

USO DE DRONES PARA LA RECUPERACIÓN DE ESPORAS DE HONGOS EN LA BAJA ATMÓSFERA

por

Zuleimary Vélez Rodríguez

Tesis sometida en cumplimiento parcial
para los requerimientos del grado de

MAESTRÍA en CIENCIAS
en
BIOLOGÍA

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO DE MAYAGUEZ
2018

Hernán Torres Pratts, PhD.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Matías J. Cafaro, PhD.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Sandra L. Maldonado Ramírez, PhD.
Presidenta, Comité Graduado

Fecha

Ana V. Vélez Díaz, MS
Directora Interina, Departamento de Biología

Fecha

Rogelio Palomera, PhD.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

ABSTRACT

Aerobiology is responsible for studying atmospheric biological particulate such as pollen and fungal spores. Dispersion of this particulate is widespread, so its capture can be difficult, and, for this reason, different methods have been developed to achieve their capture. In this research a modified unmanned aerial vehicle, commonly known as drone, with spore traps was used to confirm it as an effective method for collecting spores and pollen from the lower atmosphere. Two areas with different anthropogenic activity, urban and rural, were chosen. In both, twelve samplings of 5 minutes flights were made, where the samplers were opened, and Petri dishes were exposed to collect viable particulate. Also, adhesive slides were exposed to collect non-viable particulate. Viable samples were cultivated, isolated and identified to observe diversity and frequency of the captured fungal genera. From non-viable samples, fungal spores and pollen, were observed directly under the microscope and identified. From the viable samples, 55 colonies were identified within 11 genera: *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Nigrospora*, *Pestalotia*, *Rhizopus*, *Colletotrichum*, *Paecilomyces* and *Leptosphaerulina*. From the non-viable samples, 54 genera of fungal spores and 17 pollen genera were identified.

RESUMEN

La aerobiología se encarga de estudiar el particulado atmosférico como el polen y las esporas de hongos. La dispersión de este particulado es amplia por lo que su captura puede ser difícil y para esto se han desarrollado distintos métodos para lograr su captura. En esta investigación se utilizó un vehículo aéreo manejado por control remoto, comúnmente conocido como dron, modificado con atrapadores de esporas para confirmarlo como un método efectivo de colecta de esporas y polen en la baja atmósfera. Se escogieron dos áreas con actividad antropogénica distinta, área urbana y área rural. En ambas se realizaron doce muestreos que consistían en vuelos de 5 minutos de duración donde se abrían los muestreadores y se exponían platos Petri con medio de cultivo para coleccionar particulado viable. También se expusieron laminillas adhesivas para coleccionar particulado no viable. Las muestras viables se cultivaron, aislaron e identificaron para observar diversidad y frecuencia de los géneros fúngicos capturados. Las muestras no viables, esporas de hongos y polen, fueron observadas directamente bajo microscopio e identificadas. De las muestras viables se lograron identificar 55 colonias de 11 géneros distintos: *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Nigrospora*, *Pestalotia*, *Rhizopus*, *Colletotrichum*, *Paecilomyces* and *Leptosphaerulina*. De las muestras de particulado no viable se lograron identificar 54 géneros de esporas de hongos y 17 géneros de polen.

DEDICATORIA

A mis padres y hermano que lo han dado todo por mí para poder llegar hasta aquí, por ser mi apoyo, siempre estar al pendiente, estar ahí para mí y no dejarme caer en este camino. Va por ustedes. ¡Los Amo!

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, primeramente, a Dios por permitir que se me abrieran puertas y que pudiera completar este proyecto a pesar de los contratiempos ambientales y, particularmente de salud, pero a pesar de la lucha constante contra tratamientos y demás, pude lograrlo y cumplir esta meta trazada. Gracias a mis padres y hermano por su eterno apoyo y amor incondicional.

Gracias a mi comité graduado, especialmente a Sandra L. Maldonado, por permitirme ser parte de su laboratorio de investigación y brindarme la oportunidad de poder hacer este trabajo. A Hernán Torres por la preparación del equipo, estar presente en todos los muestreos, ser parte de mi comité y por su apoyo con este proyecto. A Matías Cafaro por ser parte de mi comité, consejos y apoyo. A los profesores que estuvieron disponibles para ayudarme y aconsejarme cuando les consultaba algo: Donato Seguí, Carlos Muñoz y Dr. Ramírez Domenech de la Universidad Interamericana en Ponce.

Gracias a mis compañeros del laboratorio B-218A, Paola, Gualberto, Jacob, Kiara, Héctor y Aryaliz, por ser mi familia lejos de casa, sus consejos, ayuda, el café y los ratitos de relajación. A los estudiantes subgraduados que me ayudaron en este proyecto: Andrea Guilloty, Paola Mercado, Ismael Hernández, Bryan Padua y Orianna Carrasquillo. A las técnicas de laboratorios, Magaly Zapata, Bárbara Sánchez y Carolyn Rivera, por facilitarme materiales, aconsejarme y permitir que cumpliera mi objetivo.

A las amistades y conocidos que me brindaron su apoyo y ayuda de una forma u otra durante este proceso. Aunque no los veía todos los días, pero siempre que había la oportunidad, me dejaban saber que me apoyaban y siempre mostrando su amistad sincera y cariño.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1 -INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2 -REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
CAPÍTULO 3 -METODOLOGÍA.....	8
3.1 ÁREAS DE MUESTREO.....	8
3.2 MUESTREADOR.....	8
3.3 RECUPERACIÓN DE ESPORAS DE HONGOS VIABLES.....	9
3.4 RECUPERACIÓN DE ESPORAS DE HONGOS NO VIABLES Y POLEN.....	10
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	11
3.6 COMPARACIÓN DE MUESTREADORES	12
CAPÍTULO 4 -RESULTADOS.....	13
4.1 RECUPERACIÓN DE ESPORAS DE HONGOS VIABLE	13
4.2 RECUPERACIÓN DE ESPORAS DE HONGOS NO VIABLES Y POLEN.....	25
4.3 VARIABLES METEOROLÓGICAS CONSIDERADAS EN LOS MUESTREOS.....	43
4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE MUESTREOS.....	49
4.5 COMPARACIÓN DE MUESTREADORES	51
CAPÍTULO 5 -DISCUSIÓN.....	54
CAPÍTULO 6 -CONCLUSIONES.....	61
CAPÍTULO 7 -RECOMENDACIONES.....	62
REFERENCIAS.....	63
APÉNDICES.....	69

LISTA DE TABLAS

Tabla 4-1.	Cantidad de colonias (CFU's) recuperadas por vuelo y por muestreos.....	17
Tabla 4-2.	Cantidad de cultivos aislados por muestreo y por área.....	17
Tabla 4-3.	Cantidad de cultivos recuperados e identificados por muestreo y por área (pos-María).....	18
Tabla 4-4.	Cantidad de cultivos recuperados por géneros identificados, su frecuencia y cantidad de especies identificadas.....	18
Tabla 4-5.	Cantidad de cultivos clasificados en las especies asociadas a los géneros <i>Curvularia</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Pestalotia</i> , <i>Nigrospora</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Rhizopus</i> y <i>Leptosphaerulina</i>	18
Tabla 4-6.	Contaje de esporas de hongo y granos de polen recuperados por muestreo y por área.....	25
Tabla 4-7.	Particulado no viable recuperado en laminillas adhesivas en el Muestreo del Área Rural 1.....	26
Tabla 4-8.	Particulado no viable recuperado en laminillas adhesivas en el Muestreo del Área Rural 2.....	27
Tabla 4-9.	Particulado no viable recuperado en laminillas adhesivas en el Muestreo del Área Urbana 1.....	28
Tabla 4-10.	Particulado no viable recuperado en laminillas adhesivas en el Muestreo del Área Urbana 2.....	29
Tabla 4-11.	Frecuencias de esporas de hongos no viables, identificadas a nivel de género, por área de muestreo y frecuencias totales.....	30
Tabla 4-12.	Frecuencias de polen, identificados a nivel de género, por área de muestreo y frecuencias totales.....	31
Tabla 4-13.	Promedio de datos de variables meteorológicas asociadas a cada muestreo	43
Tabla 4-14.	Análisis de la varianza de diferencia en captura por áreas de muestreo	50
Tabla 4-15.	Análisis de la varianza de diferencia en captura por periodos del día.....	51
Tabla 4-16.	Resumen de investigaciones donde se han utilizado vehículos controlados remotamente para la recuperación de particulado atmosférico..	52
Tabla 4-17.	Resumen de investigaciones que han utilizado muestreadores estacionarios para la recuperación de particulado atmosférico.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 3-1.	Dron <i>Blade Chroma</i> de cuatro hélices modificado. Las flechas blancas indican la localización de los atrapadores. Foto tomada por Hernán Torres-Pratts.....	9
Figura 4-1.	Estructuras características de <i>Curvularia</i> : conidióforo y conidias curvas y segmentadas (A), y <i>Aspergillus</i> : conidióforo, vesícula globosa, fiálides y conidias (B) en magnificación 40X.....	19
Figura 4-2.	Estructuras características de <i>Pestalotia</i> : conidióforo, conidias con apéndices (A) y <i>Nigrospora</i> : conidióforo hialino y conidias redondas de color oscuro (B) en magnificación 40X.....	20
Figura 4-3.	Estructuras características de <i>Fusarium</i> : conidias multicelulares en forma de canoa y conidióforo simple (A) y <i>Cladosporium</i> : conidias unicelulares de color verdoso con cicatriz (B) en magnificación 40X.....	21
Figura 4-4.	Estructuras características de <i>Rhizopus</i> : esporangióforo, esporangio con sus esporangiosporas y rizoides (A) y <i>Penicillium</i> : conidióforo, fiálides y conidias (B) en magnificación 40X.....	22
Figura 4-5.	Estructuras características de <i>Colletotrichum</i> : acérvulo con conidias y setas (A) y <i>Paecilomyces</i> : conidióforo y conidias (B) en magnificación 40X.....	23
Figura 4-6.	Estructuras características de <i>Leptosphaerulina</i> en medio V8: pseudotecios (A), ascosporas hialinas elipsoidales con septos (B) y ascosporas dentro de los pseudotecios (C) en magnificación 40X.....	24
Figura 4-7.	Esporas de hongos identificadas. <i>Tetraploa</i> (A), <i>Nigrospora</i> (B), <i>Curvularia</i> (C), <i>Spegazzinia</i> (D), <i>Sporidesmium</i> (E), <i>Melanomma</i> (F), <i>Alternaria</i> (G) y <i>Exosporium</i> (H).....	32
Figura 4-8.	Esporas de hongos identificadas. <i>Didymosphaeria</i> (A), <i>Esporas de Aspergillus o Penicillium</i> (B), <i>Delitschia*</i> (C), <i>Amphisphaeria</i> (D), <i>Torula</i> (E), <i>Corynespora</i> (F), <i>Cladosporium</i> (G) y <i>Amphisphaeria</i> (H). * No hay reportes en Puerto Rico hasta el 2006.....	32
Figura 4-9.	Esporas de hongos identificadas. <i>Aspergillus</i> (A), <i>Leptosphaeria</i> (B), <i>Massarina</i> (C), <i>Coprinus</i> (D), <i>Sporormiella</i> (E), <i>Curvularia</i> (F), <i>Fusarium</i> (G) y <i>Didymosphaeria</i> (H).....	33
Figura 4-10.	Esporas de hongos identificadas. <i>Didymosphaeria</i> (A), <i>Xylaria</i> (B), <i>Cercophora</i> (C), <i>Didymosphaeria</i> (D), <i>Spegazzinia</i> (E), <i>Pithomyces</i> (F), <i>Massarina</i> (G) y <i>Leptosphaeria</i> (H).....	33
Figura 4-11.	Esporas de hongos identificadas. <i>Leptosphaeria</i> (A), <i>Fusarium</i> (B), <i>Puccinia</i> (C), <i>Leptosphaeria</i> (D), <i>Amphisphaeria</i> (E), <i>Saccobolus</i> (F), <i>Chlorophyllum</i> (G) y <i>Coniochaeta</i> (H)	34
Figura 4-12.	Esporas de hongos identificadas. <i>Saccobolus</i> (A), <i>Cladosporium</i> (B), <i>Lophiostoma</i> (C), <i>Exosporium</i> (D), <i>Corynespora</i> (E), <i>Leptosphaeria</i> (F), <i>Oidium</i> (G) y <i>Tetraploa</i> (H).....	34
Figura 4-13.	Esporas de hongos identificadas. <i>Curvularia</i> (A), teliosporas de <i>Puccinia</i> (B), <i>Cortinarius</i> (C), posible mixomiceto (D), <i>Fusarium</i> (E), <i>Curvularia</i> (F), <i>Coprinus</i> (G) y <i>Curvularia</i> (H).....	35
Figura 4-14.	Esporas de hongos identificadas. <i>Sporormiella</i> (A), <i>Curvularia</i> (B), esporas de <i>Aspergillus o Penicillium</i> (C), <i>Agrocibe</i> (D), desconocida, parecida a <i>Puccinia</i> (E), <i>Curvularia</i> (F), <i>Diatrype</i> (G) y <i>Agaricus</i> (H).....	35

