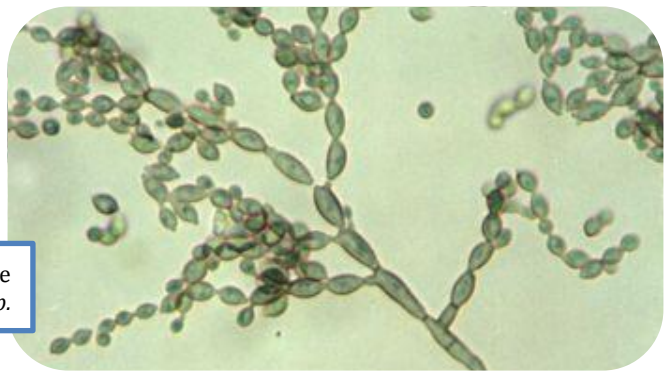
VISTA MACROSCÒPICA: les colònies de *Cladosporium* presenten característiques macroscòpiques poc variades.

TEXTURA
vellutada (amb/sense replecs)

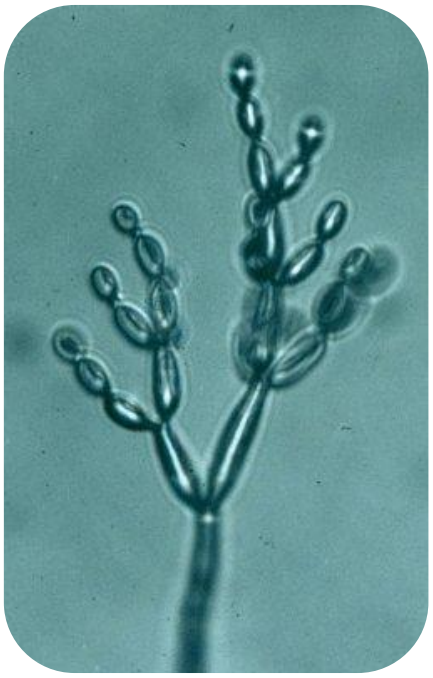
COLOR		
olivaci	marró	gris

Colònia de *Cladosporium*.

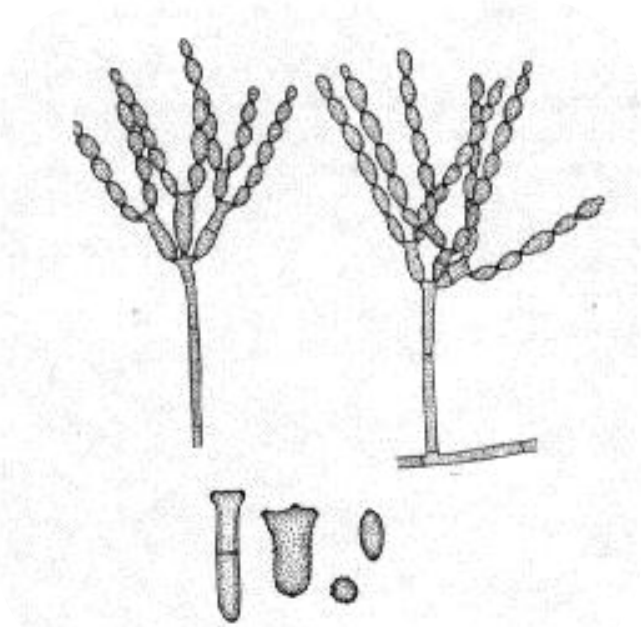
VISTA MICROSCÒPICA: els **conidiòfors** no molt diferents de les hifes vegetatives, de coloració marró o verda i de superfície llisa o lleugerament granulosa, i de vegades ramificats.
Els **conidis** en cadenes acròpetes o solitaris, de forma variada (el·líptics, ovoides, piriformes, fusiformes, esfèrics, subesfèrics), amb una cicatriu a la base, i de vegades amb un o dos septes; de paret llisa, rugosa o amb punxes, de color olivaci, marró o hialines. Els conidis poden assolir la mida de 3-7x2-4µm.



Conidiòfor i conidis de *Cladosporium sp.*



Conidiòfor amb conidis de *Cladosporium sp*.



Conidiòfors (a dalt) i tipus de conidis (a baix): amb un septe, cilíndrics, fusiformes o subesfèrics.

Penicillium sp.

El *Penicillium* engloba espècies de floridura que se solen trobar com a sapròfits en diversos substrats: gra, palla, cuir, fruita, etc. La importància que tenen amb la vida humana és que, a part de causar biodegradació, produeixen micotoxines com l'apreciat agent antibacterià – la penicil·lina (produïda per *P. notatum* o el seu sinònim *P. chrysogenum*) i a més participen en la formació de formatges com el roquefort o el camembert (*P. roqueforti* i *P. camemberti*, respectivament).

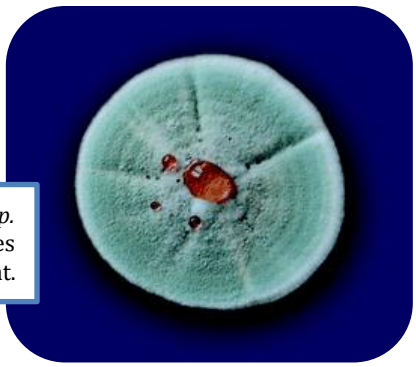
Per a una identificació de les espècies correcta, s'hi aconsella utilitzar medis de cultiu com l'agar Czapek o el Malt Extract Agar (MEA).

MORFOLOGIA:

VISTA MACROSCÒPICA: les colònies de *Penicillium* són inicialment blanques i piloses, però a mesura que maduren poden adoptar les següents característiques:

TEXTURA	
cotonosa vellutada	polsosa

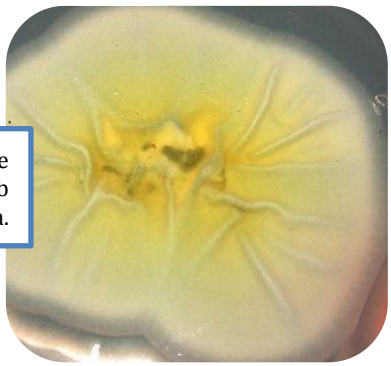
Poden presentar exudat: gotes d'aigua al damunt de la colònia.



Colònia de *Penicillium sp.* amb gotes vermelloses d'aigua al cim: exudat.

COLOR		
blau verdós	verd	blanc
		P. camemberti

Poden presentar pigmentació al revers de la colònia: generalment groga.

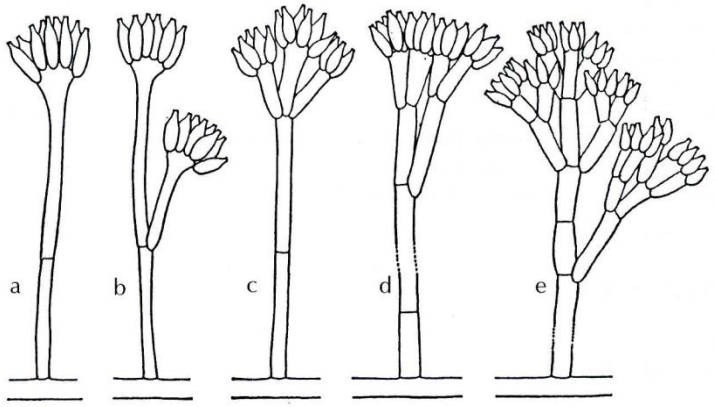


Revers d'una colònia de *Penicillium sp.* amb pigmentació groga.

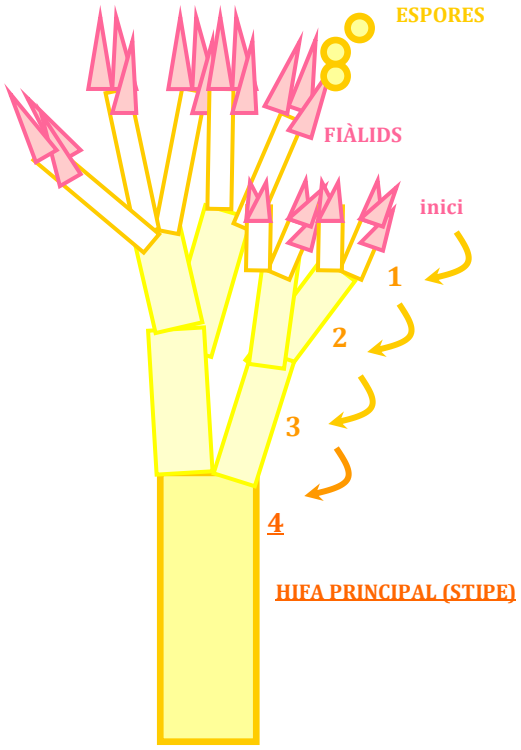
VISTA MICROSCÒPICA: aquest gènere es caracteritza per originar els seus conidis en mitjançant força ramificacions del **conidiòfor**, de tal manera que aquest adopta la forma d'un pinzell (d'aquí ve el seu nom). Els extrems d'aquestes ramificacions s'anomenen **fiàlids**, que són les cèl·lules productores de conidis.

Les hifes i ramificacions poden assolir un diàmetre de 3µm, i les seves parets poden ser llises, rugoses o amb punxes. Les parets dels fiàlids (que poden assolir les 15µm de llargada), però, sempre són llises.
Els **conidis** són esfèrics o el·líptics, sense septes, hialins (que en massa es veuen de color verd, verd blavós, verd oliva o gris), de paret llisa o rugosa.

Una de les característiques més importants a tenir en compte a l'hora d'identificar una espècie de *Penicillium* és el nombre de ramificacions dels seus conidiòfors: es poden tractar de conidiòfors simples (a) o compostos, i dins d'aquests últims trobem conidiòfors biverticil·lats (b, c), terverticil·lats (d) i quaterverticil·lats (e).



Com es distingeix, però, un conidiòfor simple d'un de compost?
Simplement comptant el nombre de ramificacions des d'un dels fiàlids fins a l'hifa principal (stipe) del conidiòfor:



Aquest conidiòfor, doncs, és quaterverticil·lat.

c) INSTITUT LA GARROTXA

*L'**Institut La Garrotxa** és un centre públic que depèn del Departament d'Ensenyament de la Generalitat de Catalunya. Creat a l'any 1974 com Institut de Formació Professional va experimentar un creixement constant fins a l'any 1995 (1400 alumnes, 100 professors i 7 especialitats).*

Situació

En aquesta fotografia aèria de l'**Institut La Garrotxa** es distingeix clarament el context rural que envolta el centre, el qual potencia la més gran mostra d'espores, ja que molts fongs són sapròfits i es nodreixen de restes vegetals.

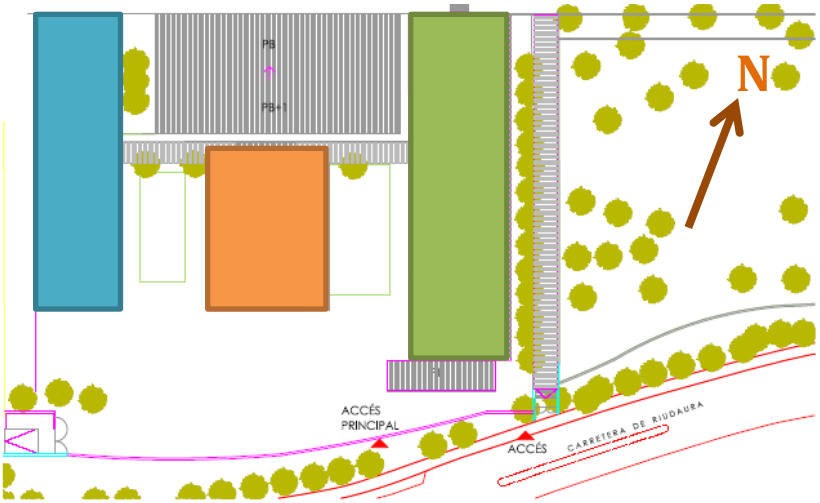
Foto: E. Masdeu

De l'institut (dins el recinte de punts grocs) se'n diferencia la part nova, construïda fa uns 4 anys, que és de color blanc. Consta d'un llarg edifici que s'allarga en forma de barra (/). Al costat dret es veuen els sis mòduls i tallers, de dimensions semblants.
A la dreta podem veure l'institut vell: quatre edificis marronosos que formen una mena d'E (en aquesta foto, així: Ǝ). A sota de l'E, es pot veure el campus.

Aquesta és una fotografia a vista d'ocell de l'Institut La Garrotxa[9] i els voltants.