Figura 4-15.	Esporas de hongos identificadas. Xylariaceae (A), <i>Stereum</i> (B), <i>Cladosporium</i> (C), <i>Colletotrichum</i> (D), <i>Fusarium</i> (E), <i>Chlorophyllum</i> (F), desconocida, parecida a <i>Curvularia</i> (G) y <i>Agaricus</i> (H).....	36
Figura 4-16.	Esporas de hongos identificadas. Uredospora de una roya (A), <i>Solheimia</i> * (B), <i>Xylaria</i> (C), <i>Venturia</i> * (D), <i>Caloplaca</i> (E), <i>Arthrimum</i> (F), <i>Cladosporium</i> (G) y <i>Massarina</i> (H). * No hay reportes en Puerto Rico hasta el 2006.....	36
Figura 4-17.	Esporas de hongos identificadas. <i>Sporidesmium</i> (A), <i>Massarina</i> (B), <i>Delitschia</i> * (C), <i>Amphisphaeria</i> (D), <i>Bipolaris</i> (E), esporas de <i>Aspergillus</i> o <i>Penicillium</i> (F), <i>Exserohilum</i> (G) y <i>Bipolaris</i> (H) *No hay reportes en Puerto Rico hasta el 2006.	37
Figura 4-18.	Esporas de hongos identificadas. Xylariaceae (A), <i>Colletotrichum</i> (B), posible <i>Pleospora</i> (C), <i>Drechslera</i> (D), <i>Pseudocercospora</i> (E), <i>Meliola</i> (F) y <i>Fusariella</i> * (G). * No hay reportes en Puerto Rico hasta el 2006.....	37
Figura 4-19.	Esporas de hongos identificadas. <i>Leptosphaerulina</i> (A), <i>Alternaria</i> (B), <i>Amphisphaeria</i> (C), <i>Spegazzinia</i> (D), <i>Aspergillus</i> (E), <i>Polythrincium</i> * (F) y <i>Helicomyces</i> (G). * No hay reportes en Puerto Rico hasta el 2006.....	38
Figura 4-20.	Esporas de hongos identificadas. <i>Endophragmiella</i> * (A), <i>Amphisphaeria</i> (B), <i>Fusarium</i> (C), <i>Bipolaris</i> (D) y <i>Cercospora</i> (E). * No hay reportes en Puerto Rico hasta el 2006.....	38
Figura 4-21.	Esporas de hongos identificadas. <i>Alternaria</i> (A), posible <i>Aspergillus</i> (B), <i>Didymosphaeria</i> (C), <i>Tetraploa</i> (D), desconocida, similar a <i>Curvularia</i> (E), <i>Spondylocyadiella</i> * (F) y <i>Cladosporium</i> (G). * No hay reportes en Puerto Rico hasta el 2006.....	39
Figura 4-22.	Esporas de hongos identificadas. Posible <i>Massarina</i> (A), <i>Amphisphaeria</i> (B), posible <i>Peronospora</i> (C), teliosporas de <i>Puccinia</i> (D).....	39
Figura 4-23.	Conglomerado de esporas por impacto de vientos fuertes en muestreo Rural 1. Se distinguen, al menos, tres géneros distintos: <i>Didymosphaeria</i> (A), <i>Curvularia</i> (B), y <i>Cercophora</i> (C).....	40
Figura 4-24.	Granos de polen identificado. <i>Pinus</i> (A), <i>Cecropia</i> (B), <i>Morus</i> (C), <i>Morus</i> (D), <i>Cyathea</i> (E), <i>Cyathea</i> (F), <i>Morus</i> (G) y <i>Morus</i> (H).....	40
Figura 4-25.	Granos de polen identificado. <i>Tilia</i> (A), <i>Morus</i> (B), <i>Morus</i> (C), <i>Ambrosia</i> (D), <i>Myrica</i> (E), <i>Morus</i> (F), <i>Pinus</i> (G) y <i>Pinus</i> (H).....	41
Figura 4-26.	Granos de polen identificado. <i>Persea</i> (A), <i>Maclura</i> (B), <i>Ophioglossum</i> (C), <i>Fraxinus</i> (D), <i>Schinus</i> (E), <i>Morus</i> (F), <i>Morus</i> (G) y <i>Morus</i> (H).....	41
Figura 4-27.	Granos de polen identificado. <i>Morus</i> (A), <i>Morus</i> (B), <i>Morus</i> (C), <i>Pinus</i> (D), <i>Morus</i> (E), <i>Morus</i> (F), <i>Podocarpus</i> (G) y <i>Pinus</i> (H).....	42
Figura 4-28.	Granos de polen identificado. <i>Pinus</i> (A), <i>Chenopodium</i> (B), <i>Morus</i> (C), <i>Aralia</i> (D), <i>Pinus</i> (E), <i>Bauhinia</i> (F), <i>Bauhinia</i> (G) y <i>Persicaria</i> (H).....	42
Figura 4-29.	Granos de polen identificado. <i>Bauhinia</i> (A), <i>Pinus</i> (B), <i>Pinus</i> (C).....	43
Figura 4-30.	Comparación entre temperatura y colonias recuperadas durante el primer muestreo del área rural.....	44
Figura 4-31.	Comparación entre humedad relativa y colonias recuperadas durante el primer muestreo del área rural.....	44
Figura 4-32.	Comparación entre presión de aire y colonias recuperadas durante el primer muestreo del área rural.....	45
Figura 4-33.	Comparación entre temperatura y colonias recuperadas durante el segundo muestreo del área rural.....	45

Figura 4-34.	Comparación entre humedad relativa y colonias recuperadas durante el segundo muestreo del área rural.....	46
Figura 4-35.	Comparación entre presión de aire y colonias recuperadas durante el segundo muestreo del área rural.....	46
Figura 4-36.	Comparación entre temperatura y colonias recuperadas durante el primer muestreo del área urbana.....	47
Figura 4-37.	Comparación entre humedad relativa y colonias recuperadas durante el primer muestreo del área urbana.....	47
Figura 4-38.	Comparación entre presión de aire y colonias recuperadas durante el primer muestreo del área urbana.....	48
Figura 4-39.	Comparación entre temperatura y colonias recuperadas durante el segundo muestreo del área urbana.....	48
Figura 4-40.	Comparación entre humedad relativa y colonias recuperadas durante el segundo muestreo del área urbana.....	49
Figura 4-41.	Comparación entre presión de aire y colonias recuperadas durante el segundo muestreo del área urbana.....	49
Figura 4-42.	Análisis de varianza de la diferencia en captura por áreas muestreo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).....	50
Figura 4-43.	Análisis de varianza de la diferencia en captura por periodos del día. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

CMA	<i>Corn Meal Agar</i>
CY20S	<i>Czapek Yeast Agar con 20% de sacarosa</i>
CYA	<i>Czapek Yeast Agar</i>
CZ	<i>Czapek Dox Agar</i>
FAA	<i>Federal Aviation Administration</i>
G25N	<i>25% Glycerol Nitrate Agar</i>
GPS	<i>Global Position System</i>
MEA	<i>Malt Extract Agar</i>
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
RBA	<i>Rose Bengal Agar</i>
UAV	<i>Unmanned Aerial Vehicles</i>
WA	<i>Water Agar</i>

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1.	Medios de cultivo utilizados.....	69
Apéndice 2.	Caracterización de especies utilizando medios específicos para <i>Aspergillus</i>	72
Apéndice 3.	Caracterización de especies utilizando medios específicos para <i>Penicillium</i>	74

CAPÍTULO 1 -INTRODUCCIÓN

La aerobiología abarca el estudio, caracterización, identificación y cuantificación de particulado atmosférico, tal como bacterias, esporas de hongos, insectos muy pequeños y polen, los cuales son pasivamente transportados por el aire y capturados mediante métodos de muestreo viables y no viables (Burge, 2002 & Almaguer-Chávez *et al*, 2018). La dispersión de las esporas de hongos, siendo parte de los componentes atmosféricos, tiene un gran impacto en la agricultura, la medicina y la contaminación ambiental. Al igual que el polen, las esporas de hongos también se consideran alérgenos por lo que son comúnmente estudiadas, ya que estas, contrario al polen, son capaces de proliferar en los ambientes interiores (Burge, 2002). La amplia dispersión de las esporas en el aire ocasiona que resulte difícil su captura e identificación (Zimmermann *et al.*, 2015). Por el grado de dificultad en la captura de estas esporas, se han desarrollado varios métodos de captura. Además de los métodos de captura, también se estudian distintas variables atmosféricas que pueden afectar la dispersión y efecto de este particulado (Weber, 2003). Estas variables atmosféricas también resultan importantes a la hora de realizar muestreos ambientales pues los mismos no sólo son capaces de dispersar el particulado, sino que, también, influyen en el tipo de muestreador que se debe utilizar y en el particulado que se puede atrapar (Kellogg & Griffin, 2006).

Entre los métodos tradicionalmente utilizados para la captura de esporas de hongos en la baja atmósfera se encuentran el *Andersen Sampler*, el *Hirst Spore Trap* y el *Burkard Volumetric Spore Trap*, métodos estacionarios directos para capturar esporas (Lacey & West, 2006), y algunos permiten el cultivo posterior de los hongos capturados utilizando técnicas tradicionales de cultivo. El diseño del *Andersen Sampler*, simula el diámetro de diferentes áreas del tracto respiratorio para determinar el tipo de partículas que pueden depositarse en el sistema respiratorio humano. Para esto tiene varias etapas que se separan y atrapan partículas de diferentes tamaños utilizando placas

de metal con perforaciones de distinto diámetro por etapa. El diámetro se reduce desde la primera etapa hasta la última etapa del muestreador (Andersen, 1958 & Lacey & West, 2006). La necesidad de una fuente de energía y lograr la altura necesaria para poder tomar muestras representativas del tracto respiratorio, son considerados desventajas de este muestreador.

El *Hirst Spore Trap* colecta esporas por períodos consecutivos de hasta 24 horas, utilizando un impactador, una veleta de viento y un motor. Utiliza laminillas adhesivas para la recuperación del particulado, mediante un mecanismo de reloj que mueve la laminilla y, mediante succión, el particulado se deposita en las diferentes secciones de la laminilla que van siendo expuestas (Hirst, 1952 & Lacey & West, 2006). Su mayor desventaja es no poder cultivar el particulado que se colecta. El *Burkard Volumetric Spore Trap* funciona similar al *Hirst*, pero recuperando esporas por siete días. En este aparato las esporas se colectan en una cinta adhesiva, cubierta con una cera especial, lo que permite que el particulado se adhiera. La superficie de colección está protegida en una cámara a la cual llega el aire succionando con una bomba. El flujo de aire impacta un tambor que rota y opera como un reloj para girar cada hora durante siete días (Lacey & West, 2006). Al igual que el *Hirst*, este muestreador tampoco permite cultivar las muestras obtenidas. Estos tres métodos permiten hacer un análisis volumétrico cuantitativo de la cantidad de particulado que se recupera en un periodo particular de tiempo.

Otros métodos de muestreos activos han utilizado aviones manejados por control remoto, diseñados con atrapadores de esporas para capturar esporas en la baja atmósfera. Maldonado-Ramírez (2001) utilizando aviones determinó la concentración de esporas viables de *Gibberella zeae* en la baja atmósfera en periodos donde el trigo florecía. También los utilizó para observar cómo cambiaba la concentración de esporas durante el día y bajo diferentes condiciones meteorológicas. Lin *et al.* (2014) utilizaron un avión similar para comparar la concentración de

esporas de *Fusarium* a 100m de altura con la concentración de esporas colectadas con un *Burkard Volumetric Spore Trap* a 1m sobre el nivel del mar. Techy *et al.* (2008, 2010) utilizaron aviones similares para detectar, monitorear y pronosticar la propagación de patógenos sobre campos agrícolas. En estas investigaciones, los aviones fueron efectivos en la colecta de esporas de hongos en la baja atmósfera teniendo como ventaja poder ser controlados mediante control remoto en diferentes momentos del día. Sin embargo, tres desventajas principales de los aviones utilizados son: su tamaño, la necesidad de utilizar combustible y su dependencia de una persona entrenada para que realice los vuelos.

En esta investigación se hizo uso de drones modificados con atrapadores de esporas como un método activo para colectar esporas y polen en la baja atmósfera. Los drones se han utilizado efectivamente para muestreos de calidad de aire y para medir niveles químicos en la atmósfera en casos de emergencias ambientales (Wang *et al.*, 2013). Sin embargo, su uso en la recuperación de polen y esporas de hongos es una propuesta nueva.

En comparación con el uso de los aviones piloteados mediante control remoto, el uso de los drones, también manejados remotamente, presenta varias ventajas entre las resalta que los drones no requieren combustible. Los drones utilizan baterías recargables lo que los hace más costo-efectivos y presentan menos riesgos. Aunque ambos métodos requieren el uso de control remoto para ser operados, para operar un dron, no se requiere contratar una persona con entrenamiento. Además, los drones no requieren un área amplia para despegar y aterrizar (Watts *et al.*, 2012), mientras que los aviones requieren un área extensa para despegar y aterrizar de forma segura.

Al concluir esta investigación se confirmó el uso de drones como una alternativa novel, útil, costo-efectiva, segura y confiable para capturar polen y esporas de hongos viables y no viables

en la baja atmósfera. Su utilidad confirmada en este trabajo podría facilitar la implementación de programas de monitoreo de hongos fitopatógenos en zonas rurales y agrícolas. La medicina y la aerobiología podrían beneficiarse de un método que permite la recuperación de esporas de hongos causantes de alergias y/o problemas respiratorios en ambientes de interior donde la altura sea una limitación.

La investigación realizada tuvo como objetivo principal confirmar el uso de drones no comerciales modificados con atrapadores de esporas como herramienta útil, costo-efectiva y confiable para la captura de polen y esporas de hongos viables y no viables en la baja atmósfera. Por medio de esta investigación también se comparó la diversidad de esporas de hongos viables y no viables en dos áreas con actividad antropogénica distinta.

CAPÍTULO 2 -REVISIÓN DE LITERATURA

La aerobiología integra diferentes campos de estudio dirigidos a diagnosticar y resolver problemas ambientales en disciplinas como la medicina, fitopatología, entomología, meteorología, agricultura y criminología, entre otros (Alzate *et al.*, 2015). Las esporas de hongos son el foco de atención en muchos estudios aerobiológicos, ya que impactan grandemente la ciencia y diversos ecosistemas. Las esporas fúngicas pueden causar ciertas enfermedades en humanos por la exposición continua (Lacey & Crook, 1988) y, como mencionan Gravesen (1979) y Consentino & Palmas (1991), las mismas se han asociado a envenenamientos, infecciones y alergias. En la fitopatología, la colecta de esporas ha ayudado a describir la estructura genética de los causantes principales de la roya del trigo, la cebada y el maíz (Schmale *et al.*, 2006). En la criminología ha ayudado a resolver casos forenses, determinándose el intervalo de tiempo de una escena del crimen y detectar la presencia de algún hongo tóxico que haya podido causar la muerte (Hawksworth & Wiltshire, 2015). La identificación de esporas y polen también puede ser útil en interpretaciones paleo-ecológicas, revelando la historia de ciertos lugares y cuál ha sido el impacto humano en distintas regiones (Zamora *et al.*, 2008).