Plànols

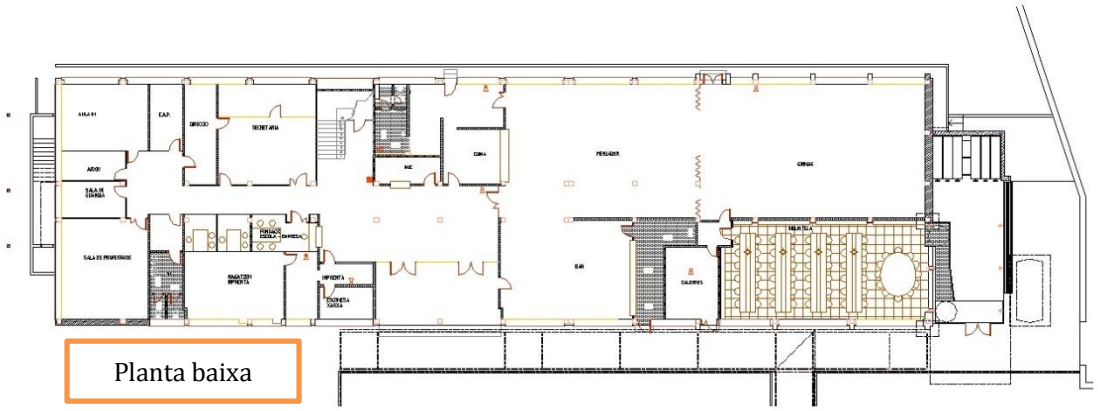
En aquest plànol podem veure de nou la E de l'edifici antic i el campus:



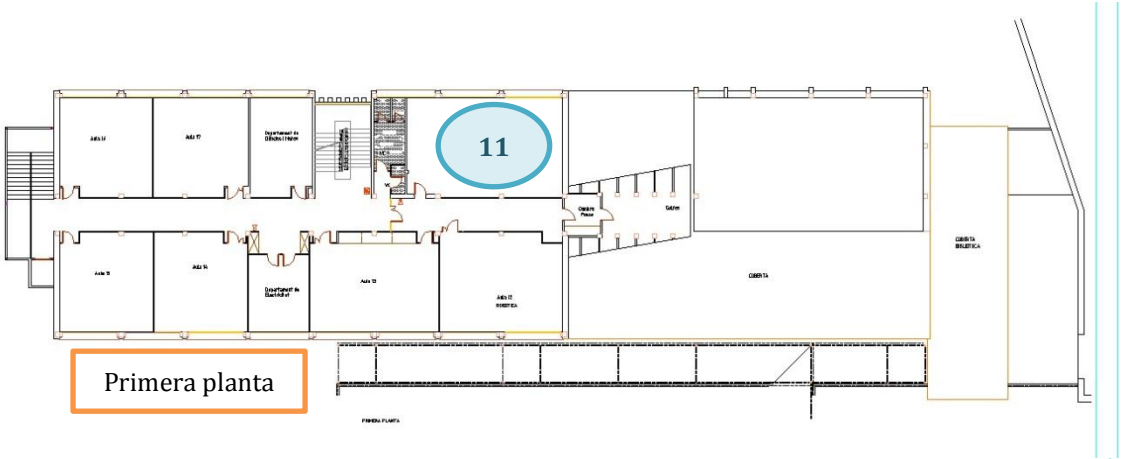
L'edifici de l'esquerra (blau) és l'edifici ponent, el del mig (taronja) és l'edifici sud, i el de la dreta (verd) és l'edifici llevant.

[9] Coordenades: +42° 11' 0.01", +2° 28' 6.13", fotografia de Google Maps.

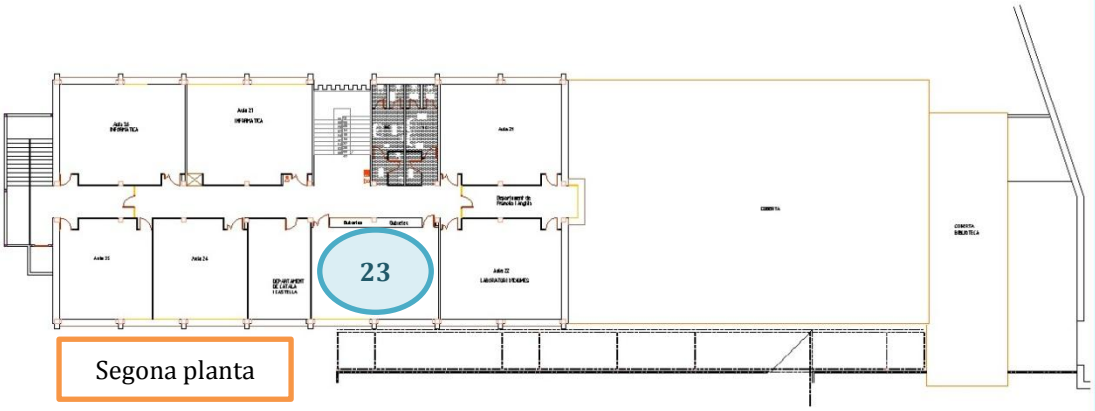
EDIFICI LLEVANT:



Planta baixa

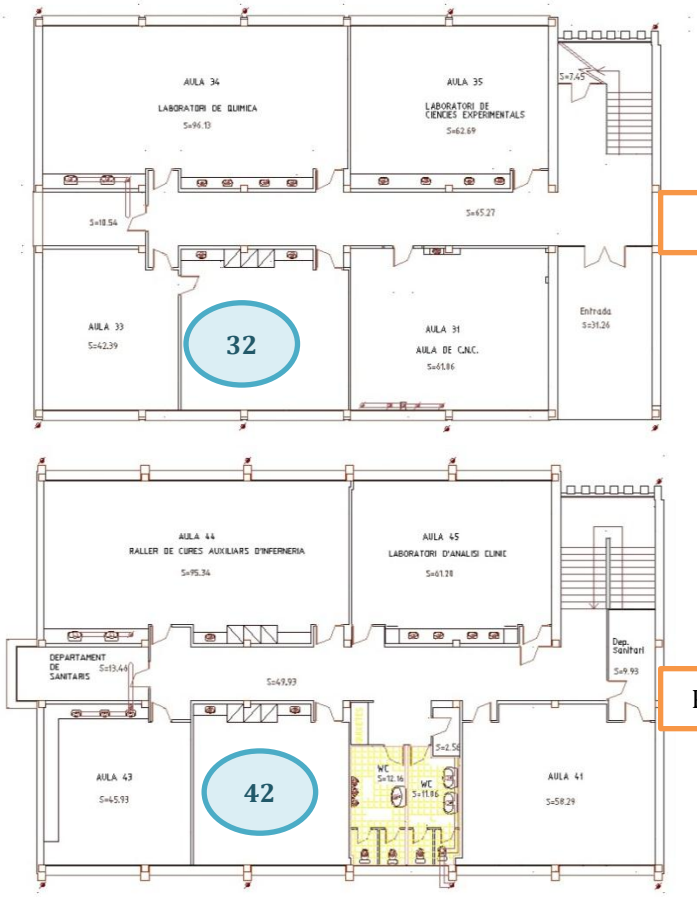


Primera planta

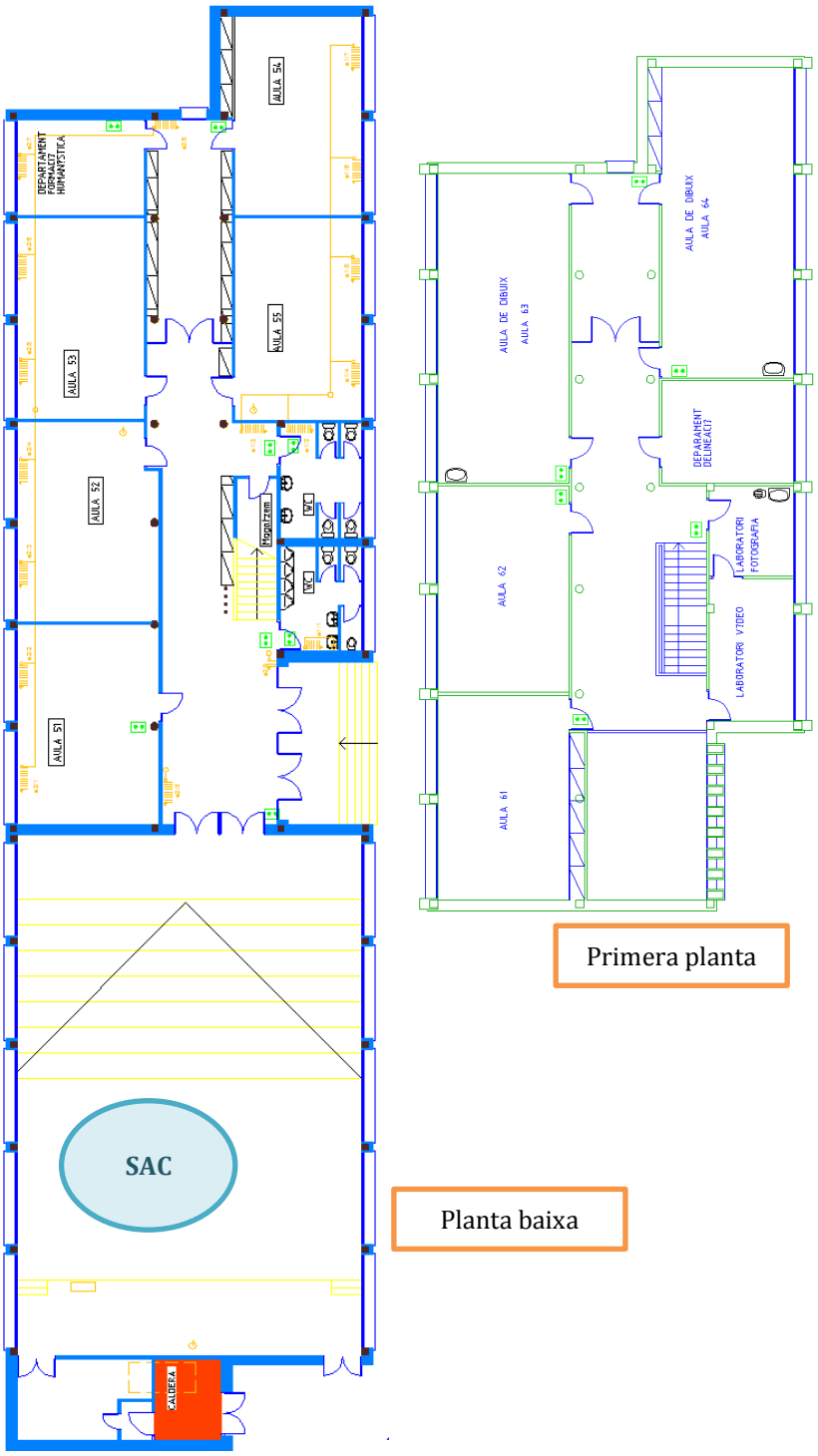


Segona planta

EDIFICI SUD:


AULA 34
LABORATORI DE QUIMICA
S=96.13
AULA 35
LABORATORI DE CIENCIES EXPERIMENTALS
S=62.69
S=7.45
S=65.27
S=18.54
AULA 33
S=42.39
32
AULA 31
AULA DE C.N.C.
S=61.86
Entrada
S=31.26
Planta baixa
AULA 44
RALLER DE CURES AUXILIARS D'INFERMERIA
S=95.34
AULA 45
LABORATORI D'ANALISI CLINIC
S=61.28
DEPARTAMENT DE SANITARIS
S=13.44
S=49.93
Dep. Sanitari
S=9.93
S=2.56
AULA 43
S=45.93
42
WC
S=12.16
WC
S=11.96
AULA 41
S=58.29
Primera planta

EDIFICI PONENT:



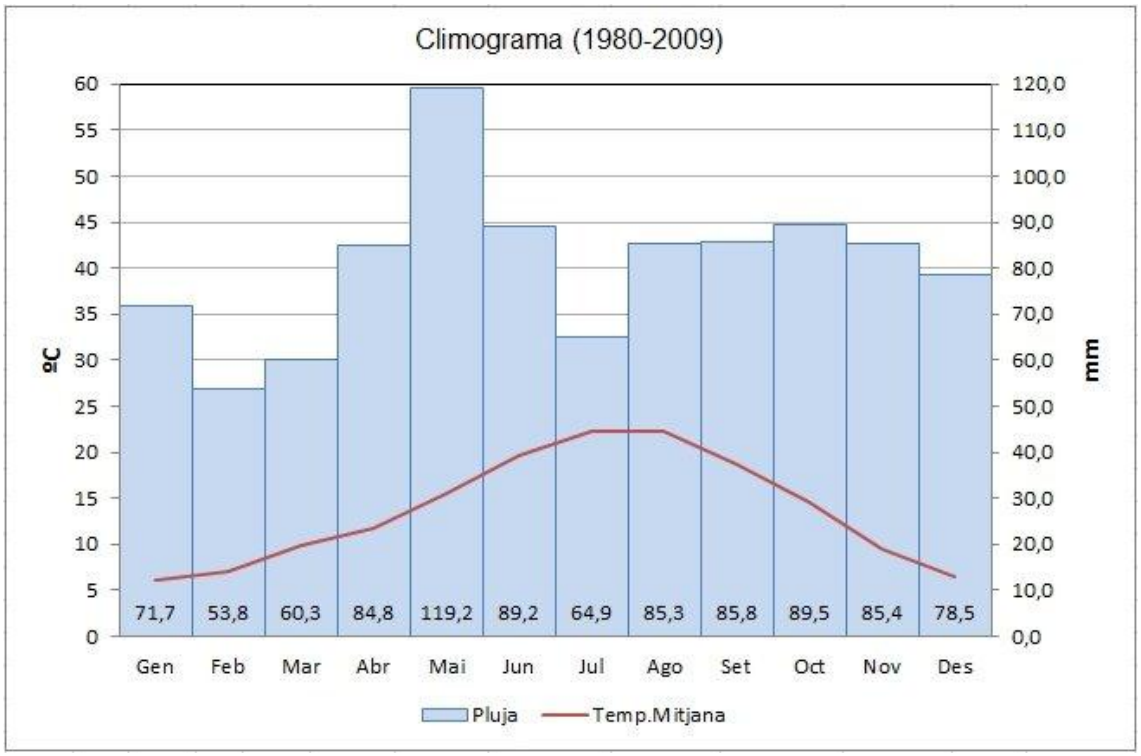
Primera planta

Planta baixa

Característiques climatològiques

El creixement de fongs i els nivells d'espores es veuen molt afectats per la temperatura, la humitat relativa, la situació geogràfica, les condicions meteorològiques i depenen de la presència de material vegetal en descomposició i restes animals.
Tot i que alguns resisteixen el fred, la majoria de fongs són incapaços de créixer bé en temperatures inferiors a 5ºC, per la qual cosa no existeixen casos greus d'al·lèrgia als fongs aerotransportats a regions nòrdiques (per damunt del tròpic de Càncer, aproximadament).