Al realizar un trabajo investigativo, es de importancia el método de muestreo para la captura de esporas de hongos. En los comienzos de las investigaciones aerobiológicas, especialmente las relacionadas a la agricultura (Rocha *et al.*, 2013), los métodos de muestreo más utilizados fueron: el *Burkard Volumetric Spore Trap* y el *Hirst Spore Trap*, el cual, según West & Kimber (2015), se lleva utilizando por más de 60 años.

El *Hirst Spore Trap* ha sido utilizado para comparar la relación entre composición de la comunidad de esporas y diversos factores meteorológicos (Grinn-Gofrón & Bosiacka, 2015), para la identificación de esporas (Alzate *et al.*, 2015), recuperación de esporas de alérgenos (Rocha *et*

al., 2013), patógenos de plantas (West & Kimber, 2015) y polen (Jato *et al.*, 2000). El *Burkard Volumetric Spore Trap* se ha utilizado para estudiar el transporte y deposición de esporas de hongos (Aylor & Sutton, 1992), investigar el efecto de la temperatura en la liberación de esporas (West *et al.*, 2002), coleccionar esporas de hongos alérgenos (Oliveira *et al.*, 2010), coleccionar esporas de *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) (Maldonado-Ramírez, 2001 & Lin *et al.*, 2014) y, también para monitorear patógenos de plantas (González *et al.*, 2011).

Aunque desde 1985 se ha estado experimentando la utilización de los vehículos aéreos no tripulados (*Unmanned Aerial Vehicles*, UAV por sus siglas en inglés) (Gottwald & Tedders 1985), en años recientes, los mismos han generado un nuevo interés (Techy *et al.*, 2010). El UAV más utilizado hasta el momento es el avión y constantemente se ha modificado para mejorar su eficiencia (Wang *et al.*, 2007). Estos aviones se han utilizado para la colecta de esporas de *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) (Maldonado-Ramírez, 2001 & Lin *et al.*, 2014), detectar y monitorear hongos fitopatógenos (González *et al.*, 2011), describir genéticamente las poblaciones de estos patógenos (Schmale *et al.*, 2006) y tratar cultivos infectados (Techy *et al.*, 2008). En ocasiones, los UAV se han combinado con el *Burkard Volumetric Spore Trap* para comparar los datos obtenidos. Investigaciones que han combinado ambos métodos, incluyen las de Gottwald & Tedders (1985), Maldonado-Ramírez (2001), González *et al.* (2011) y Lin *et al.* (2014).

Recientemente se han incluido dentro de los UAV, los drones. Estos se consideran más flexibles e independientes a las condiciones del tiempo y, junto al costo reducido de las plataformas e instrumentación, se considera que son más adecuados para operar (Villa *et al.*, 2016). Drones equipados con cámaras digitales y GPS (*Global Position System*) se han utilizado para detectar fuegos forestales, trazar mapas y realizar inspecciones, entre otros (Grenzdörffer *et al.*, 2008).

También se han utilizado para monitorear la calidad de aire y concentración de agentes químicos en caso de accidentes con químicos peligrosos (Wang *et al.*, 2013). Debido al éxito de los drones en estas aplicaciones, para la investigación que aquí se presenta, se modificaron drones comúnmente utilizados para entretenimiento para la recuperación de esporas de hongos en la baja atmósfera.

CAPÍTULO 3 -METODOLOGÍA

3.1 Áreas de Muestreo

La recuperación de esporas de hongos se llevó a cabo en dos áreas con actividad antropogénica distinta: área urbana y área rural. La colecta de muestras correspondientes al área urbana se llevó a cabo en los predios del estacionamiento del Edificio de Biología del Recinto Universitario de Mayagüez (N18.2127534, W67.1386214). Los muestreos en el área rural se llevaron a cabo en una zona rural localizada en el Barrio Miradero en Cabo Rojo (N18.087870, W67.172350).

3.2 Muestreador

Las muestras fueron colectadas utilizando un dron *Blade Chroma*TM de cuatro hélices cuya estructura básica fue modificada colocándole dos atrapadores de esporas (Figura 3-1). Cada atrapador de esporas consistió en dos placas de acrílico, una a cada lado, que abrían y cerraban en forma de libro utilizando un control remoto. En cada atrapador se colocó un plato Petri pequeño (60mm X 15mm) para la colecta de esporas viables y una laminilla adhesiva plástica, impregnada con una solución de Vaselina© y hexano (1:10) para el muestreo de particulado no viable. Estos atrapadores fueron diseñados y contruidos específicamente para este dron por el Dr. Hernán Torres-Pratts.

El dron también se equipó con un *Datalogger* calibrado modelo RHT50 de la compañía Extech® para documentar datos de temperatura, presión de aire y humedad relativa durante cada vuelo. Este instrumento se colocó en la parte inferior del dron y luego de cada vuelo, los datos fueron descargados a un archivo en formato de Excel utilizando un programa de computadoras de la misma compañía para su análisis posterior. Los límites establecidos de parámetros para tomar

los datos fueron los siguientes: temperatura: 0-50 °C; presión de aire: 980-1020 hPa; humedad relativa: 10-100 % RH y altura: 120m.

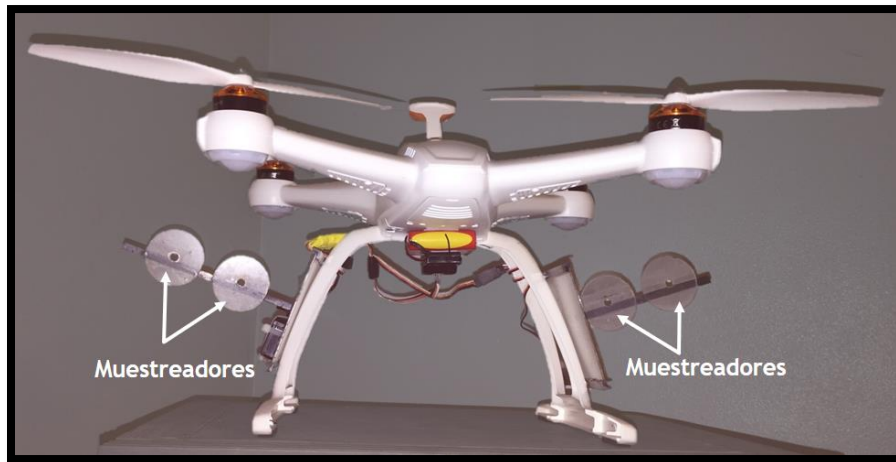


Figura 3-1. Dron *Blade Chroma* de cuatro hélices modificado. Las flechas blancas indican la localización de los atrapadores. Foto tomada por Hernán Torres-Pratts.

3.3 Recuperación de Esporas de Hongos Viables

Las esporas de hongos viables fueron recuperadas utilizando dos platos Petri pequeños ubicados en cada muestreador en los laterales del dron. Se utilizó el medio de cultivo *Rose Bengal Agar* (RBA) suplementado con cloranfenicol como antibiótico, ya que este medio se utiliza comúnmente en estudios para hongos por su capacidad de control de crecimiento de colonias y actividad bacteriostática (Ottow, 1972 & Hardy Diagnostics, 1996). Se realizaron dos muestreos en cada área por día en periodos de dos horas. Las fechas de los muestreos de área rural fueron: 4 de marzo de 2017 y 17 de abril de 2017. Las fechas de los muestreos del área urbana fueron: 12 de marzo de 2017 y 2 de abril de 2017. El primer periodo fue entre 9:30am - 11:30am y el segundo entre 3:30pm - 5:30pm. En cada periodo de dos horas se realizaron tres vuelos de 5 minutos cada uno para tomar las muestras. La altura del dron se mantuvo entre los 120m para lograr la captura de las muestras a la misma altura. Además, esta es la altura máxima permitida por la *Federal Aviation Administration* (FAA, por sus siglas en inglés) para volar el dron en las áreas de muestreo.

No se tomaron muestras durante la noche pues los vuelos nocturnos con drones están prohibidos por la FAA.

Una vez alcanzada la altura de 120m, se abrían ambos muestreadores, exponiendo los dos platos Petri y las dos laminillas adhesivas, mientras el dron se movía en círculos a favor de las manecillas del reloj por 5 minutos. Una vez finalizaban los 5 minutos de muestreo, se procedió a cerrar el muestreador utilizando el control remoto y el dron se aterrizó sobre una plataforma de plástico para remover los platos con las muestras. Los platos se sellaban con parafina y eran transportados al laboratorio para ser incubados. Para cada muestreo se prepararon controles de medio y se colocaron controles de campo, que se mantenían en el área de trabajo cerrados durante los muestreos.

En el laboratorio, las muestras fueron incubadas a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta que se detectó crecimiento de colonias, observando cada 24 horas. Una vez se observaban colonias, estas fueron transferidas individualmente a platos Petri pequeños (60mm X 15mm) con *Rose Bengal Agar* (RBA) y *Potato Dextrose Agar* (PDA), ambos suplementados con cloranfenicol e incubados a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. La receta para la preparación de los medios utilizados se incluye en el Apéndice 1. Los cultivos puros fueron clasificados por morfotipos basado en color utilizando la carta de colores de Münsel¹ (2000), textura y/o elevación. Se identificaron por el método tradicional: preparando laminillas semi-permanentes con lactofenol o lactofenol con azul de algodón y utilizando las claves taxonómicas correspondientes. Las laminillas fueron observadas bajo el microscopio *Olympus CX41* y para la toma de medidas utilizando el microscopio *Nikon Eclipse E200* con pantalla *DS-L3*. Se utilizaron las claves de Barnett & Hunter (1989) para identificación a nivel de género y las de Pitt (1985), Hoog *et al.* (2000), Klich (2002) y Watanabe (2002) para identificaciones a nivel de especie. Finalmente, se calculó la frecuencia de los géneros de los hongos identificados.

3.4 Recuperación de Esporas de Hongos No Viables y Polen

Las esporas de hongos no viables y el polen fueron recuperados por medio de laminillas adhesivas colectadas simultáneamente a las muestras para esporas viables. Utilizando el método tradicional, un área de 22mm X 40mm de la laminilla fue impregnada con la solución (1:10) de Vaselina© y hexano haciendo uso de un hisopo estéril. Se aplicó la solución tres veces en el área para asegurar una cobertura homogénea.

Una vez colectadas las muestras, estas se almacenaron en una caja para laminillas y en el laboratorio se añadió una gota de tinte lactofenol con azul de algodón, se cubrieron con un cubreobjetos 22mm X 50mm y fueron observadas directamente bajo el microscopio *Olympus CX41* con el objetivo de 60x. Las laminillas fueron evaluadas de extremo a extremo a lo largo y ancho en forma de *zig zag*, asegurando así la observación de toda el área adhesiva (Baxter, 2009). Las fotos fueron tomadas con la cámara de un teléfono inteligente *Samsung Galaxy S7*, modelo SM-G930A. Utilizando guías de esporas y polen y artículos como Kapp (1969), Grant Smith (2000), Willard *et al.* (2004), Lacey & West (2006), Cugny *et al.* (2010), Nitui *et al.* (2010), Barreda *et al.* (2011), Gelorini *et al.* (2011), van Geel *et al.* (2011), Rivera-Jiménez & Maldonado (2012), Demske *et al.* (2013), Alzate *et al.* (2015) y Shumilovskikh *et al.* (2015) se identificaron las esporas y el polen. Los atlas o bases de datos de granos de polen en los sitios web *Pollenwardienst* (Bucher & Kofler, 2004) y Red Española de Aerobiología (Galán & Alcázar, 2002) también se utilizaron como guías de identificación. También se contó todo tipo de particulado biológico, como insectos y material vegetal, observado en las laminillas.

3.5 Análisis Estadístico

Se realizaron análisis estadísticos para los resultados obtenidos, tanto para muestreos viables como para los no viables. En cuanto a los datos obtenidos de la captura de esporas viables

se hizo un análisis de varianza (ANOVA) para conocer si había diferencia significativa o no en la cantidad de colonias recuperadas por áreas de muestreo y por periodos del día. También se calculó la frecuencia de los géneros identificados y se hizo una correlación entre las variables atmosféricas y la cantidad de colonias recuperadas por muestreo.

En el caso de los no viables, se calculó la frecuencia del particulado capturado, tanto esporas de hongos como granos de polen. Se calculó, también, la frecuencia de los géneros capturados en ambos muestreos, viable y no viable, para comparar los datos recopilados.

3.6 Comparación de Muestreadores

Al finalizar el análisis de los datos, se procedió a comparar los resultados obtenidos utilizando el dron como muestreador con los resultados de otros estudios que utilizan los aviones, *Hirst Spore Trap* o *Burkard Volumetric Spore Trap* como métodos de muestreo. El propósito de hacer esta comparación fue confirmar el uso del dron como un método de muestro útil, novel, efectivo y seguro.

CAPÍTULO 4 -RESULTADOS

4.1 Recuperación de Esporas de Hongos Viables

Los resultados documentados para los muestreos viables representan los datos obtenidos antes y después del paso del huracán María por la isla. Se utilizaron los datos originales para los análisis estadísticos de los muestreos mientras que, los resultados documentados correspondientes a las identificaciones y clasificaciones se hicieron a base de los cultivos recuperados luego del paso del huracán. Los cultivos se estuvieron trabajando desde sus respectivos muestreos, pero no todos habían sido identificados y estaban cultivándose en medios específicos para lograr su identificación cuando pasó el evento. Se perdió un 49% de las muestras por la falta de energía eléctrica luego del paso del huracán y se continuó trabajando con el 51% de las muestras rescatadas.

Las Tablas 4-1 y 4-2 presentan, respectivamente, la cantidad de colonias recuperadas por vuelo en cada muestreo por área y la cantidad de cultivos aislados por muestreo y por área. La Tabla 4-1 documenta también, que el muestreo dos del área rural, no pudo ser completado debido a fuertes lluvias, por lo que no hay datos disponibles para el mismo.