El clima que es viu al Pla de Dalt, el barri on hi ha l'**Institut La Garrotxa**, és el mateix que es viu a la resta d'Olot. Es tracta d'un clima temperat, amb pluges força freqüents per primavera i tardor, i normalment mitja setmana de nevades per hivern.
Es tracta del clima mediterrani (ideal pel cultiu de tòfones). Aquest, doncs, és un bon lloc pel desenvolupament de fongs.



Aquest és un climograma d'Olot (també anomenada "L'orinal del cel") obtingut de dades registrades en els últims 30 anys.
Tal com el malnom indica, és una ciutat força humida i plujosa.

Data	Temperatura mitjana (ºC)	Temperatura màxima (ºC)	Temperatura mínima (ºC)	Humitat Relativa mitjana (%)	Humitat Relativa màxima (%)	Humitat Relativa mínima (%)	Precipitació (mm)
1	22,1	30,9	13,2	68	96	42	0
2	22,5	30,6	15,3	70	92	45	0
3	17,6	24,9	12,3	81	99	49	22,2
4	16,8	22,9	12	84	99	61	0,1
5	20,6	27,9	14,2	72	95	42	0
6	20,5	26	14,7	78	96	56	0
7	23,7	33,8	16,8	67	94	28	0
8	19,6	24,5	13,9	71	96	49	0
9	18	24,9	10,5	73	96	47	0
10	19,3	27,9	14,2	73	93	37	0,1
11	18,3	25,3	11,7	75	94	44	3,1
12	14,7	21,9	9	81	97	46	12,2
13	15,9	23,2	11,8	77	98	39	0
14	20,2	28,3	11,2	63	97	36	0
15	21,8	32	11,8	56	88	25	0
16	22,8	33,6	12,5	52	82	24	0
17	22,7	31,1	13,8	65	92	41	0
18	22,4	31	15,1	62	86	33	0
19	21,8	28,2	16,4	69	94	46	0,2
20	23,6	31,9	16,4	64	97	34	0,7
21	24,9	35,7	16,2	54	85	20	0
22	21,5	28,9	14,6	63	91	36	0
23	21,8	31,3	13,1	60	92	35	0
24	24	32,9	14,6	58	89	34	0
25	24,9	34	15,6	57	88	29	0
26	25,6	34,9	17,2	60	89	32	0
27	26,4	34,4	17,8	57	89	35	0
28	27,2	36,1	19,9	52	81	23	0
29	25,2	34,5	17,1	68	92	40	0
30	24,4	33,6	16,7	69	92	40	0

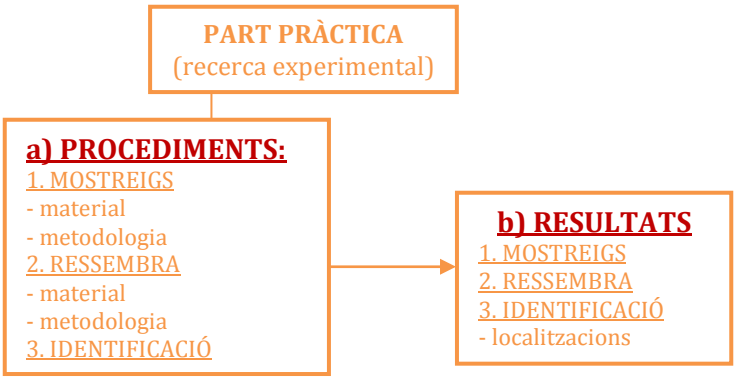
Aquesta és una taula facilitada pel Servei Meteorològic de Catalunya (METEOCAT) amb les temperatures, humitats i precipitacions del mes de juny de 2012 a Olot.

Es pot consultar la temperatura i la humitat mitjanes i el vent del mes de juny (quan es van realitzar els experiments) a la pàgina 36.

la inspiració d'en Calvin

PART PRÀCTICA

La part pràctica d'aquest treball consisteix en mostrejar els diferents espais de l'institut per tal de comprovar la presència d'espores fúngiques a l'aire que respirem cada dia de curs. Aleshores cal tractar les colònies formades i preparar-ne cultius purs (fent ressembra) i finalment cal fer observacions al microscopi de preparacions a fi que es puguin identificar les diferents espècies (o almenys gèneres).



Com es pot veure a l'esquema, la part pràctica es divideix en *Procediments* i *Resultats*. Primer es comença pels *Procediments*:

a) PROCEDIMENTS

Dins l'apartat de procediments s'hi engloben tots els **materials emprats** i tot el **mètode seguit** des del mostreig fins a la identificació de les espècies fúngiques presents a l'aire de cada espai, passant per les ressembres que es van realitzar amb l'objectiu d'aconseguir cultius purs.
Les dues primeres parts (*Mostreigs* i *Ressembra*) es van realitzar a l'Institut La Garrotxa. La tercera part, la *Identificació*, es va començar a l'Institut, però a falta de material adequat i consell de professionals, es va completar del tot a la Unitat de Botànica de la UAB, durant l'estada en empresa.

Així doncs, tot seguit es comença amb la primera part: *Mostreigs*.

1. MOSTREIGS

Seguint l'exemple d'altres treballs de recerca com el d'en Jordi Oliveras o el d'en Rafael Bassaganyes, per a realitzar els mostreigs de microorganismes de l'aire s'ha fet servir el MICROFLOW, un aparell de succió que capta espores i bacteris aerotransportats a velocitat programable en un medi de cultiu.

Aquests mostreigs, en total uns 20, es van realitzar el mes de juny de 2012, i el propòsit era realitzar anàlisis a diferents espais de l'institut per tal de conèixer-ne les respectives càrregues fúngiques. De cada mostreig se'n van fer **rèpliques** (la majoria de vegades només una rèplica per mostreig). Sumant les rèpliques, doncs, es van fer més de 40 succions.

A continuació s'explica el material utilitzat i la metodologia que es va seguir.

MATERIAL

MICROFLOW, mostrejador aerobiològic

Per a mostrejar un espai amb el MICROFLOW no fa falta molt material – de fet, tota la *feina* la fa el mateix aparell. Tot i així, cal remarcar els següents instruments i objectes necessaris:

- MICROFLOW
- Tapa metàl·lica de recanvi
- Carregador del MICROFLOW
- Encenedor de gas
- Plaques RODAC Rosa de Bengala
- Taula de dades per emplenar
- Bolígraf (o llapis, segons el gust de cadascú)

Seguidament, s'expliquen les característiques i particularitats dels materials possiblement desconeguts pels lectors.

MICROFLOW:

DESCRIPCIÓ: el MICROFLOW és un **mostrejador microbiològic d'aire**, és a dir, un aparell que succiona un volum d'aire i a una velocitat programables i provoca l'impacte de partícules aèries (pòl·lens, conidis, bactèries,...) sobre un medi de cultiu. L'aire entra per uns petits orificis a la tapa de l'aparell i surt per unes escletxes laterals.
Aquest en concret el van deixar la Sra. Coma i la Sra. Herrero, tècniques de laboratori del SIGMA.

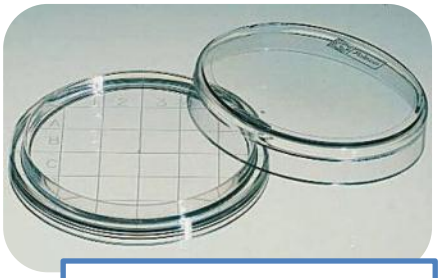
Amb la tapa metàl·lica desenroscada

INSTRUCCIONS D'ÚS: abans d'utilitzar el MICROFLOW, se l'hi han de carregar les bateries. És recomanable deixar-lo connectat al corrent 24h per tal d'assegurar que es carrega completament i que no s'aturarà durant una succió.
També **és precís esterilitzar les tapes metàl·liques** per si de cas tenen restes microbiològiques d'una succió anterior. Aquest procés es pot fer de dues maneres: flamejant els orificis de la tapa o posar la tapa a l'autoclau. En aquesta pràctica s'ha fet de la primera manera, ja que és considerablement més ràpida i fàcil.

Per a més informació sobre com programar el MICROFLOW, veure l'annex 1.

PLAQUES RODAC ROSA DE BENGALA:

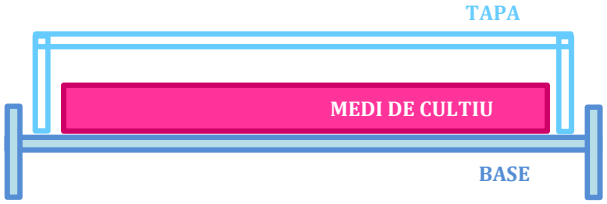
PLACA RODAC



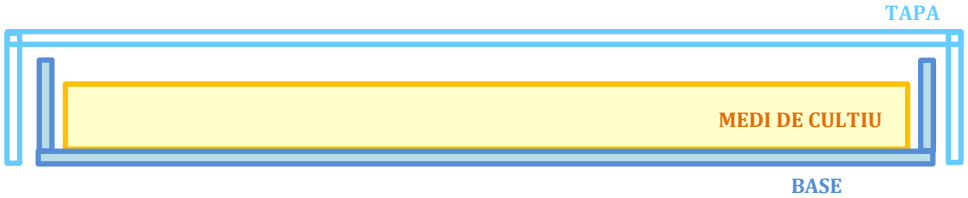
Placa RODAC (imatge extreta de *Fisher Scientific*)

CARACTERÍSTIQUES: són un tipus de plaques en les quals **el medi de cultiu sobresurt de la base**. A més, les plaques RODAC són molt més petites en diàmetre que les de Petri. Les RODAC acostumen a estar entre els 5 i 6cm de diàmetre, i les Petri poden arribar als 20cm.

ÚS: serveixen per a l'anàlisi de les superfícies llises (fent contactar el medi amb la superfície directament). També són les úniques compatibles amb alguns mostrejadors microbiològics com el MICROFLOW.



PLACA DE RODAC



PLACA DE PETRI

MEDI AGAR ROSA DE BENGALA

Placa RODAC Agar Rosa de Bengala amb colònies fúngiques (de Lic. Eric Caballero J.)

DESCRIPCIÓ: es tracta d'un medi de cultiu microbiològic selectiu per fongs, és a dir, el creixement de bacteris és inhibit pel **cloramfenicol**, un antibacterià d'ampli espectre. Permet el desenvolupament de fongs de creixement lent i limita els fongs de creixement accelerat (d'aquesta manera les anàlisis són més realistes i es poden distingir totes les UFC).
Per conèixer la composició del medi Agar Rosa de Bengala de MICROKIT (els laboratoris d'on es van obtenir les plaques preparades per a aquesta pràctica), veure l'annex 2.

METODOLOGIA

Amb el MICROFLOW ben carregat i amb les tapes metàl·liques esterilitzades ja es pot començar a fer mostreigs.

NOTA: si es flameja la tapa metàl·lica just abans de la succió es poden obtenir resultats enganyosos. Si es flameja la tapa, s'ha de deixar que es refredi abans de començar la succió, ja que l'escalfor podria malmetre les partícules aerobiològiques.

Seguint la tesi doctoral de la Sra. Mariana Buss com a model, es va programar el MICROFLOW de la següent manera:

Cabal mostrejat	300L
Temps de succió	3min.
Velocitat de succió	100L/min (o bé 1,6L/s)

Els passos que s'han de seguir per a mostrejar un espai són:

1. Encendre el MICROFLOW i programar-lo.
2. Obrir la tapa metàl·lica i col·locar-hi una placa Rodac. Destapar la placa i enroscar la tapa metàl·lica del MICROFLOW. S'ha de procurar **evitar tenir la placa Rodac oberta molta estona** i encara menys si ens estem movent, perquè hi ha el perill de contaminar-la abans de la succió.
3. Deixar el MICROFLOW sobre una superfície plana i iniciar la succió.
4. Durant la succió, procurar **no obstruir els orificis de la tapa metàl·lica**.
5. Quan el MICROFLOW acaba la succió, obrir la tapa metàl·lica i tapar la placa Rodac. Aleshores extreure la placa i marcar-la (amb un retolador permanent a la tapa).
6. Enroscar la tapa metàl·lica i apagar el MICROFLOW.

Durant el mostreig s'han de mesurar i controlar les següents variables:

- La temperatura en ºC.
- La humitat en %.