Luego de los cuatro muestreos realizados, dos en área rural y dos en área urbana, se recuperaron, pos-huracán María, 103 cultivos, representando 97 morfotipos diferentes (Tabla 4-3). De estos morfotipos, 55 cultivos fueron asociados a 11 géneros, representando 14 especies. Los géneros identificados son *Curvularia* (11), *Aspergillus* (4), *Pestalotia* (3), *Colletotrichum* (3), *Paecilomyces* (1), *Penicillium* (4), *Nigrospora* (4), *Cladosporium* (13), *Rhizopus* (3), *Leptosphaerulina* (1) y *Fusarium* (8) siendo los primeros diez identificados a especie. En la Tabla 4-4 se documenta la cantidad de cultivos asignados a cada género con sus respectivas frecuencias y cuántos fueron identificados a especie. La Tabla 4-5 documenta las especies asociadas a cada

género. Los nombres utilizados fueron verificados en el sitio web *indexfungorum.org* (CABI_Biosciences, 2018) para determinar su validez taxonómica. Se verificó también si los géneros han sido reportados en la baja atmósfera de Puerto Rico a través de los sitios web *Cybertruffle* (Cantrell *et al.*, 2006) y *Widely Prevalent Fungi of the United States* (Uchida, 2007). La Tabla 4-3 documenta la cantidad de cultivos recuperados e identificados por muestreo y por área (pos-huracán María). Las Figuras 4-1 a 4-6 presentan las estructuras microscópicas características de los géneros identificados.

Las colonias de hongos viables, luego de ser cultivadas en medios como RBA, PDA, MEA, CMA, WA, V8 y en cámaras húmedas, fueron identificados por medio de preparación de laminillas semi-permanentes. Primero, se clasificaron a nivel de género (Tabla 4-4) utilizando la clave de Barnett & Hunter (1989). En el caso especial del género *Leptosphaerulina*, se utilizaron artículos adicionales, como Abler (2003) y Chanagá *et al.* (2012), para lograr su identificación. Luego, los géneros *Curvularia*, *Aspergillus*, *Pestalotia*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Paecilomyces* y *Colletotrichum*, *Rhizopus*, *Leptosphaerulina* y *Cladosporium*, siendo el de mayor frecuencia (0.25), fueron identificados a nivel de especie utilizando medios específicos (Tabla 4-5). Los cultivos restantes fueron clasificados dentro del género *Fusarium*.

Para *Curvularia*, se clasificaron 11 cultivos en tres especies: *Curvularia brachyspora*, *Curvularia clavata* y *Curvularia lunata* (Tabla 4-5) utilizando la clave de Watanabe (2002). La especie más frecuente fue *C. brachyspora* de la cual se identificaron cinco cultivos. La Figura 4-1A presenta las estructuras características del género en medio PDA como la hifa pigmentada tabicada, el conidióforo simple alargado y las conidias con cuatro a cinco células en forma de arco.

En el caso del género *Aspergillus*, se clasificaron cuatro cultivos. La Figura 4-1B presenta las estructuras características del género en medios CYA25 y CYA37: hifa hialina, conidióforo

alargado cenocítico, presencia de vesícula, fiálides y conidias redondas o elipsoidales. Se utilizó la clave de Klich (2002) y tomando en consideración la tabla de caracterización, incluida en el Apéndice 2, se logró identificar tres cultivos correspondientes a *Aspergillus fumigatus* y un cultivo como *Aspergillus japonicus* (Tabla 4-5).

En cuanto al género *Pestalotia*, (sinónimo *Pestalotiopsis*), se clasificaron tres cultivos, representando la especie *Pestalotia pezizoides* (Tabla 4-5). La Figura 4-2A presenta las estructuras características del género en medio PDA: hifa hialina, conidióforo corto, conidias pigmentadas un poco elipsoidales con cuatro a cinco células y presencia de entre dos a cuatro apéndices. La identificación a nivel de especie se logró utilizando la clave de Watanabe (2002) tomando en consideración la cantidad de células y medidas de las conidias entre 10 a 20µm y la cantidad de apéndices.

En el género *Nigrospora* se clasificaron cuatro cultivos, todos pertenecientes a la especie *Nigrospora sacchari* (Tabla 4-5). La Figura 4-2B presenta las estructuras características de este género en medio PDA: conidióforo hialino y conidias oscuras en forma globosa. Se identificó a nivel de especie utilizando la clave de Watanabe (2002) basado en el conidióforo hialino simple y globoso y las conidias con medidas entre 15-22.5µm x 12.5-17.5µm.

Dentro del género *Penicillium*, tres cultivos se identificaron a especie utilizando la clave de Pitt (1985). Dos de ellos perteneciendo a *Penicillium corylophilum* y uno a *Penicillium implicatum* (Tabla 4-5). Se identificó a nivel de especie basado en los conidióforos, ramificaciones, medida de las fiálides y de las colonias en los medios de cultivos específicos (Apéndice 3). La Figura 4-4B, presenta las estructuras características de este género en medio CYA25 y G25N: conidióforo, fiálides y conidias.

Para *Colletotrichum*, se clasificaron tres cultivos con el mismo morfotipo perteneciente a la especie *Colletotrichum coccodes* (Tabla 4-5), según la clave de Watanabe (2002). La Figura 4-5A presenta las estructuras características de este género en medio PDA: acérvulo con conidias y presencia de setas.

Un cultivo fue clasificado como *Paecilomyces persicinus* (Tabla 4-5), según la clave de Watanabe (2002). La identificación a nivel de especie se basó en el color rosado de la colonia en PDA y MEA, las ramificaciones, la medida y la forma de las conidias. La Figura 4-5B presenta las estructuras características de este género en medio PDA: conidióforo, fiálides y conidias.

Cinco cultivos se clasificaron como *Cladosporium cladosporioides* (Tabla 4-5) según la clave de Hoog *et al.* (2000). Esta identificación fue basada en la forma del conidióforo, sus medidas, la forma de las conidias y el color de la cicatriz basal. La Figura 4-3B presenta las estructuras características de este género en medio MEA: conidióforo y conidias con cicatriz basal.

Dentro del género *Rhizopus* se clasificaron tres cultivos, todos con el mismo morfotipo perteneciente a la especie *Rhizopus oryzae* (Tabla 4-5), según Hoog *et al.* (2000). La clasificación se logró tomando en consideración las medidas del esporangióforo y los esporangios. La Figura 4-4A presenta las estructuras características de este género en medio MEA: rizoides, esporangióforo y esporangio con sus esporangiosporas.

Un cultivo se clasificó como *Leptosphaerulina*, tomando en consideración a Abler (2003), el cultivo pertenece a la especie *Leptosphaerulina crassiasca* (Tabla 4-5). La clasificación se hizo considerando la morfología elipsooidal de la ascospora y la cantidad de cuatro septos transversales presentes en la misma. La Figura 4-6 presenta características estructurales de este género en medio V8: pseudotecios (4-6A), ascosporas (4-6B) y las ascosporas dentro de los pseudotecios (4-6C).

El género *Fusarium* (ocho cultivos, Figura 4-3A) no fue identificado a nivel de especie ya que los cultivos no tuvieron crecimiento nuevamente para lograr seguir la clave específica.

Los muestreos del área rural se llevaron a cabo el 4 de marzo de 2017 y 17 de abril de 2017.

Los muestreos del área urbana se llevaron a cabo el 12 de marzo de 2017 y 2 de abril de 2017.

Tabla 4-1. Cantidad de colonias (CFU's) recuperadas por vuelo y por muestreos.

Muestreo	Área Rural		Área Urbana	
	Vuelo	CFU's	Vuelo	CFU's
Muestreo 1	1 AM	64	1 AM	46
	2 AM	36	2 AM	69
	3 AM	21	3 AM	44
	1 PM	41	1 PM	60
	2 PM	56	2 PM	62
	3 PM	15	3 PM	90
Muestreo 2	1 AM	115	1 AM	44
	2AM	59	2 AM	67
	3AM	43	3 AM	52
	*	*	1 PM	37
	*	*	2 PM	20
	*	*	3 PM	28
TOTAL	9 vuelos	450 CFU's	12 vuelos	619 CFU's

* Vuelos no fueron llevados a cabo por lluvia.

Tabla 4-2. Cantidad de cultivos aislados por muestreo y por área.

	Área	Recuperados	Totales
Muestreo 1	Rural	101	
	Urbana	42	143
Muestreo 2	Rural	26	66
	Urbana	40	

Tabla 4-3. Cantidad de cultivos recuperados e identificados por muestreo y por área (pos-María).

	Área	Recuperados	Identificados
Muestreo 1	Rural	47	28
	Urbana	20	9
Muestreo 2	Rural	15	5
	Urbana	21	13

Tabla 4-4. Cantidad de cultivos recuperados por géneros identificados, su frecuencia y cantidad de especies identificadas.

Género	Cantidad Cultivos Recuperados	Frecuencia	Cantidad de Especies Identificadas
<i>Curvularia</i> spp	11	0.20	3
<i>Aspergillus</i> spp	4	0.07	2
<i>Pestalotia</i> sp	3	0.05	1
<i>Nigrospora</i> sp	4	0.07	1
<i>Fusarium</i>	8	0.15	*
<i>Cladosporium</i>	13	0.25	1
<i>Rhizopus</i>	3	0.05	1
<i>Penicillium</i>	4	0.07	2
<i>Colletotrichum</i>	3	0.05	1
<i>Paecilomyces</i>	1	0.02	1
<i>Leptosphaerulina</i>	1	0.02	1

*Sólo fueron clasificados a nivel de género.

Tabla 4-5. Cantidad de cultivos clasificados en las especies asociadas a los géneros *Curvularia*, *Aspergillus*, *Pestalotia*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Rhizopus* y *Leptosphaerulina*.

Especie	Cantidad de Cultivos
<i>Curvularia brachyspora</i>	5
<i>Curvularia clavata</i>	3
<i>Curvularia lunata</i>	3
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3
<i>Aspergillus japonicus</i>	1
<i>Pestalotia pezizoides</i>	3
<i>Nigrospora sacchari</i>	4
<i>Penicillium corylophilum</i>	2
<i>Penicillium implicatum</i>	1
<i>Paecilomyces persicinus</i>	1
<i>Colletotrichum coccodes</i>	3
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	5
<i>Rhizopus oryzae</i>	3
<i>Leptosphaerulina crassiasca</i>	1

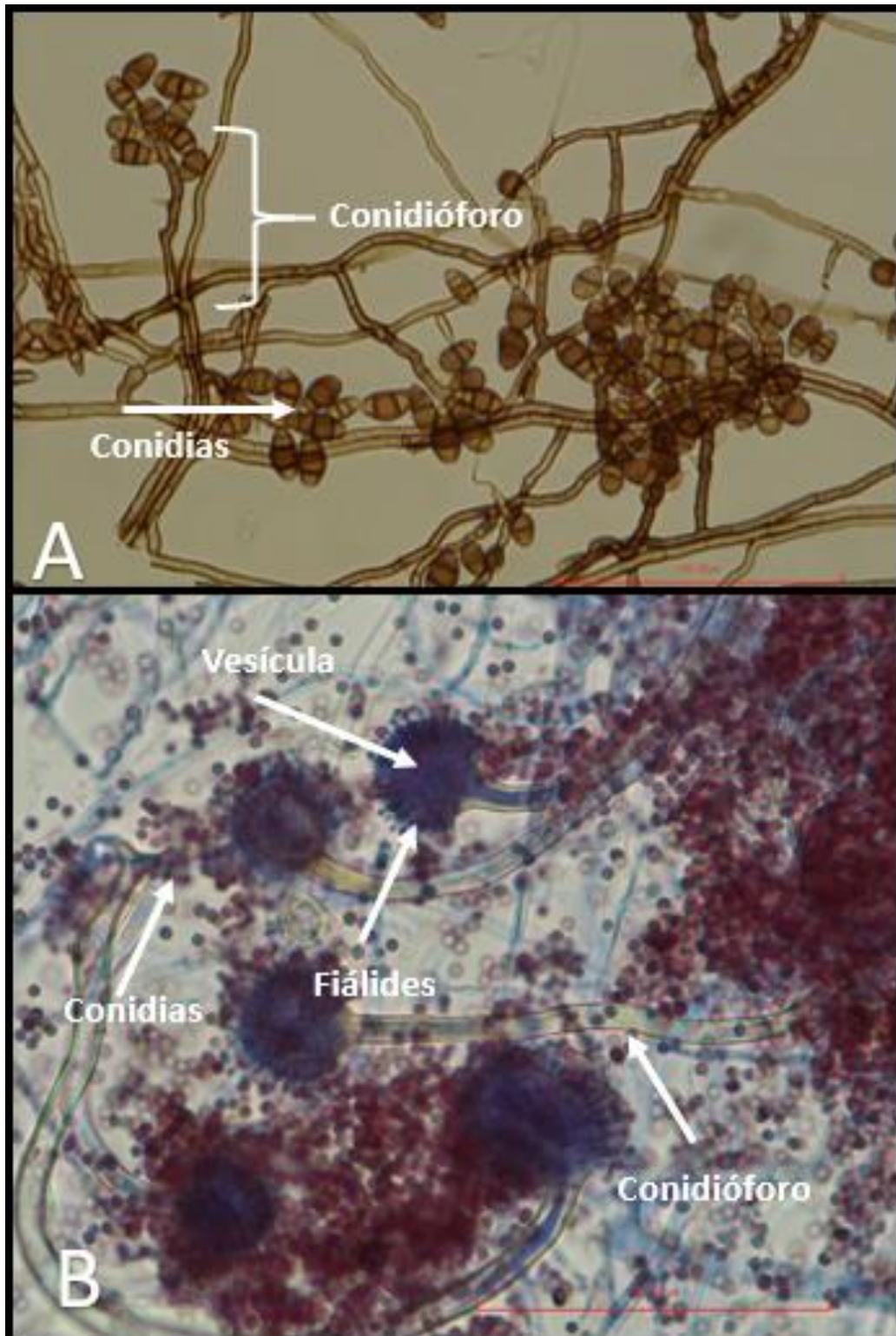


Figura 4-1. Estructuras características de *Curvularia*: conidióforo y conidias curvas y segmentadas (A), y *Aspergillus*: conidióforo, vesícula globosa, fiálides y conidias (B) en magnificación 40X.

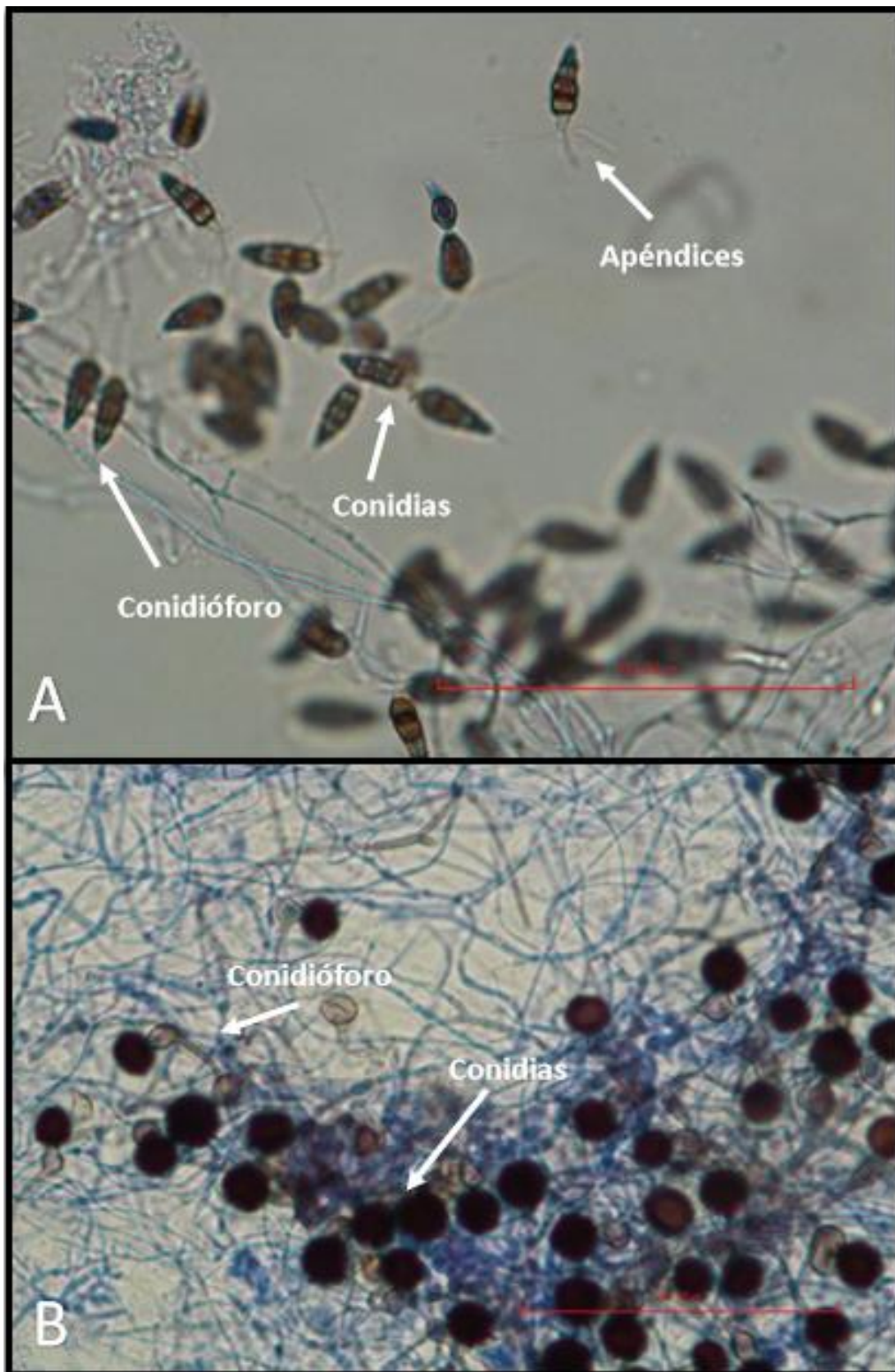


Figura 4-2. Estructuras características de *Pestalotia*: conidióforo, conidias con apéndices (A) y *Nigrospora*: conidióforo hialino y conidias redondas de color oscuro (B) en magnificación 40X.

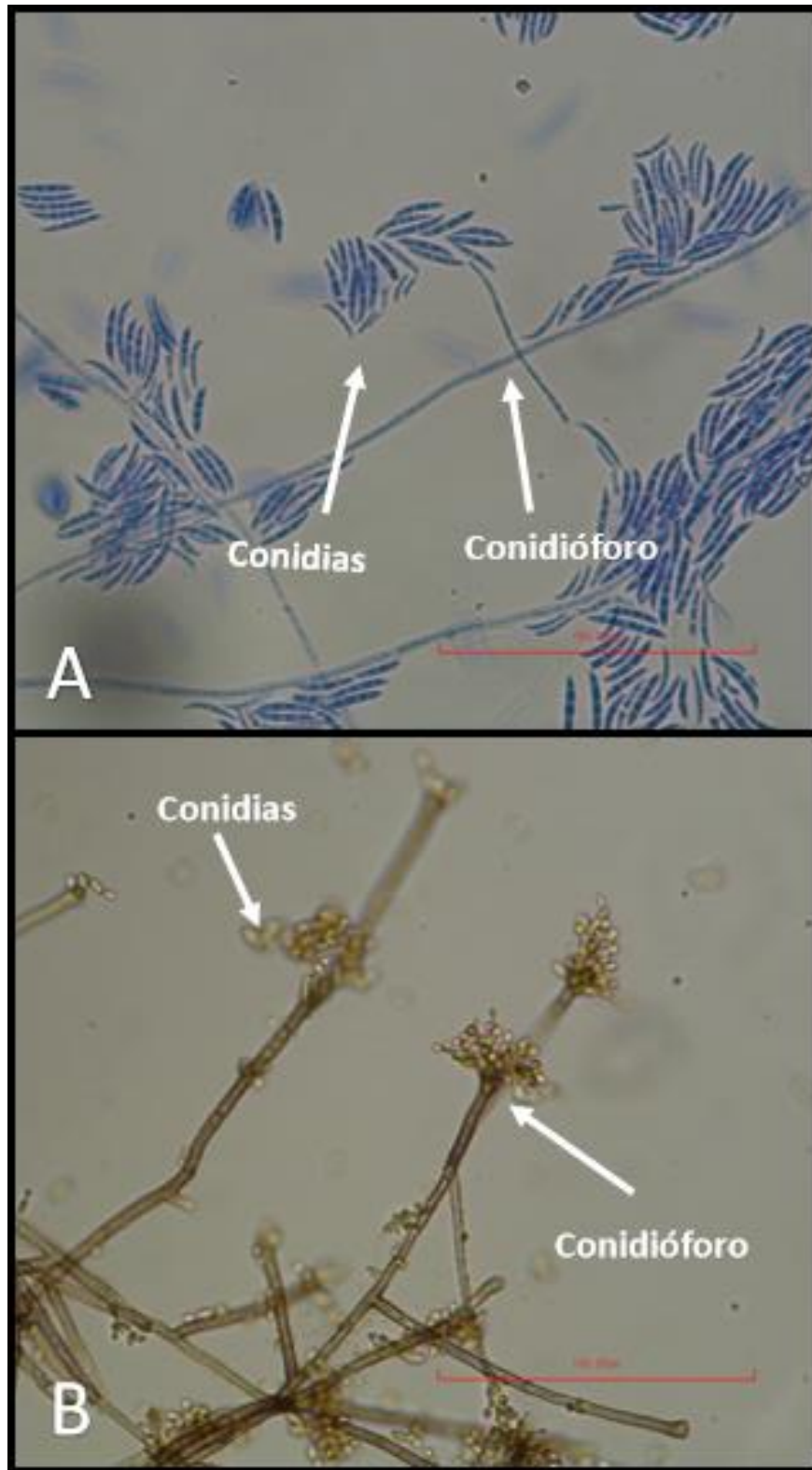


Figura 4-3. Estructuras características de *Fusarium*: conidias multicelulares en forma de canoa y conidióforo simple (A) y *Cladosporium*: conidias unicelulares de color verdoso con cicatriz (B) en magnificación 40X.

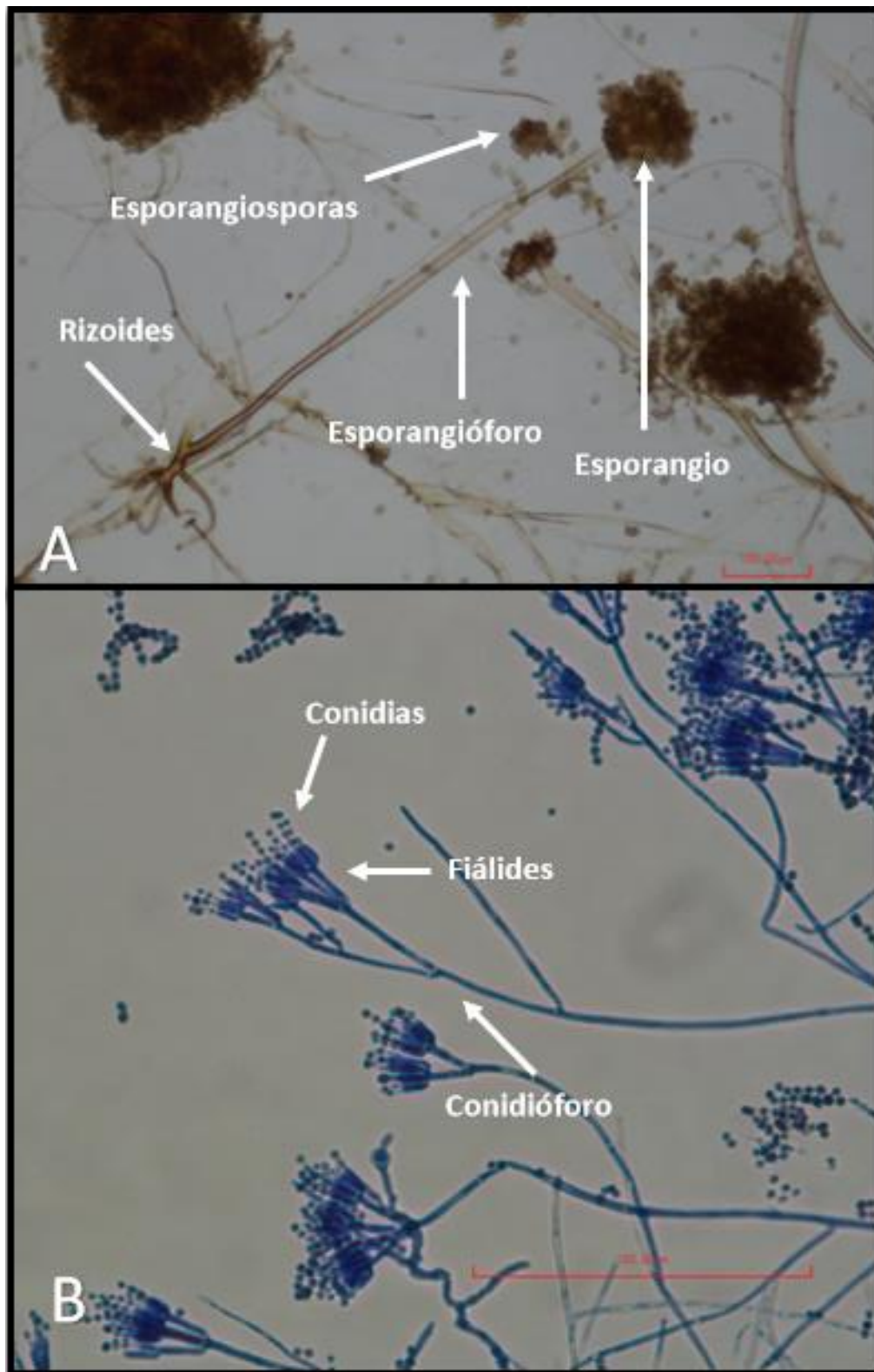


Figura 4-4. Estructuras características de *Rhizopus*: esporangiόforo, esporangio con sus esporangiosporas y rizoides (A) y *Penicillium*: conidióforo, fiálides y conidias (B) en magnificación 40X.