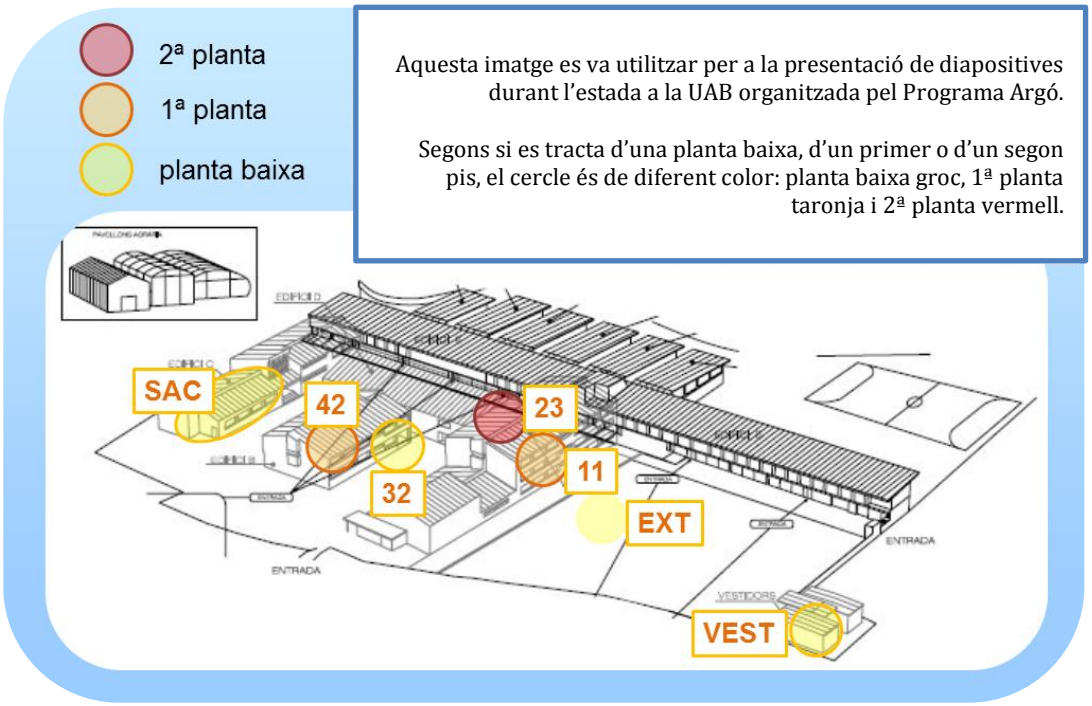
En el cas d'un mostreig d'interior també s'han de tenir en compte:

- Si es tracta d'una planta baixa, primer o segon pis.
- El volum en m^3.
- El nº de finestres i portes.
- Si la calefacció està encesa o no.
- La presència o no d'activitat humana.

LOCALITZACIÓ DELS MOSTREIGS:

Els mostreigs es van realitzar a diferents espais de l'institut, entre els quals s'inclouen: **aules** i **vestidors** (interiors) i el **campus** (exteriors). D'entre les aules mostrejades es pot diferenciar entre: plantes baixes, primers i segons pisos, i cal destacar el mostreig de la sala d'actes, l'aula més gran mostrejada.

Al següent mapa s'han marcat les zones des d'on es va succionar l'aire amb el MICROFLOW:



A continuació es desencripta la nomenclatura:

PLANTA BAIXA	1r PIS	2n PIS
Aula 32 (32) Sala d'actes (SAC) Vestidors de nois (VEST) Campus (EXT)	Aula 11 (11) Aula 42 (42)	Aula 23 (23)

Es van mesurar els volums de les aules, ja que pot ser que la quantitat d'aire contingut en un interior influeixi en la quantitat d'UFC/m³. La sala d'actes supera les altres en volum considerablement (és quasi 7 vegades més gran).

	Volum (m³)	Nº portes	Nº finestres obertes
Aula 11	168	1	4
Aula 23	177	1	4
Aula 32	156	1	3
Aula 42	146	1	3
Sala d'actes	**1043**	**3**	**5**
Vestidor	72	1	2

Si en comptes de 5 s'haguessin obert totes les finestres de la sala d'actes (20), potser s'haurien obtingut uns altres resultats, i s'hauria pogut relacionar el nº de finestres obertes amb la càrrega fúngica resultant d'una aula.

TEMPORITZACIÓ:

Les mostres es van recollir els dies 8 i 11 de juny.

Segons les dades recollides per l'estació meteorològica d'Olot del METEOCAT (Servei Meteorològic de Catalunya), les primeres tres setmanes de juny la temperatura es va mantenir al voltant dels 20ºC, la humitat es va moure pel 70% i va fer força vent: entre els graus 3 i 6 de l'escala de Beaufort (**suficient per moure les branques dels arbres**). Les pluges van ser imperceptibles.

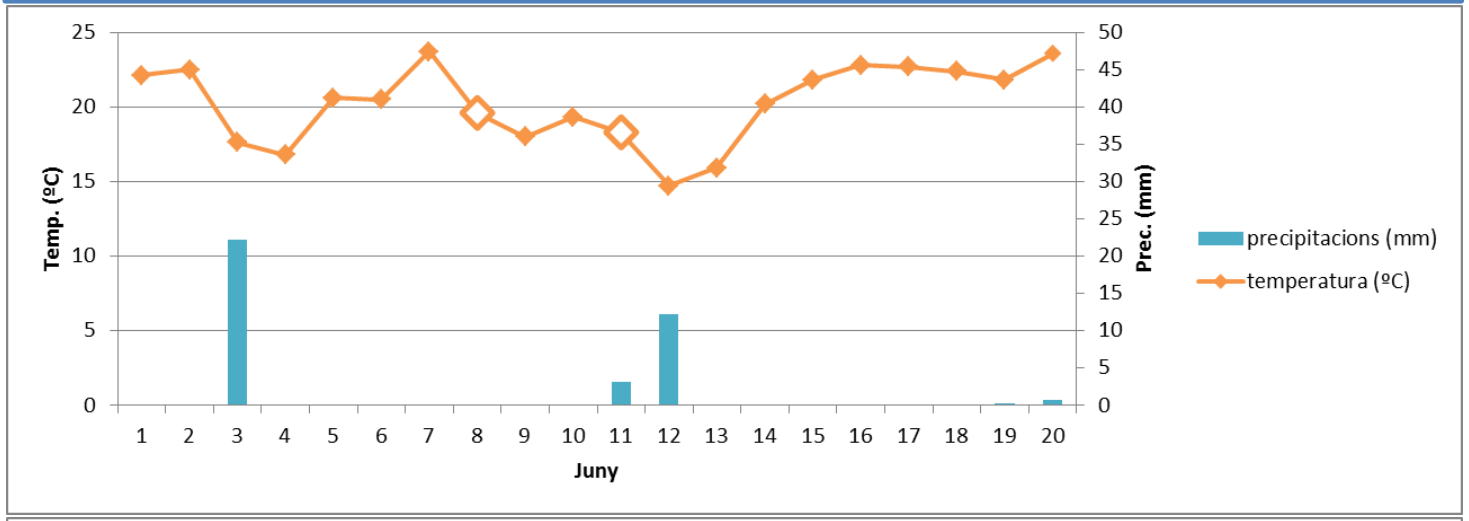
A continuació s'inclou una taula dels 20 primers dies de juny, amb els dies en què es van prendre mostres subratllats.

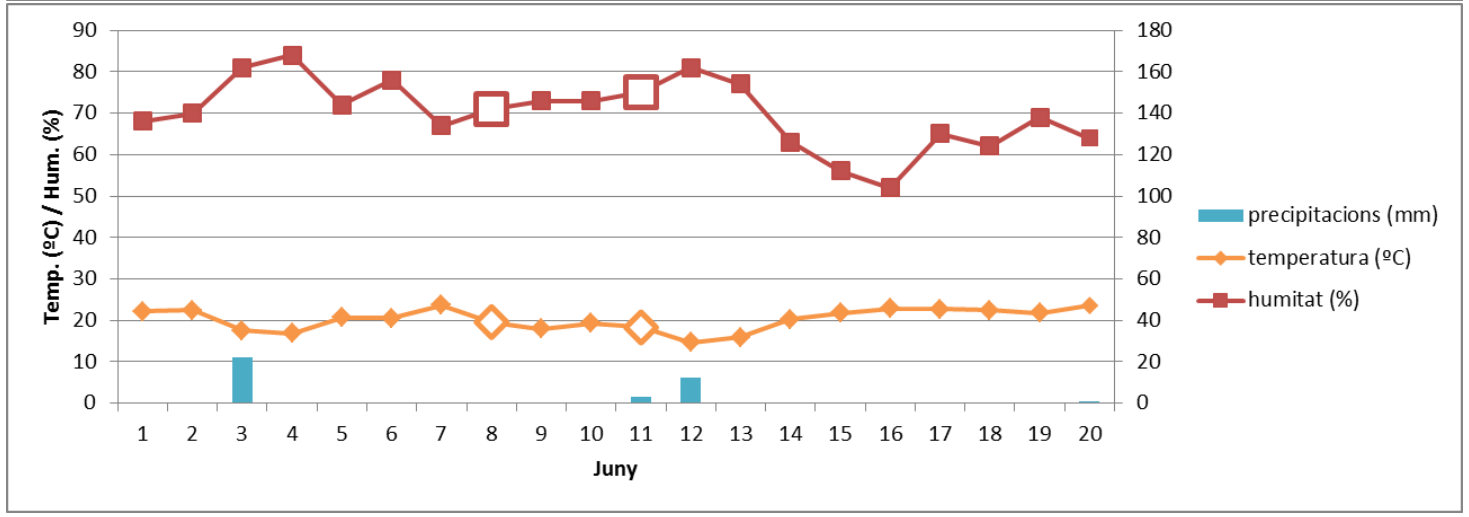
La direcció del vent el dia 8 era més aviat tirant cap a sud-oest, i el dia 11 al revés: nord-est. El dia 11 feia molt més corrent d'aire que el 8.

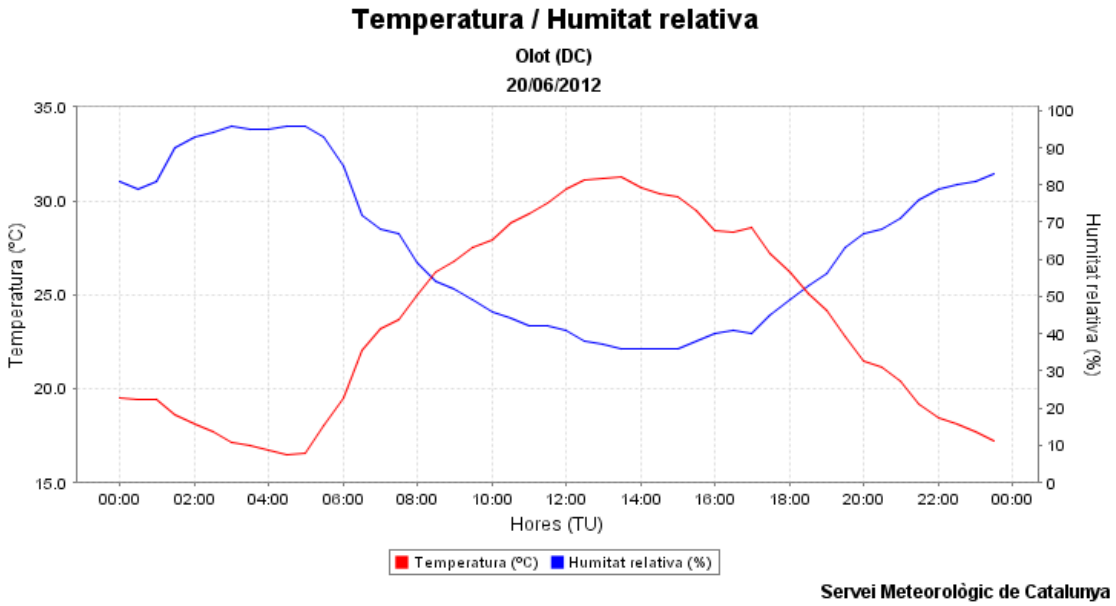
mes de juny	temperatura (ºC)	humitat (%)	vent (m/s - graus)	precipitacions (mm)
1	22,1	68	5,4 - 355	
2	22,5	70	6,5 - 0	
3	17,6	81	7,5 - 26	22,2
4	16,8	84	6,1 - 6	0,1
5	20,6	72	5,1 - 22	
6	20,5	78	6,2 - 41	
7	23,7	67	9,4 - 193	
8	19,6	71	5,7 - 24	
9	18	73	7,0 - 32	
10	19,3	73	8 - 182	0,1
11	18,3	75	11,3 - 198	3,1
12	14,7	81	7,1 - 44	12,2
13	15,9	77	7,7 - 25	
14	20,2	63	9 - 186	
15	21,8	56	10,6 - 204	
16	22,8	52	7,4 - 221	
17	22,7	65	7,3 - 11	
18	22,4	62	6,2 - 35	
19	21,8	69	4,6 - 25	0,2
20	23,6	64	6,2 - 32	0,7

NOTA: la direcció del vent està indicada en graus sexagesimals. Els 0º (o 360º) signifiquen direcció nord, els 90º est, etc.

METEOROLOGIA d'OLOT (Juny 2012)







Aquesta gràfica de METEOCAT mostra la temperatura i la humitat relativa mesurades a Olot el dimecres 20 de juny. Es pot observar com la temperatura (en vermell) incrementa a mesura que passen les hores i s'acosta el migdia. D'altra banda, la humitat fa tot el contrari: a mesura que la temperatura augmenta, la humitat tendeix a disminuir. Arribades les sis de la tarda i fins a mitjanit, els nivells tornen a ser com abans (la temperatura disminueix i la humitat augmenta).

Com ja s'ha comentat, es van prendre les mostres entre les 12 i les 14h, per la qual cosa les temperatures i humitats registrades a les taules del treball no coincideixen amb les temperatures i humitats mitjanes de METEOCAT.

NOTA: a més, s'ha de tenir en compte que aquesta estació està situada a uns 40m menys d'altura sobre el nivell del mar que el barri del Pla de Dalt, on es van realitzar els mostreigs.

2. RESSEMBRA

L'aspecte d'una placa RODAC Rosa de Bengala després de prendre-hi una mostra és el de la fotografia del costat. Amb aquesta placa es pot realitzar un comptatge d'UFC/m^3, per exemple, però no és recomanable fer-la servir per extreure'n mostres per fer preparacions per al microscopi. El motiu: la proximitat entre colònies de diferents espècies fúngiques pot fer que dins d'una preparació hi hagi més d'un tipus de fong, i que per tant sigui confós a l'hora d'identificar quin fong és quin.

Per tal d'aconseguir preparacions pures, s'han de fer cultius purs (lògicament). En aquesta part de la pràctica es prendran fragments de colònies de les plaques RODAC i s'implantaran a plaques de PETRI Sabouraud, i tindrem cultius purs com el de la fotografia inferior.

Els **cultius purs** són necessaris per tal d'aïllar una espècie fúngica que ens interessa i també per perllongar-li la vida.

A més, comprovarem si l'aspecte d'una colònia pot canviar completament segons si ha crescut en un medi o en un altre. Per aquesta raó farem també altres ressembres en altres medis selectius per fongs (com els dels laminocultius MYCOLINE).

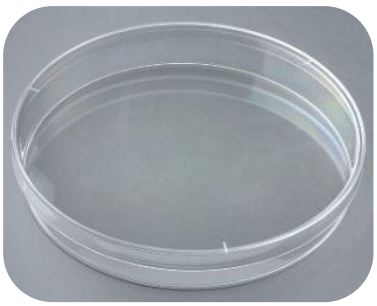
MATERIAL

Per a fer la ressembra necessitarem els següents instruments:

- Plaques PETRI Sabouraud
- Laminocultius MYCOLINE
- Anses de Kolle

PLAQUES PETRI SABOURAUD:

PLACA PETRI



CARACTERÍSTIQUES: com ja s'ha comentat a *Ressembra*, es tracta d'un tipus de placa de mida estàndard (entre 16 i 20cm de diàmetre), amb la tapa més ampla que la base, no com en el cas de les plaques RODAC.

ÚS: aquestes plaques s'utilitzen sobretot per fer sembres de microorganismes.

MEDI AGAR SABOURAUD

Medi Agar Sabouraud amb una colònia de *Curvularia harveyi*.

DESCRIPCIÓ: aquest tipus de medi és selectiu per fongs, degut a la presència de **cloramfenicol** (un agent antibacterià d'un ventall molt ampli) i al **pH àcid** al voltant de 5,5.
Per conèixer la composició del medi Agar Sabouraud de MICROKIT, veure l'annex 2.

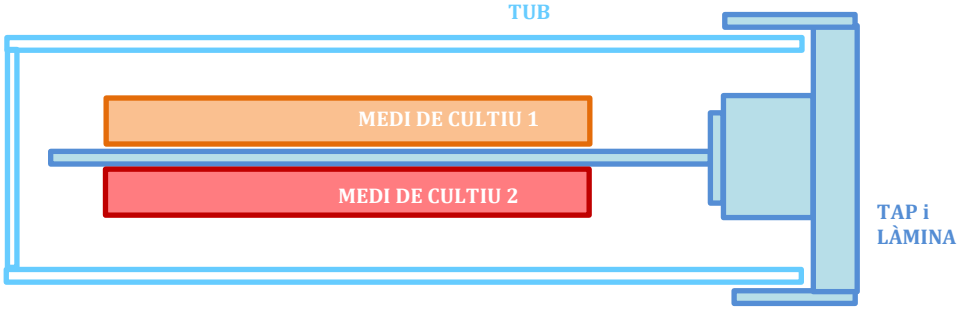
LAMINOCULTIUS MYCOLINE:

LAMINOCULTIU

CARACTERÍSTIQUES: els laminocultius consisteixen en un tub, la tapa del qual està unida a una làmina amb dos medis de cultius diferents, un a cada cara.

ÚS: són ideals per **analitzar superfícies o líquids** – fent contacte amb superfícies com taules, llibres, fulls i altres objectes llisos o impregnant la làmina en un líquid (orina, normalment).

LAMINOCULTIU



MYCOLINE

DESCRIPCIÓ: consisteix en un laminocultiu amb **medis selectius per fongs**. Un dels medis conté gentamicina i cloramfenicol, dos agents antibacterians, i l'altre conté actidiona (selectiu per alguns fongs) i roig de fenol (indicador de pH: els fongs **dermatòfits – queratinofílics**: es nodreixen de queratina, la proteïna que constitueix l'epiteli – alcalinitzen el medi i aquest vira de taronja a vermell).
D'aquesta manera ens mostra tan sols els fongs de la zona analitzada, i d'aquests ens diferencia els dermatòfits (sabrem si són dermatòfits si el color del medi Sabouraud actidiona canvia a vermell).

Els dermatòfits principals són *Microsporum*, *Trichophyton* i *Epidermophyton*, però algunes espècies d'*Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* i altres també són (es nodreixen de queratina, la proteïna que constitueix l'epiteli).

Vegeu la composició i les instruccions d'ús del Mycoline a l'annex 2.

METODOLOGIA

El procediment per a fer la ressembra no és molt complicat. Simplement seguint els següents passos es podia aconseguir un bon cultiu pur:

a. Preparar la placa RODAC amb la colònia diana i una placa PETRI Sabouraud per estrenar. Preparar també una ansa de Kolle.
b. Agafem la placa RODAC i traiem l'ansa de Kolle del seu embolcall.
c. Obrim la placa RODAC amb la mateixa mà amb què l'aguantem i prenem **un tros de la colònia diana** amb l'ansa de Kolle.
d. Tanquem i deixem la placa RODAC i agafem la placa PETRI Sabouraud.
e. Obrim la placa PETRI Sabouraud i freguem l'ansa de Kolle sobre la superfície del medi de cultiu.
f. Tanquem la placa PETRI Sabouraud i l'etiquetem (o fem una inscripció a la tapa amb un retolador permanent).

Repetim el procés amb cada medi dels laminocultius.

3. IDENTIFICACIÓ

Per fi s'arriba a la part més complicada, però també més entretinguda, de la pràctica: la identificació, és a dir, classificació dels fongs recollits (almenys se n'identificarà el gènere).

Tot i haver començat aquesta part de la pràctica a l'Institut La Garrotxa, es va acabar de fer a la UAB, disposant de material i tècniques adequades, i tenint la possibilitat de demanar ajuda al micòleg Prof. Girbal, a les palinòlogues Prof. Belmonte i Prof. de Linares, als analistes de la XAC Rut Puigdemunt, Elena Gabarra i David Navarro i molta més gent.

Hi ha diverses maneres de fer una preparació per al microscopi, però s'explicarà a fons la més professional i precisa de totes.

MATERIAL

Aquesta és la part de pràctica en què s'ha necessitat més instrumental de totes. Aquí s'inclou el material per a la metodologia més professional:

- Microscopi òptic compost
- Microscopi òptic compost amb càmera ZEISS Axioskop 40
- Lupa binocular ZEISS
- Pinces metàl·liques de punta fina
- Alcohol de 70º (en un pot)
- Encenedor
- Portaobjectes 26x76mm
- Cobreobjectes 20x20mm
- Tensioactiu TWEEN
* Bibliografia especialitzada

Suposant que tothom coneix com utilitzar un microscopi, passarem directament a l'explicació d'altres productes que hem fet servir.

TENSIOACTIU TWEEN:

TENSIOACTIU

Un **tensioactiu** és un agent que redueix considerablement la tensió superficial de l'aigua, és a dir, permet que les partícules hidròfobes es mesclin millor en aquesta (si en un riu hi llancem tensioactiu, els sabaters s'enfonsaran).
El tensioactiu ens permetrà fer una preparació per al microscopi en què espores i hifes no quedin seques – si la preparació fos seca, es faria malbé en poc temps i les espores es podrien aglomerar unes amb altres.

NOTA: el TWEEN és un tipus de tensioactiu que es fa al Dept. de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia de la UAB. Funciona de la mateixa manera que el sabó de rentar plats.

BIBLIOGRAFIA ESPECIALITZADA:

Sense bons llibres sobre micologia i amb claus dicotòmiques per classificar els gèneres i les espècies no hauria estat possible fer la identificació dels fongs recollits a l'institut.
D'entre molts llibres i quaderns (alguns d'edició interna) que es van fer servir, en destaquen dos: *Introduction to Food- and Airborne Fungi*, de R. Samson et al. **de la CBS Fungal Biodiversity Centre**, i *Atlas of Clinical Fungi*, **de G. S. de Hoog**, **J. Guarro** i altres.
Tant un com l'altre contenen característiques macroscòpiques i microscòpiques

METODOLOGIA

Aquesta part es divideix en tres processos:

a. Preparació de mostres
b. Observació al microscopi
c. Classificació amb claus dicotòmiques

a. PREPARACIÓ DE MOSTRES:

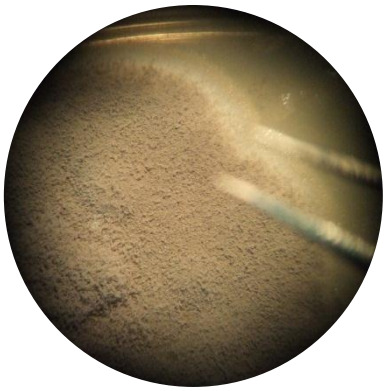
Per a muntar les preparacions fem servir gairebé tot el material esmentat a *MATERIAL*. Cal seguir aquests passos:

1. Triar la placa (de cultiu pur, per anar bé) d'on s'extraurà la mostra, i preparar un portaobjectes.
2. Esterilitzar les pinces: agafar les pinces de punta fina i remullar-les en el pot d'alcohol de 70º. Dins l'alcohol, obrir i tancar les pinces, i tancar-les per treure-les del pot. Amb les pinces tancades, apropar l'encenedor i flamejar les puntes. Si les pinces fossin obertes, l'alcohol s'evaporaria abans de flamejar-les. Anar amb compte: **vigilar la flama blava fins que s'apagui**, **procurar no tenir res inflamable sota les pinces mentre les flamegem**, no obrir les pinces mentre encara hi ha flama...

3. Mentre les pinces es refreden, observem la placa (tancada) a la lupa binocular i localitzem la colònia diana de la qual agafarem la mostra.

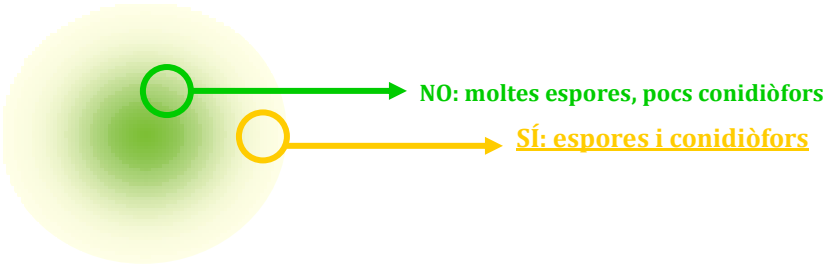
4. Aboquem una gota de TWEEN sobre el portaobjectes.

5. Amb els ulls als oculars, obrim la tapa amb una mà i amb l'altra prenem un tros dels extrems de la colònia (al centre de la colònia hi ha excés d'espores, i ens interessa observar hifes i conidiòfors, també).

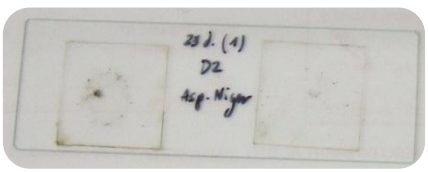


6. Escampem la mostra a la gota de TWEEN, procurant que es mescli bé.
7. Tapem la mostra amb un cobreobjectes 20x20. Alerta: **no es pot deixar caure, s'ha d'acompanyar amb els dits**. Etiquetem (o marquem amb un retolador permanent).

Respecte el punt nº5, cal esmentar que si es pren una mostra del mig de la colònia és molt probable que només s'obtinguin innumerables espores, ja que és el centre de la colònia el lloc on es va començar a esporular, i per tant el lloc on més conidis s'han acumulat.
Per a poder fer la identificació d'una espècie, **val més pinçar un tros de l'extrem de la colònia**. Moltes colònies presenten una corona radial d'un color diferent (moltes vegades blanquinosa) que consisteix en el miceli inferior que s'estén, però que encara no té conidiòfors ni ha esporulat.



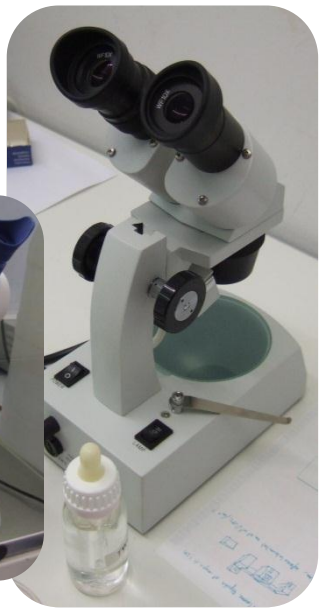
Com que al portaobjectes hi caben dos o tres cobreobjectes 20x20, podem tenir fins a tres mostres d'una mateixa colònia en una sola preparació. És una manera d'estalviar material i temps de treball.
L'aspecte final d'una preparació és el següent:



Ara ja es pot observar al microscopi per identificar les espècies (o els gèneres) dels fongs que s'han trobat.

b. OBSERVACIÓ AL MICROSCOPI:

Aquesta ha estat l'activitat que més temps s'ha emportat del treball. Ben bé quatre hores cada dia durant tres setmanes. Els analistes de la XAC hi podien estar fins a set hores al dia sense cansar-se, però s'ha de dir que per a un principiant acabava sent marejant.