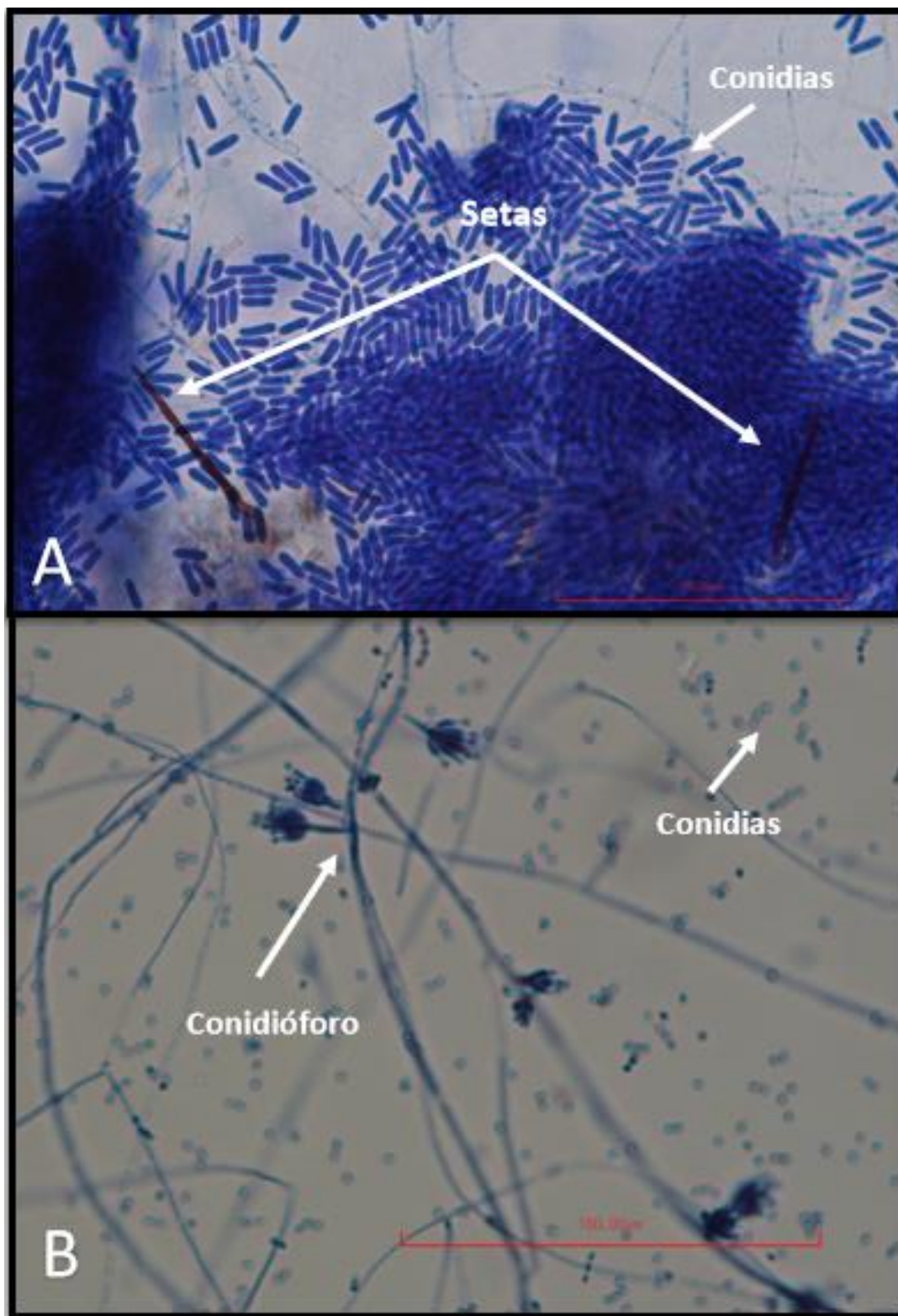


Figura 4-5. Estructuras características de *Colletotrichum*: acérvulo con conidias y setas (A) y *Paecilomyces*: conidióforo y conidias (B) en magnificación 40X.

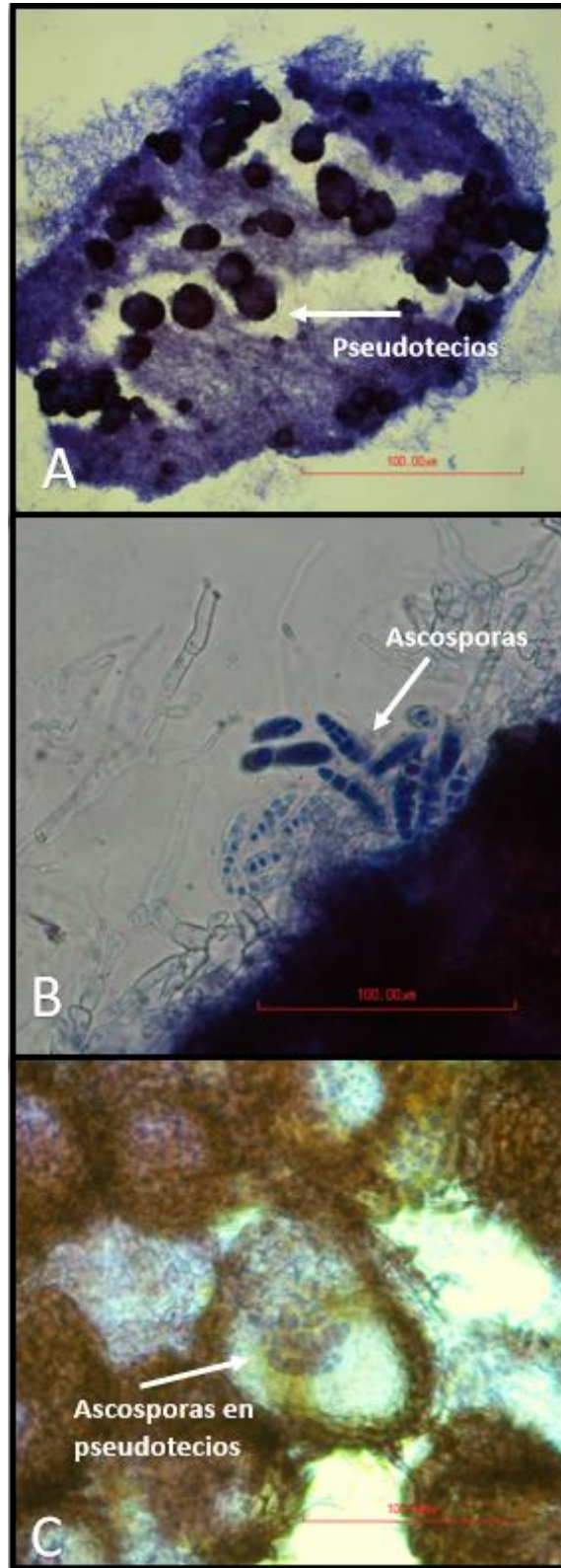


Figura 4-6. Estructuras características de *Leptosphaerulina* en medio V8: pseudotecios (A), ascosporas hialinas elipsoidales con septos (B) y ascosporas dentro de los pseudotecios (C) en magnificación 40X.

4.2 Recuperación de Esporas de Hongos No Viables y Polen

Al finalizar los muestreos, se observaron las laminillas adhesivas y se procedió a contar e identificar el particulado. La Tabla 4-6, documenta la cantidad de esporas y polen que se recuperó por muestreo y por área y las Tablas 4-7 a 4-10 documentan el particulado recuperado por laminilla en cada muestreo. Las Figuras 4-7 a 4-22 documentan las esporas identificadas. La Figura 4-23 documenta un conglomerado de esporas capturado luego de que el muestreador sufriera movimientos bruscos debido a fuertes vientos. Las Figuras 4-24 a 4-29 documentan el polen identificado de las laminillas adhesivas. Las Tablas 4-11 y 4-12 documentan, respectivamente, las frecuencias de los géneros de esporas no viables y polen recuperados por área de muestreo y frecuencias totales. Al igual que para el muestreo viable, los nombres utilizados para las esporas fueron verificados en el sitio web *indexfungorum.org* (CABI_Biosciences, 2018) para determinar su validez taxonómica. Se verificó también si los géneros han sido reportados en la baja atmósfera de Puerto Rico a través de los sitios web *Cybertruffle* (Cantrell *et al.*, 2006) y *Widely Prevalent Fungi of the United States* (Uchida, 2007). En el caso de los granos de polen, se verificó que las plantas asociadas a los mismos estuvieran reportadas en Puerto Rico a través del sitio web *Plantas de la Isla de Puerto Rico* (Gann *et al.*, 2015-2018).

Tabla 4-6. Contaje de esporas de hongo y granos de polen recuperados por muestreo y por área.

	Área	Esporas recuperadas	Polen recuperado
Muestreo 1	Rural	85	29
	Urbana	149	53
Muestreo 2	Rural	37	9
	Urbana	72	96

Tabla 4-7. Particulado no viable recuperado en laminillas adhesivas en el Muestreo del Área Rural 1.

Particulado		Esporas					Otro Particulado						Total por Laminilla
Por Laminilla	Polen	<i>Cladosporium</i>	<i>Curvularia</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus/ Penicillium</i>	Otros	Total de Esporas	Algas	Cenizas	Protistas	Otros	Total de Particulado	
1	0	0	0	0	3	4	7	0	0	0	160	160	167
2	3	1	1	0	0	6	8	0	3	1	316	320	331
3	0	0	1	0	0	4	5	0	0	0	259	259	264
4	1	7	3	0	0	4	14	0	0	0	391	391	406
5	6	0	5	1	0	13	19	0	0	0	245	245	270
6	1	0	16	0	9	24	49	0	0	0	209	209	259
7	6	0	6	0	0	7	13	3	0	1	78	82	101
8	3	1	2	0	1	11	15	1	0	0	363	364	382
9	0	0	1	0	0	3	4	0	0	0	325	325	329
10	3	1	0	0	0	3	4	0	0	0	244	244	251
11	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0	101	101	104
12	1	0	2	0	0	1	3	0	0	0	73	73	77
Total	24	10	37	1	13	83	144	4	3	2	2,764	2,773	2,941

Tabla 4-8. Particulado no viable recuperado en laminillas adhesivas en el Muestreo del Área Rural 2.

Particulado		Esporas						Otro Particulado						Total de particulado	Total por Laminilla
		Polen	<i>Cladosporium</i>	<i>Curvularia</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus/ Penicillium</i>	Otros	Total de Esporas	Algas	Cenizas	Origen Animal	Protistas	Otros		
Por	Laminilla														
1		3	2	0	0	0	8	10	0	0	0	0	97	97	110
2		1	1	6	0	1	11	19	0	0	0	0	173	173	193
3		0	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	61	61	64
4		0	3	1	0	1	2	7	0	0	0	0	46	46	53
5		4	1	2	0	1	16	20	0	0	0	0	91	91	115
6		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11
Total		8	7	9	0	3	40	59	0	0	0	0	479	479	546

*Los vuelos para las laminillas 7 al 12 no fueron llevados a cabo por lluvia.

Tabla 4-9. Particulado no viable recuperado en laminillas adhesivas en el Muestreo del Área Urbana 1.

Particulado		Esporas					Otro Particulado				
Por Laminilla	Polen	<i>Cladosporium</i>	<i>Curvularia</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus/ Penicillium</i>	Otros	Total de Esporas	Origen Animal	Otros	Total de particulado	Total por Laminilla
1	35	0	2	0	20	23	45	1	449	450	530
2	11	0	3	0	0	16	19	0	242	242	272
3	13	0	0	0	3	13	16	0	243	243	272
4	8	0	0	0	0	12	12	1	196	197	217
5	3	0	0	0	0	16	16	1	232	233	252
6	4	4	0	1	0	12	17	0	123	123	144
7	15	0	0	0	0	25	25	0	164	164	204
8	6	5	2	0	0	7	14	1	146	147	167
9	8	0	0	0	0	15	15	0	144	144	167
10	1	0	0	0	0	6	6	0	205	205	212
11	17	2	0	0	0	24	26	0	174	174	217
12	5	0	0	0	0	11	11	0	159	159	175
Total	126	11	7	1	23	180	222	4	2,477	2,481	2,829

Tabla 4-10. Particulado no viable recuperado en laminillas adhesivas en el Muestreo del Área Urbana 2.

Particulado Por Laminilla	Polen	Esporas					Otro Particulado				
		<i>Cladosporium</i>	<i>Curvularia</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus/ Penicillium</i>	Otros	Total de Esporas	Origen Animal	Otros	Total de particulado	Total por Laminilla
1	36	4	0	0	13	18	35	0	373	373	444
2	43	28	0	0	68	11	107	0	357	357	507
3	6	0	0	1	2	3	6	0	131	131	143
4	0	0	0	0	0	3	3	0	114	114	117
5	0	2	0	0	2	13	17	0	86	86	103
6	10	0	0	0	0	8	8	1	101	102	120
7	23	0	0	0	0	18	18	0	149	149	190
8	21	0	0	0	0	14	14	1	169	170	205
9	26	1	0	0	0	6	7	0	131	131	164
10	6	2	0	0	0	7	9	0	109	109	124
11	1	2	0	0	0	1	3	0	45	45	49
12	0	0	11	0	0	1	12	1	73	74	86
Total	172	39	11	1	85	103	239	3	1,838	1,841	2,252

Tabla 4-11. Frecuencias de esporas de hongos no viables, identificadas a nivel de género, por área de muestreo y frecuencias totales.

Género de Esporas	Frecuencia		
	Área Rural	Freccuenia Área Urbana	Frecuencia Total
<i>Tetraploa</i>	0.010	0.002	0.005
<i>Nigrospora</i>	0.055	0.049	0.051
<i>Curvularia</i>	0.230	0.040	0.098
<i>Spegazzinia</i>	0.030	0.002	0.011
<i>Sporidesmium</i>	0.005	0.002	0.003
<i>Melanomma</i>	0.005	0.000	0.002
<i>Alternaria</i>	0.005	0.004	0.005
<i>Exosporium</i>	0.010	0.004	0.006
<i>Didymosphaeria</i>	0.005	0.007	0.021
<i>Esporas Asp/Pen</i>	0.075	0.228	0.181
<i>Delitschia</i>	0.000	0.004	0.003
<i>Amphisphaeria</i>	0.015	0.033	0.028
<i>Torula</i>	0.005	0.020	0.015
<i>Corynespora</i>	0.015	0.013	0.014
<i>Cladosporium</i>	0.085	0.111	0.103
<i>Aspergillus</i>	0.005	0.011	0.009
<i>Leptosphaeria</i>	0.020	0.042	0.035
<i>Massarina</i>	0.025	0.077	0.061
<i>Coprinus</i>	0.020	0.004	0.009
<i>Sporormiella</i>	0.035	0.004	0.014
<i>Fusarium</i>	0.040	0.020	0.026
<i>Xylaria</i>	0.005	0.013	0.011
<i>Cercophora</i>	0.070	0.000	0.021
<i>Pithomyces</i>	0.010	0.022	0.018
<i>Puccinia</i>	0.035	0.013	0.020
<i>Saccobolus</i>	0.000	0.007	0.005
<i>Chlorophyllum</i>	0.005	0.013	0.011
<i>Coniochaeta</i>	0.000	0.002	0.002
<i>Lophiostoma</i>	0.010	0.009	0.009
<i>Oidium</i>	0.000	0.015	0.011
<i>Cortinarius</i>	0.010	0.000	0.003
<i>Agrocybe</i>	0.010	0.000	0.003
<i>Diatrype</i>	0.005	0.000	0.002
<i>Agaricus</i>	0.015	0.066	0.051
<i>Stereum</i>	0.030	0.013	0.018
<i>Colletotrichum</i>	0.000	0.031	0.021
<i>Uredosporas (roya)</i>	0.030	0.027	0.028
<i>Solheimia</i>	0.000	0.002	0.002

<i>Venturia</i>	0.000	0.009	0.006
<i>Caloplaca</i>	0.000	0.002	0.002
<i>Arthrimum</i>	0.000	0.002	0.002
<i>Bipolaris</i>	0.005	0.004	0.005
<i>Exserohilum</i>	0.005	0.004	0.005
<i>Pleospora</i>	0.000	0.004	0.003
<i>Drechslera</i>	0.000	0.002	0.002
<i>Pseudocercospora</i>	0.000	0.002	0.002
<i>Meliola</i>	0.005	0.000	0.002
<i>Fusariella</i>	0.000	0.004	0.003
<i>Leptosphaerulina</i>	0.000	0.002	0.002
<i>Polythrincium</i>	0.000	0.020	0.014
<i>Helicomyces</i>	0.000	0.002	0.002
<i>Endophragmiella</i>	0.000	0.002	0.002
<i>Cercospora</i>	0.000	0.002	0.002
<i>Spondylocyadiella</i>	0.000	0.002	0.002
<i>Pernospora</i>	0.000	0.002	0.002
<i>Xylariaceae</i>	0.005	0.018	0.014

Tabla 4-12. Frecuencias de polen, identificados a nivel de género, por área de muestreo y frecuencias totales.

Géneros	Frecuencia Área Rural	Frecuencia Área Urbana	Frecuencia Total
<i>Pinus</i>	0.188	0.111	0.118
<i>Cecropia</i>	0.188	0.463	0.436
<i>Bauhinia</i>	0.031	0.017	0.018
<i>Persea</i>	0.031	0.003	0.006
<i>Cyathea</i>	0.031	0.003	0.006
<i>Ambrosia</i>	0.281	0.124	0.139
<i>Maclura</i>	0.063	0.003	0.009
<i>Ophioglossum</i>	0.031	0.000	0.003
<i>Fraxinus</i>	0.031	0.000	0.003
<i>Morus</i>	0.063	0.245	0.227
<i>Tilia</i>	0.000	0.007	0.006
<i>Myrica</i>	0.000	0.003	0.003
<i>Chenopodium</i>	0.031	0.007	0.009
<i>Podocarpus</i>	0.000	0.003	0.003
<i>Schinus</i>	0.000	0.003	0.003
<i>Aralia</i>	0.000	0.003	0.003
<i>Persicaria</i>	0.031	0.003	0.006

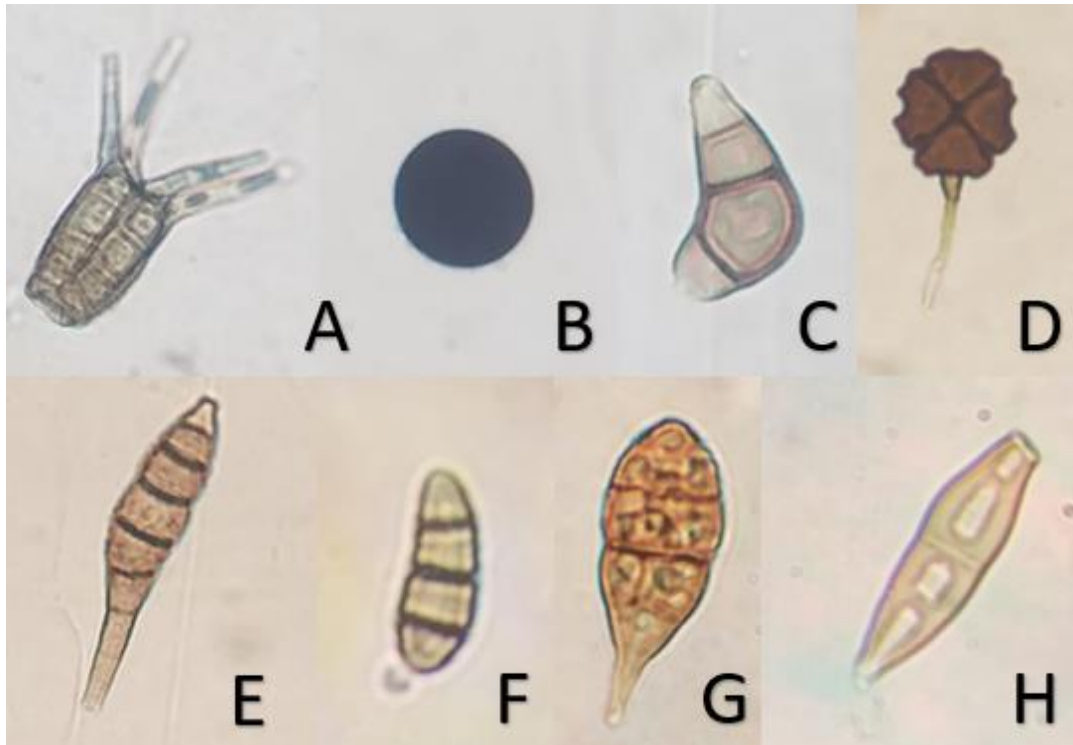


Figura 4-7. Esporas de hongos identificadas. *Tetraploa* (A), *Nigrospora* (B), *Curvularia* (C), *Spegazzinia* (D), *Sporidesmium* (E), *Melanomma* (F), *Alternaria* (G) y *Exosporium* (H).

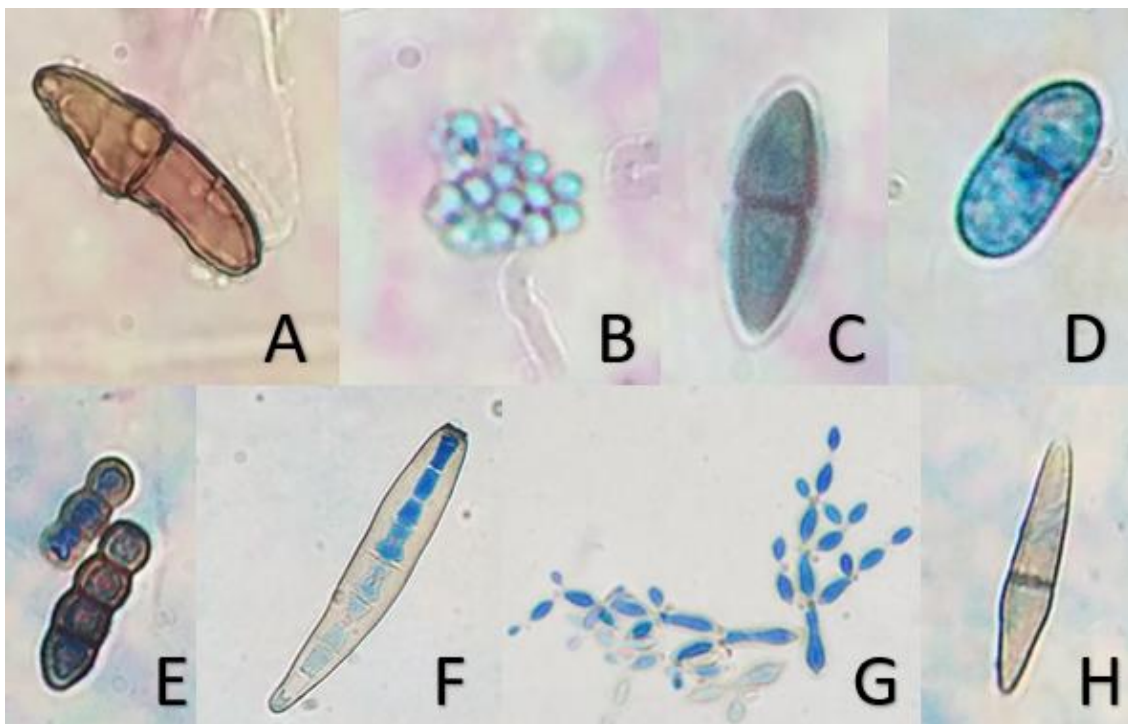


Figura 4-8. Esporas de hongos identificadas. *Didymosphaeria* (A), Esporas de *Aspergillus* o *Penicillium* (B), *Delitschia** (C), *Amphisphaeria* (D), *Torula* (E), *Corynespora* (F), *Clasdosporium* (G) y *Amphisphaeria* (H).

* No hay reportes en Puerto Rico hasta el 2006.

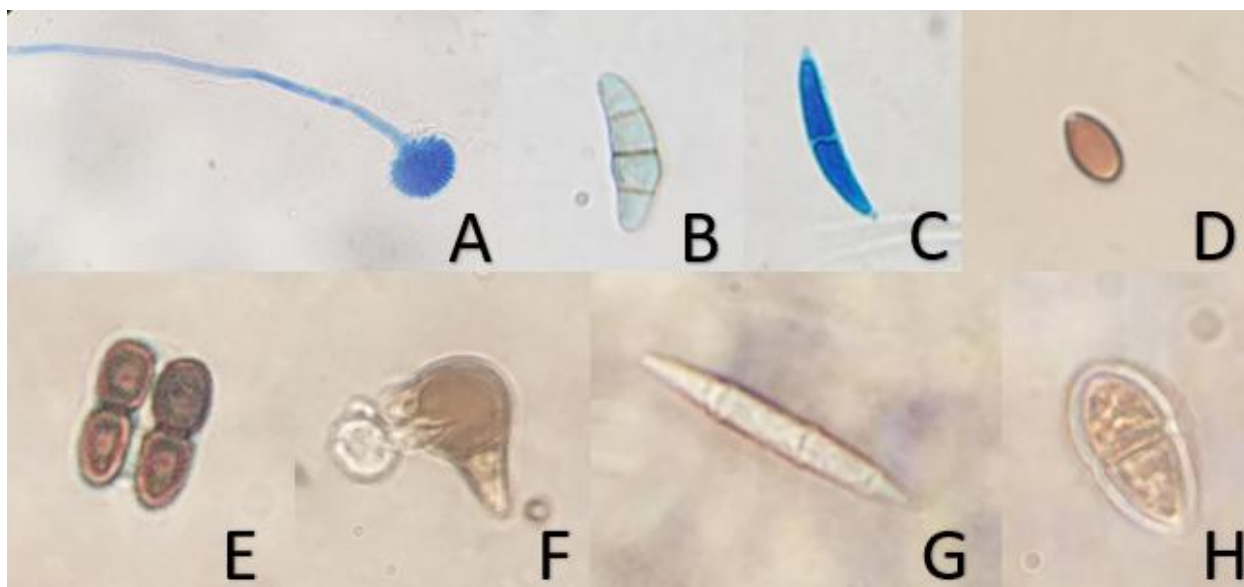


Figura 4-9. Esporas de hongos identificadas. *Aspergillus* (A), *Leptosphaeria* (B), *Massarina* (C), *Coprinus* (D), *Sporormiella* (E), *Curvularia* (F), *Fusarium* (G) y *Didymosphaeria* (H).



Figura 4-10. Esporas de hongos identificadas. *Didymosphaeria* (A), *Xylaria* (B), *Cercophora* (C), *Didymosphaeria* (D), *Spegazzinia* (E), *Pithomyces* (F), *Massarina* (G) y *Leptosphaeria* (H).

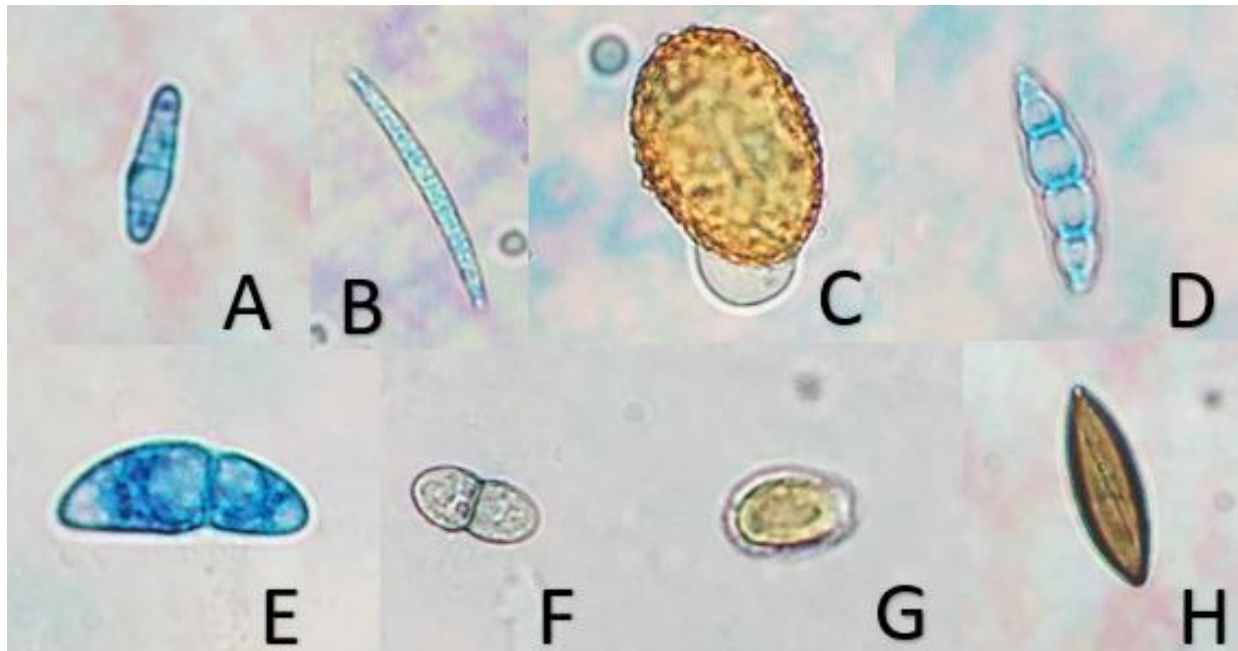


Figura 4-11. Esporas de hongos identificadas. *Leptosphaeria* (A), *Fusarium* (B), *Puccinia* (C), *Leptosphaeria* (D), *Amphisphaeria* (E), *Saccobolus* (F), *Chlorophyllum* (G) y *Coniochaeta* (H).