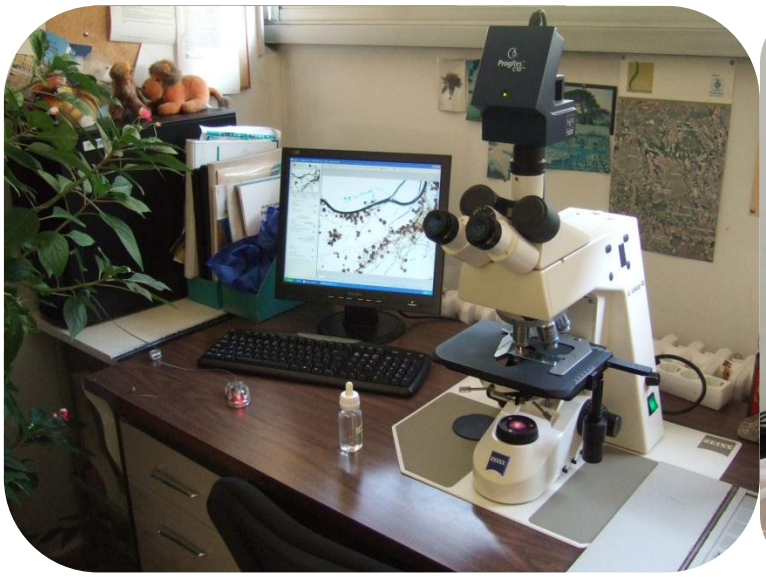
Les lupes binoculars podien arribar a x40 augments, per la qual cosa se n'inclouen les fotografies en aquest apartat com si fossin vistes per un microscopi òptic compost.

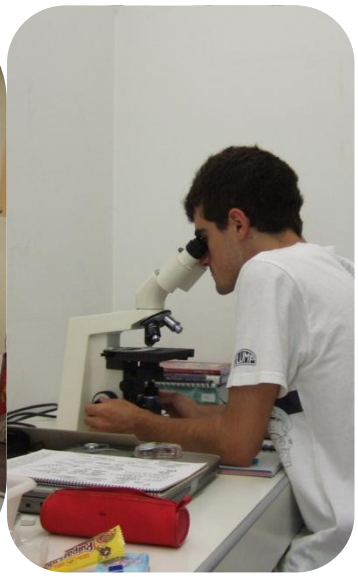
LUPES BINOCULARS

A part de la lupa binocular ZEISS (dreta), n'hi havia una altra de més antiga (esquerra). De fet, s'ha utilitzat més la segona, ja que es trobava al mateix departament. La ZEISS, en canvi, era del laboratori del micòleg Prof. Girbal, i tampoc era qüestió d'anar-li a *prendre*.

De x20 a x40 augments, enfocament manual i amb llum inferior i superior a la mostra.

MICROSCOPIS ÒPTICS COMPOSTOS



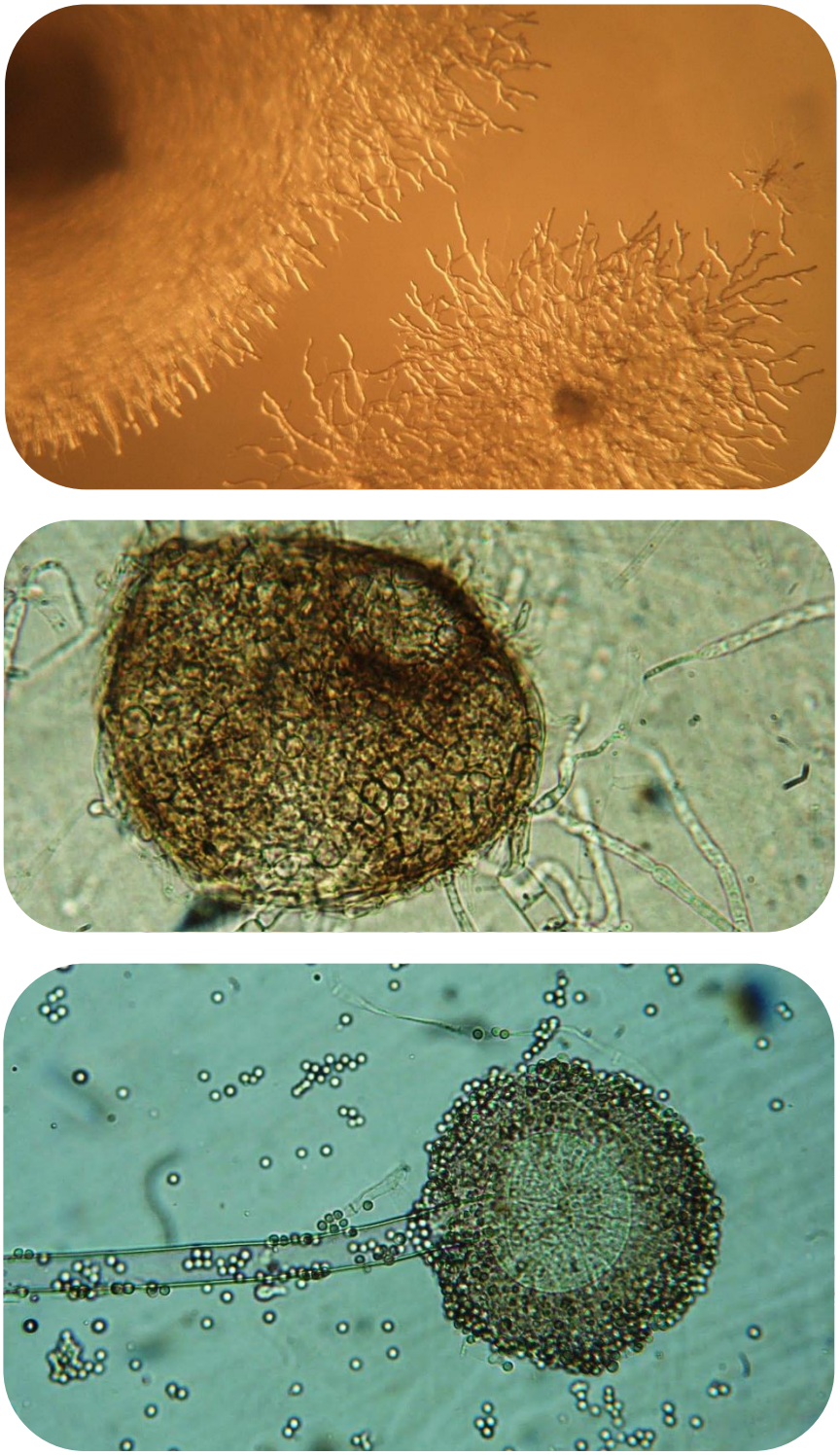


Oculars de x15, objectius de x10, x40 i x63 (**no cal oli d'immersió**).

Les dues fotografies de dalt són dels dos microscopis utilitzats durant la pràctica. El de l'esquerra és el del despatx de la Professora Belmonte, un ZEISS Axioskop 40 amb càmera connectada a l'ordinador. La mostra es podia observar pels oculars i també per la pantalla. S'havien de fer, però, alguns canvis de contrast, llum i exposició en les fotografies que es prenien, i acabava sent feina afegida, tot i que les imatges resultants eren millors.

Per no *molestar* la Prof. Belmonte, es va tendir a fer servir el microscopi òptic compost sense càmera, a un altre despatx. Es prenien fotografies amb una càmera digital tot enfocant per l'ocular del microscopi.
Les imatges obtingudes no estaven malament, i se'n van fer moltes més d'aquesta manera.

Aquí es pot veure, de dalt a baix, el miceli en desenvolupament d'una espècie de *Penicillium*, el picnidi d'una espècie de *Phoma* i el conidiòfor d'un *Aspergillus* amb un munt d'espores al voltant.
Es pot intuir la bandera d'Holanda, país on ha nascut la CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures), que s'encarrega d'estudiar la taxonomia i morfologia de fongs i també la seva genètica.



c. CLASSIFICACIÓ AMB CLAUS DICOTÒMIQUES:

I ara toca el més complicat de tot: la identificació de les espècies fúngiques mitjançant claus dicotòmiques.
Dins les claus de classificació, **les claus dicotòmiques** són les que sempre et permeten escollir entre dos camins. És un arbre de decisions amb múltiples bifurcacions.

Es pot començar a partir dels deuteromicets, els variants anamorfs d'Ascomicets i de Basidiomicets, és a dir, floridures de reproducció asexual.

Seguidament, trobem unes claus dicotòmiques amb les quals podem identificar els principals gèneres de Deuteromicets (les claus, evidentment, són de la CBS).

Amb taules com aquesta podem identificar fàcilment

KEY TO THE COMMON FOOD- AND AIRBORNE GENERA OF THE DEUTEROMYCETES TREATED

1a. Conidia borne in pycnidia ..... *Phoma* (p. 248)
1b. Conidia not borne in pycnidia, but on hyphae, conidiophores, sporodochia or synnemata 2

2a. Conidia produced from special conidiogenous cells (phialides, annellides etc.) in chains or in heads, in basipetal succession 3
2b. Conidia not produced from special conidiogenous cells, but acropetally or by fragmentation of fertile hyphae, synchronously or single 14

3a. Conidia in dry chains 4
3b. Conidia in moist or slimy heads 10

4a. Conidia usually 2-celled, borne on filamentous conidiogenous cells, more or less obliquely inserted, arranged like a spike. Colonies pinkish ..... *Trichothecium* (p. 264)
4b. Conidia always one-celled, borne on flask-shaped or cylindrical conidiogenous cells in straight chains. Colonies in various colours 5

5a. Colonies very restricted, reddish-brown. Conidia formed (in a quartet) by division of a cylindrical verrucose fertile hypha, cubic, becoming (sub)-globose. Xerophilic ..... *Wallemia* (p. 268)
5b. Colonies usually not restricted (except xerophilic *Aspergillus* species). Conidia not formed after division of fertile hyphae 6

6a. Conidiophores with a typical apical swelling ..... *Aspergillus* (p.64)
6b. Conidiophores without an apical swelling 7

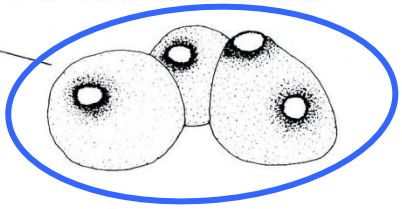
7a. Conidiogenous cells annellidic. Conidia with a broad truncate base ..... *Scopulariopsis* (p.252)
7b. Conidiogenous cells phialidic. Conidia without a broad truncate base 8

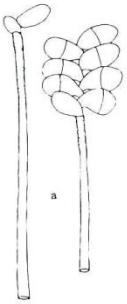
8a. Colonies dark grey to blackish. Phialides obovate (broadest at the top), conidia blackish. ..... *Memnoniella* (p. 162)
8b. Colonies not dark grey to blackish. Phialides flask-shaped or lanceolate (broadest at the base) 9

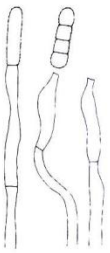
9a. Colonies yellow to brown. Phialides with a long neck ..... *Paecilomyces* (p.170)
9b. Colonies often greenish (some species whitish). Phialides with a short neck ..... *Penicillium* (p. 174)

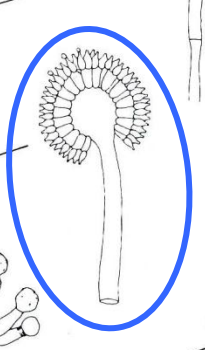
10a. Phialides long, awl-shaped, polyphialides absent ..... *Acremonium* (p. 58)
10b. Phialides more or less flask-shaped and/or polyphialides present, or phialides reduced 11

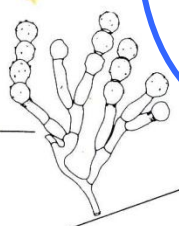
11a. Colonies usually green (when grown in light) ..... *Trichoderma* (p. 260)
11b. Colonies whitish, yellow, purple, violet, pinkish, brown or blackish 12

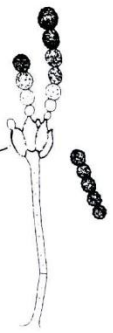


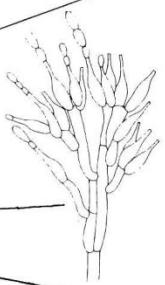


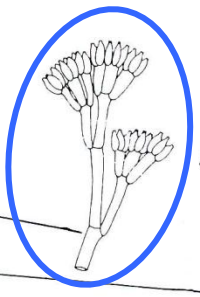


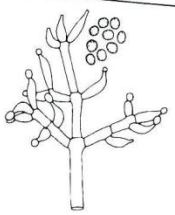




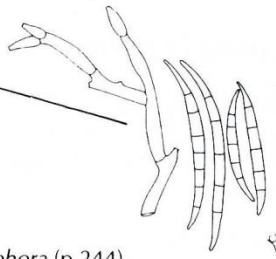




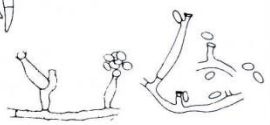




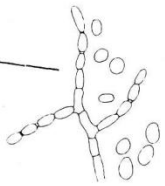
12a. Colonies white, yellowish pinkish, purplish, sometimes greenish. Septate banana-shaped conidia usually present ..... *Fusarium* (p. 120)
12b. Colonies black, sometimes pinkish. Conidia not septate 13



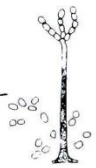
13a. Phialides solitary or in loose whorls, flask-shaped with a conspicuous collarette or phialides reduced. Conidiophores not distinct ..... *Phialophora/Lecythophora* (p.244)
13b. Phialides in dense apical clusters, broadly clavate, widest near apex, without conspicuous collarette. Conidiophores distinct ..... *Stachybotrys* (p.258)



14a. Colonies growing very fast, covering a 9 cm Petri-dish within a few days, loose, floccose, orange ..... *Chrysonilia* (p.104)
14b. Colonies not orange and not covering a 9 cm Petri-dish within a few days 15

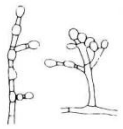


15a. Conidia only arthric 16
15b. Conidia both arthric and blastic or only blastic 18

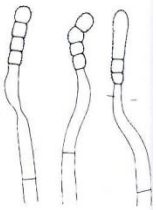


16a. Conidiophore stipes pigmented ..... *Oidiodendron* (p. 168)
16b. Conidiophore stipes hyaline or absent 17

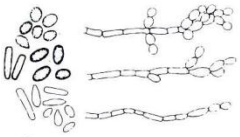
17a. Conidia hyaline, smooth-walled, more or less cylindrical. Intercalary conidia absent ..... *Geotrichum* (p. 160)
17b. Conidia (sub)hyaline becoming faintly coloured, and rough-walled with age. Intercalary conidia present ..... *Geomyces* (p. 158)



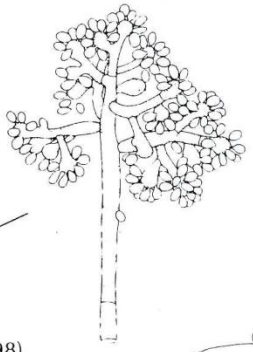
18a. Conidia formed in a quartet by division of a cylindrical fertile hypha ..... *Wallemia* (p.268)
18b. Conidia not formed in a quartet 19



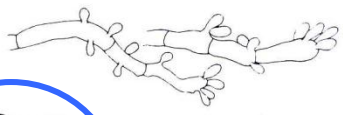
19a. Conidiogenous structure consisting of both arthroconidia and blastoconidia (compare also *Trichosporon* in yeasts and the thick-walled, brown arthroconidia-like hyphal cells in *Aureobasidium*) ..... *Moniliella* (p.164)
19b. Conidiogenous structures consisting of only blastoconidia 20



20a. Blastoconidia borne synchronously on hyphae, or from swollen cells or branches 21
20b. Blastoconidia not formed synchronously on hyphae or swollen cells or branches 22



21a. Conidia borne from denticles on terminally swollen conidiogenous cells. Conidiophores erect, apically branched (tree-like). Colonies thin, greyish-brown ..... *Botrytis* (p.100)
21b. Conidia borne on hyphae or on almost completely swollen branches. Colonies yeast-like, creamish-yellow to light brown, pinkish-orange or blackish-green ..... *Aureobasidium* (p.98)



22a. Conidia formed singly on indistinct conidiophores, clustered and visible as black dots ..... *Epicoccum* (p.118)
22b. Conidia formed singly or in chains, conidiophores distinct, not clustered 23

23a. Conidia in chains, smooth-walled. Colonies usually cream-coloured at first, darkening with age ..... *Moniliella* (p.164)

23b. Conidia in chains or single, rough-or smooth-walled. Colonies in greenish-black or greenish-brown shades 24

24a. Conidia rather thin-walled, mostly one-celled; basal conidia can be 2-celled, only with a transverse septum ..... *Cladosporium* (p. 107)

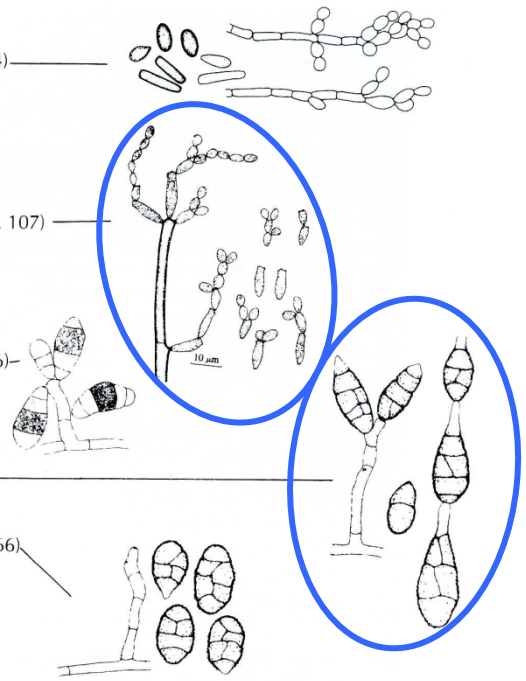
24b. Conidia septate with both transverse and longitudinal septa (muriform) or only with transverse septa 25

25a. Conidia smooth-walled, with transverse septa, slightly curved, end cells paler than central cell ..... *Curvularia* (p.116)

25b. Conidia rough-walled, with both transverse and longitudinal septa (muriform) 26

26a. Young conidia rounded at the base, mature conidia catenuate and/or rostrate ..... *Alternaria* (p.62)

26b. Young conidia attenuated at the base, mature conidia single or in "false" short chains ..... *Ulocladium* (p.266)



b) RESULTATS

Igual que l'apartat de *PROCEDIMENTS*, aquest es divideix en tres parts: *Mostreigs*, *Ressembra* i *Identificació*.

1. MOSTREIGS

Després de 7 dies de cultiu, les plaques RODAC Rosa de Bengala utilitzades en els mostreigs presenten ja colònies fúngiques madures. Vist això podem afirmar que:

A l'aire hi ha partícules biogèniques, d'entre les quals espores fúngiques que poden créixer i formar colònies capaces de reproduir-se.

Tot i així, com que encara no se sap identificar els fongs a ull nu, tan sols es poden diferenciar colònies filamentoses (aspecte pilós, vellutat, polsós, etc.) de colònies levuriformes (com les bacterianes: lluents, llises, llefiscoses, etc.).

Les plaques mostren les UFC recollides de 300L d'aire. **Per calcular les UFC/m³ hem de dividir les UFC de la placa entre 0,3m³ (1m³ són 1000L)**.

$$1\ m^3 \cdot \frac{1000L}{1\ m^3} \cdot \frac{\text{UFC de la placa}}{300L} = \text{UFC}/m^3$$

Per exemple, si una placa té 54 colònies, direm que l'aire d'on provenen té una concentració fúngica de 180 UFC/m³.

Reunint totes les dades que es van mesurar i també les concentracions fúngiques de cada aula, obtenim aquestes taules:

INTERIOR

Cal esmentar que l'experiment consistia en recollir mostres abans i després (marcat en taronja clar) d'obrir portes i finestres per ventilar cada interior. A l'aula 42 i als vestidors, però, es van prendre mostres abans i després d'estar-hi els alumnes (i després de 4 lliçons, a la 42, en taronja fosc).

data	ESPAI	planta	volum (m3)	temp. (ºC)	humitat (%)	nº persones	nº finestres	nº portes	UFC 1	UFC 2 (rèplica)	UFC/m³
8 de juny	42 ab.	1	146	25,4	61	0	3	1	12	12	40
	42 d.			28,7	54	20			23	18	68
	42 fin.			26,4		27			32	13	75
	vest. ab.	0	72	23,9	61	0	2	1	25	25	83
	vest. d.			26,5	70				300	300	1000
11 de juny	11 ab.	1	168	24,5	55	1	4	1	51	31	137
	11 d.								31	20	85
	23 ab.	2	177	25,5	57	1	4	1	17	15	53
	23 d.								26	50	127
	32 ab.	0	156	24	55	2	3	1	9	18	45
	32 d.								59	52	185
	SAC ab.	0	1043	25	54	20	5	3	3	8	18
	SAC d.					1			43	38	135

EXTERIOR

data	ESPAI	planta	volum (m3)	temp. (ºC)	humitat (%)	nº persones	nº finestres	nº portes	UFC 1	UFC 2 (rèplica)	UFC/m3
11 de juny	ext.	0	//	24,5	45	//	//	//	36	16	**87**

El dia 11 de juny no feia molt de vent, i cal remarcar que la humitat és més baixa que als interiors! Tot i així les condicions entre interior i exterior són bastant similars, per la qual cosa farem una petita comparació.
Per tal de comprovar la conclusió de la Dra. Buss (a l'exterior hi ha una càrrega fúngica gairebé sempre superior a la de l'interior), farem mitjana entre les UFC/m^3 d'interiors sense activitat (abans d'obrir portes i finestres) i ho compararem amb les UFC/m^3 de l'exterior.

NOTA: les UFC/m^3 de l'aula 11 s'exclouen de la mitjana ja que són un resultat d'un experiment diferent (vegeu *Localitzacions dels mostreigs*, dins de *IDENTIFICACIÓ*, a la pàgina 65).

Mitjana d'UFC/m^3 d'interior:

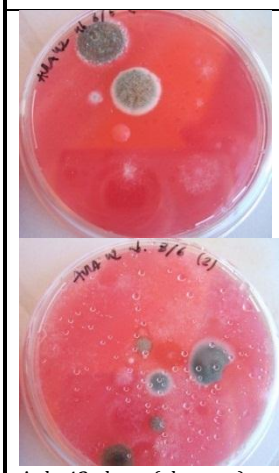
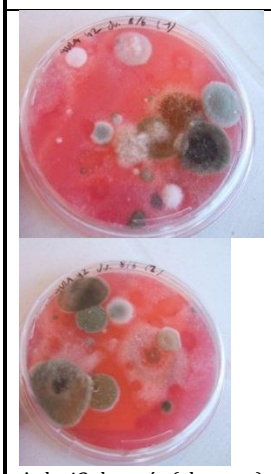
$$\frac{53 + 45 + 18}{3} \approx 39 \text{ UFC/m}^3$$

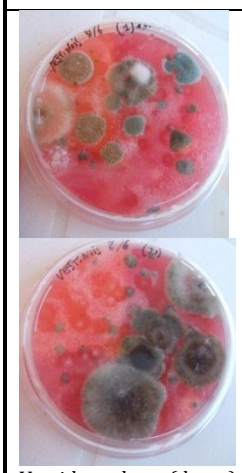
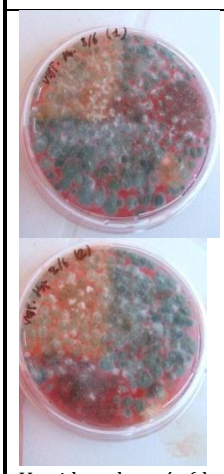
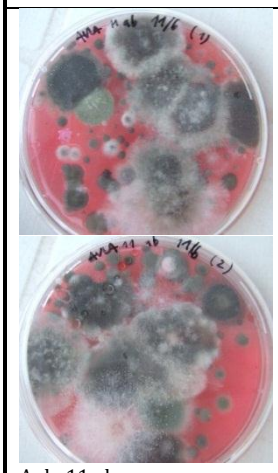
La biologia no sempre és matemàtica pura (de fet mai ho és), però es veu clarament com 87 > 39. Per tant, conclusió de la Dra. Buss comprovada!:

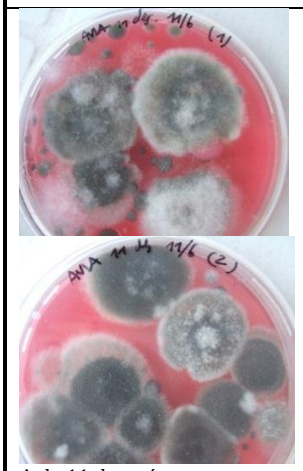
La càrrega fúngica de l'interior gairebé sempre és inferior a la de l'exterior (com a molt la pot igualar).

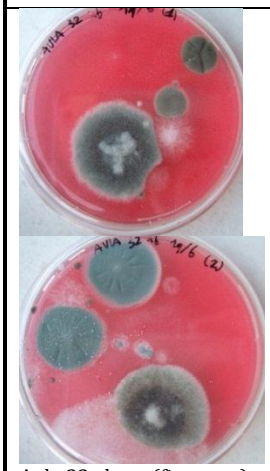
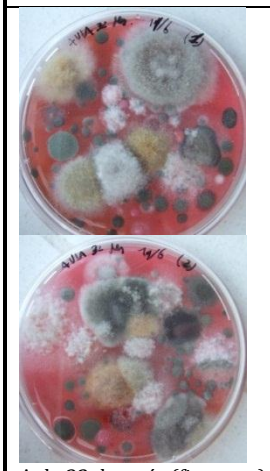
Tot i així, caldrien estudis centrats en comprovar si aquesta hipòtesi és certa o no, ja que evidentment amb un sol dia de mostreigs no es pot treure una conclusió com aquesta!

A continuació s'adjunta una taula on es poden veure totes les plaques amb mostres seguides del nº de colònies filamentoses i levuriformes que tenen. També s'ha observat a vista grossa la diversitat entre les colònies que s'hi presenten.

	UFC (1)		UFC (2)		DIVERSITAT
	l	f	l	f	
 Aula 42 abans (alumnes)	1	11	1	11	4
 Aula 42 després (alumnes)	-	23	-	18	10
Aula 42 final (alumnes)	-	32	-	23	7

	UFC (1)		UFC (2)		DIVERSITAT
	l	f	l	f	
 Vestidors abans (dutxa)	-	25	-	25	8
 Vestidors després (dutxa)	-	300	-	300	2
 Aula 11 abans	1	50	1	30	8

	UFC (1)		UFC (2)		DIVERSITAT
	l	f	l	f	
 Aula 11 després	1	30	-	20	6
Aula 23 abans (finestres)	1	16	1	15	7
Aula 23 després (finestres)	1	25	-	50	8

	UFC (1)		UFC (2)		DIVERSITAT
	l	f	l	f	
 Aula 32 abans (finestres)	-	9	-	18	5
 Aula 32 després (finestres)	5	54	2	50	7
Exterior institut	6	30	1	15	9

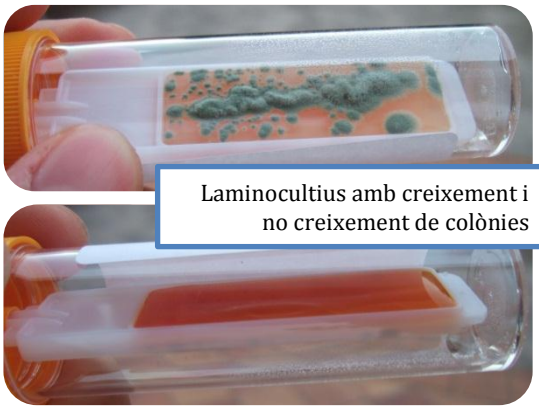
	UFC (1)		UFC (2)		DIVERSITAT
	l	f	l	f	
Sala d'actes abans (finestres)	-	3	1	7	5

	UFC (1)		UFC (2)		DIVERSITAT
	l	f	l	f	
Sala d'actes després (finestres)	3	40	3	35	9

2. RESSEMBRA

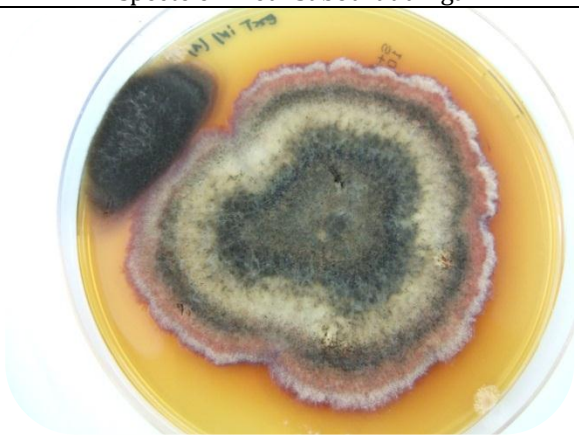
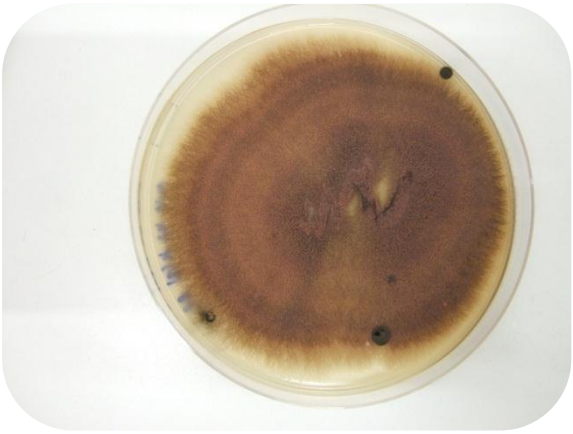
Al cap d'una setmana obtenim el següent:

Placa PETRI Agar Sabouraud amb diverses colònies verd grisós i polsoses.



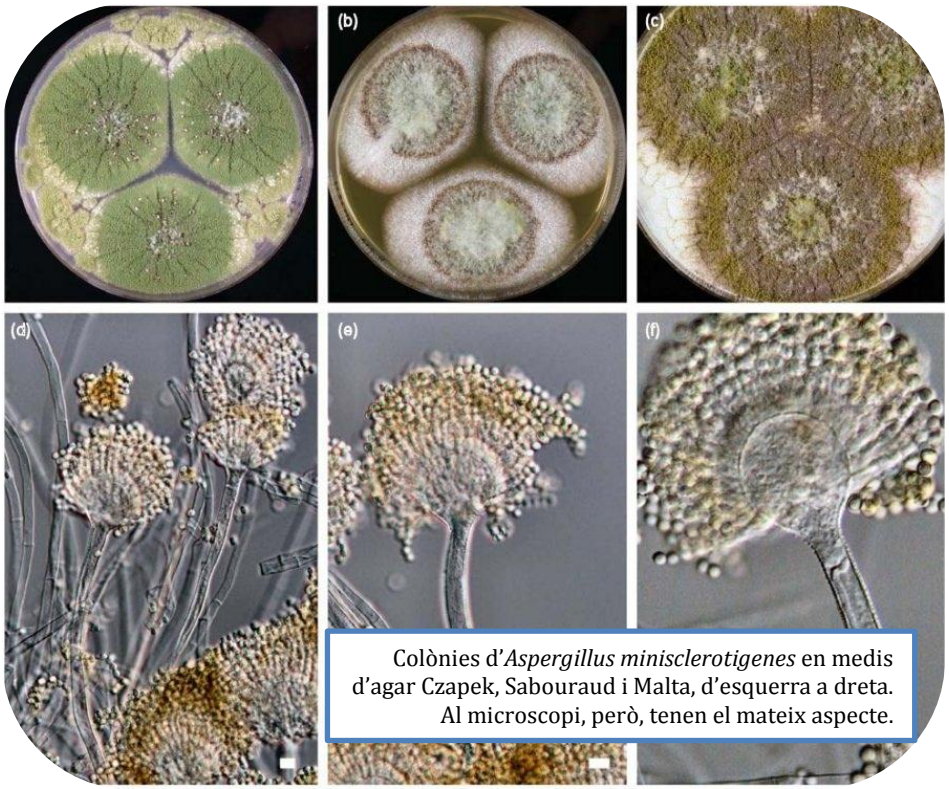
Laminocultius amb creixement i no creixement de colònies

Tot i que algunes colònies són morfològicament molt semblants a les colònies de les plaques RODAC, s'han obtingut resultats més irregulars com aquests:

	Aspecte en medi Rosa de Bengala	Aspecte en medi Sabouraud Agar
1	La colònia és de textura pilosa, cotonosa, i de contorn circular regular. Es distingeix corona radial groga del centre marró fosc.	 La colònia té la mateixa textura i els mateixos tons, però ha desenvolupat més corones radials d'altres colors: blanc, vermellós, marró fosc. El contorn és irregular.
2	La colònia és entre filamentosa i levuriforme, ja que forma petits grans llisos i lluents de color rosa. El centre és lleugerament més fosc.	 La textura de la colònia és la mateixa, però el color és diferent: marronós. I el centre no és fosc.

Queda clar, doncs, que:

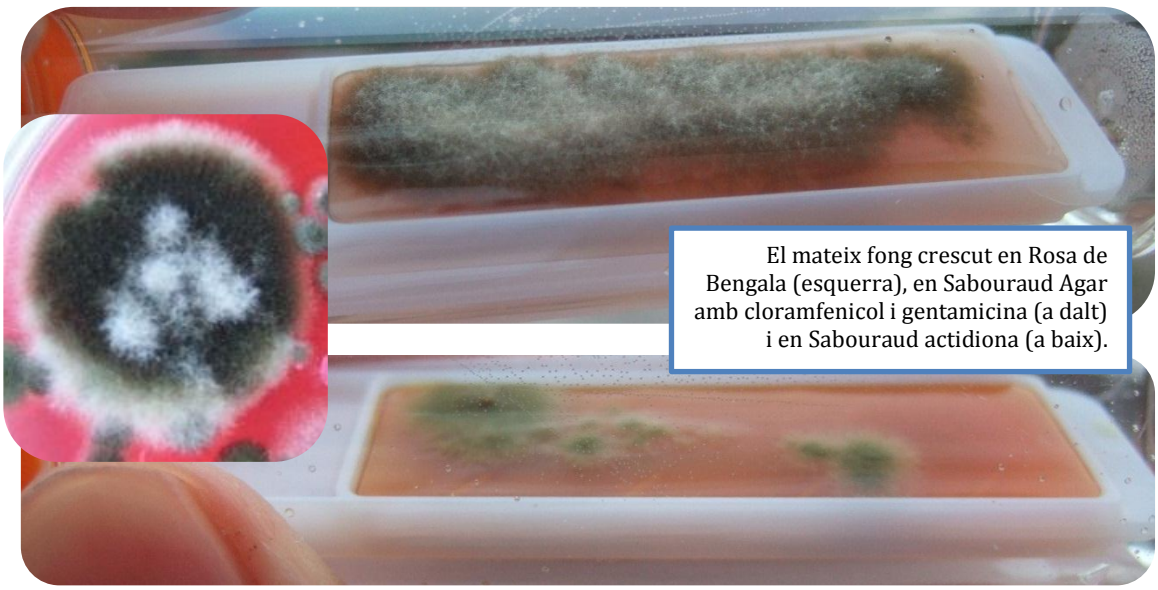
L'aspecte d'una colònia fúngica varia segons el medi on creix.



Colònies d'*Aspergillus minisclerotigenes* en medis d'agar Czapek, Sabouraud i Malta, d'esquerra a dreta. Al microscopi, però, tenen el mateix aspecte.

Recordem que un dels medis MYCOLINE incloïa actidiona. Per tant, els fongs que hi hagin crescut i que canviïn el color del medi seran per força dermatòfits.

L'única colònia que ha crescut en medi Sabouraud actidiona ha estat aquesta, però no ha canviat el color del medi:

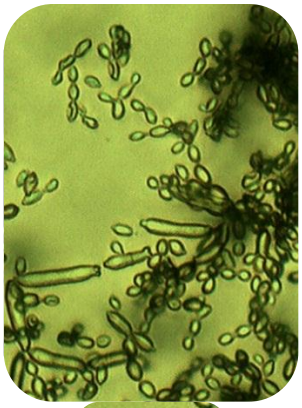
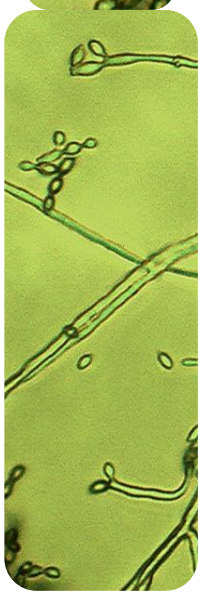


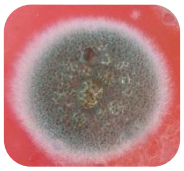
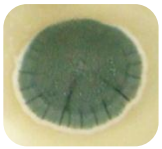
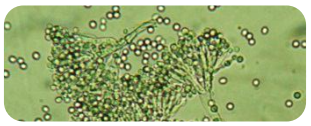
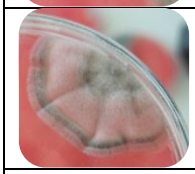
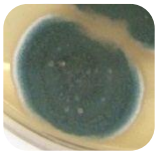
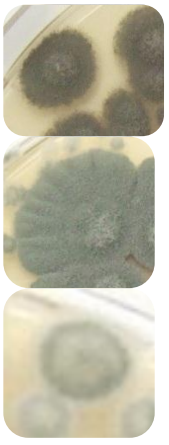
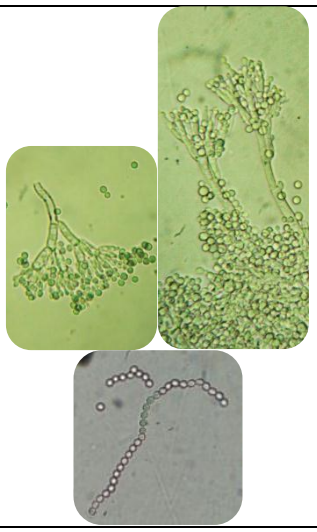
El mateix fong crescut en Rosa de Bengala (esquerra), en Sabouraud Agar amb cloramfenicol i gentamicina (a dalt) i en Sabouraud actidiona (a baix).

3. IDENTIFICACIÓ

La identificació ens ha permès observar al microscopi i classificar taxonòmicament moltes colònies recollides durant els mostreigs.

Seguidament s'adjunta una taula en la qual es pot veure l'aspecte d'una colònia fúngica en medi Rosa de Bengala, el seu aspecte en medi Sabouraud (no sempre s'ha fet cultiu pur), la seva observació al microscopi, algunes característiques microscòpiques del gènere i la identificació del gènere, ja que no sempre s'ha pogut identificar l'espècie (a falta de medis de cultiu selectius especials).
D'aquesta manera veurem quin aspecte tenen les colònies de cada gènere en els medis Rosa de Bengala, i podrem saber, per tant, quins fongs hi ha a cada espai de l'institut: si observant pel microscopi identifiquem el fong *Cladosporium*, totes les colònies que s'assemblin a la colònia que hem observat seran per força *Cladosporium*, també.

COLÒNIA Rosa de Bengala	OBS. MICRO.	Característiques	*Identificació (GÈNERE)*
Verd marronós fosc. Colònies petites, aspecte de vellut.	 	Conidiòfors llisos i llargs. Simpodials i geniculats. Conidis llisos o rugosos, fusiformes, ovalats o subesfèrics. Gairebé mai foscos. Poden arribar a estar septats i també poden formar nous conidis per gemmació. Es poden arribar a apreciar cicatrius als conidiòfors i als conidis al lloc on estaven units.	***Cladosporium***

COLÒNIES Rosa de Bengala	CULTIUS PURS Sabouraud	OBS. MICRO.	Característiques	Identificació (GÈNERE)
 Als 4 dies la colònia passa de blanca a verd blavós i grisós. Aspecte polsós. A mesura que creix perd el blau i es torna verd fosc grisós. Es pot distingir colònia radial blanquinosa, que normalment desapareix al cap de 10 dies de cultiu.	 Aspecte semblant al de Rosa de Bengala. (La colònia té espai: diàmetre major de 10mm i contorn regular).		Forma de conidiòfor característica (<u>pinzellet</u>): des de l'hifa reproductiva principal, hi ha ramificacions (poden tenir la paret berrugosa o no). A les puntes s'hi troben els fiàlids en forma de botella, que originen conidis. Conidis esfèrics o subesfèrics que es poden trobar encadenats. Cadenes de fins a 30 conidis.	***Penicillium***