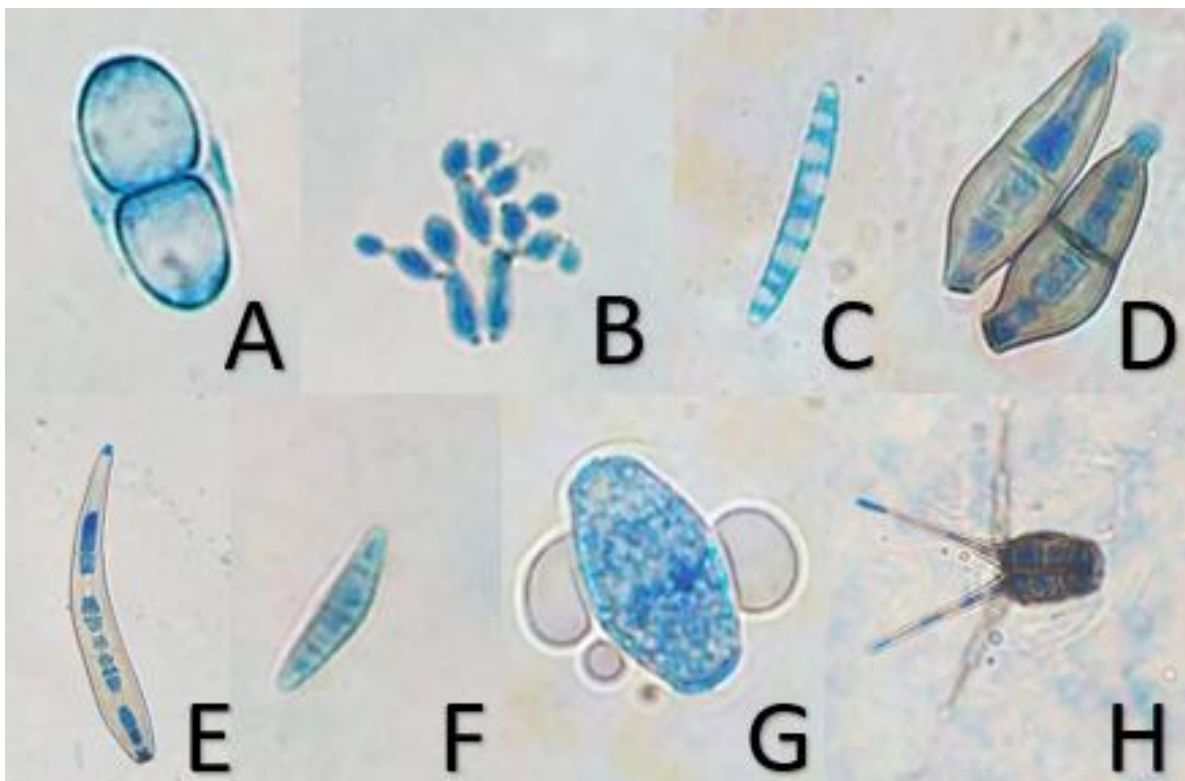


Figura 4-12. Esporas de hongos identificadas. *Saccobolus* (A), *Cladosporium* (B), *Lophiostoma* (C), *Exosporium* (D), *Corynespora* (E), *Leptosphaeria* (F), *Oidium* (G) y *Tetraploa* (H).

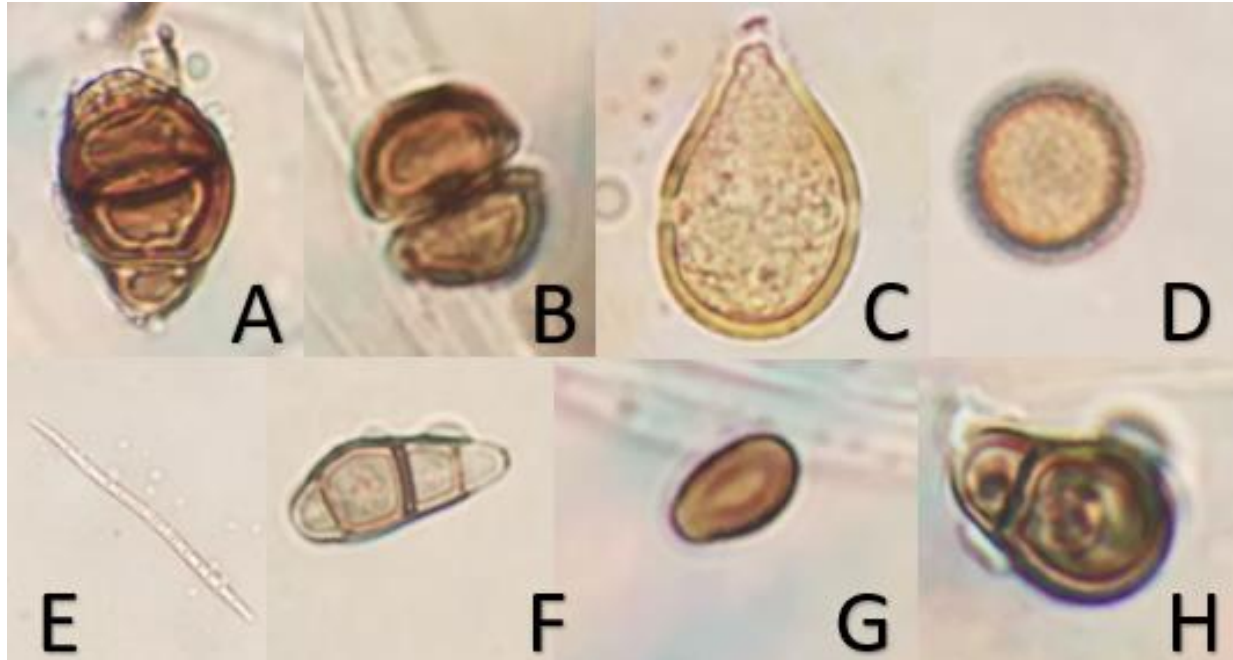


Figura 4-13. Esporas de hongos identificadas. *Curvularia* (A), teliosporas de *Puccinia* (B), *Cortinarius* (C), posible mixomiceto (D), *Fusarium* (E), *Curvularia* (F), *Coprinus* (G) y *Curvularia* (H).

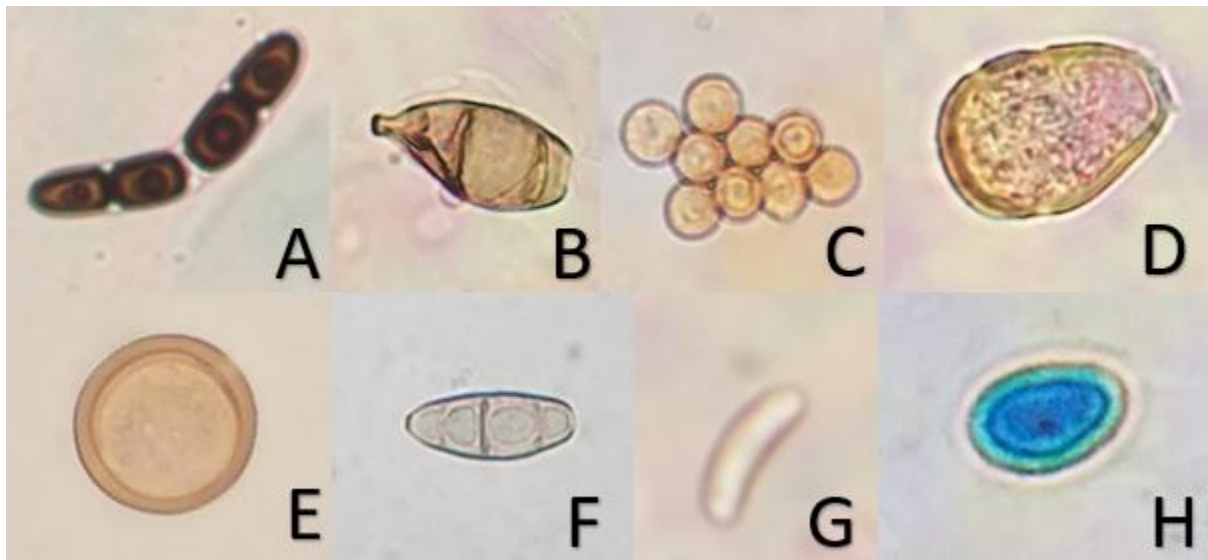


Figura 4-14. Esporas de hongos identificadas. *Sporomiella* (A), *Curvularia* (B), esporas de *Aspergillus* o *Penicillium* (C), *Agrocybe* (D), desconocida, parecida a *Puccinia* (E), *Curvularia* (F), *Diatrype* (G) y *Agaricus* (H).

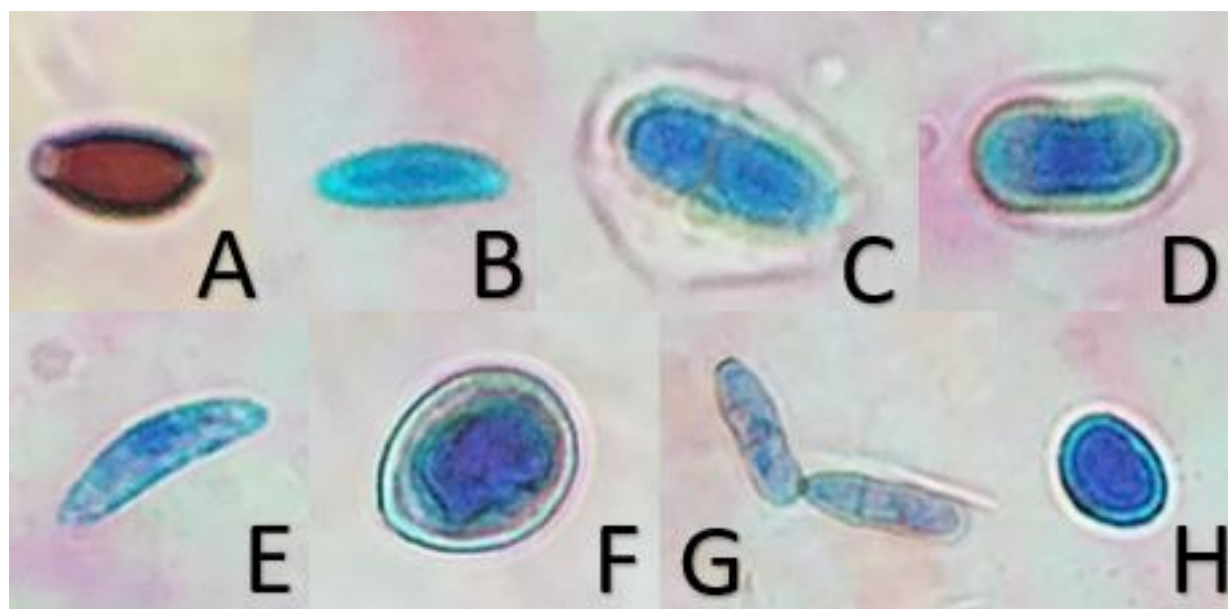


Figura 4-15. Esporas de hongos identificadas. Xylariaceae (A), *Stereum* (B), *Cladosporium* (C), *Colletotrichum* (D), *Fusarium* (E), *Chlorophyllum* (F), desconocida, parecida a *Curvularia* (G) y *Agaricus* (H).



Figura 4-16. Esporas de hongos identificadas. Uredospora de una roya (A), *Solheimia** (B), *Xylaria* (C), *Venturia** (D), *Caloplaca* (E), *Arthrimum* (F), *Cladosporium* (G) y *Massarina* (H).

* No hay reportes en Puerto Rico hasta el 2006.

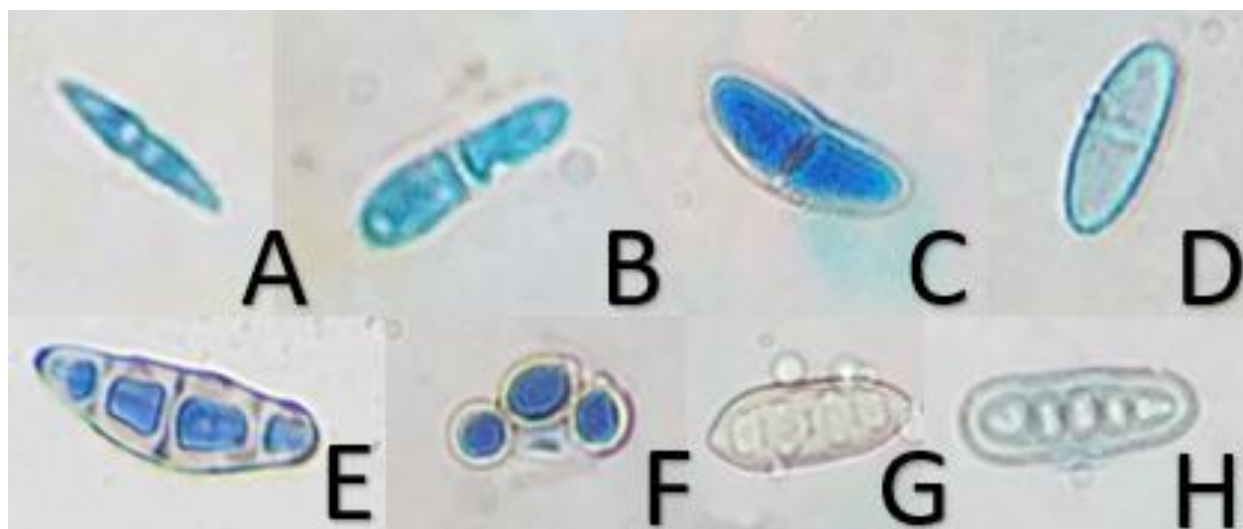


Figura 4-17. Esporas de hongos identificadas. *Sporidesmium* (A), *Massarina* (B), *Delitschia** (C), *Amphisphaeria* (D), *Bipolaris* (E), esporas de *Aspergillus* o *Penicillium* (F), *Exserohilum* (G) y *Bipolaris* (H).

* No hay reportes en Puerto Rico hasta el 2006.

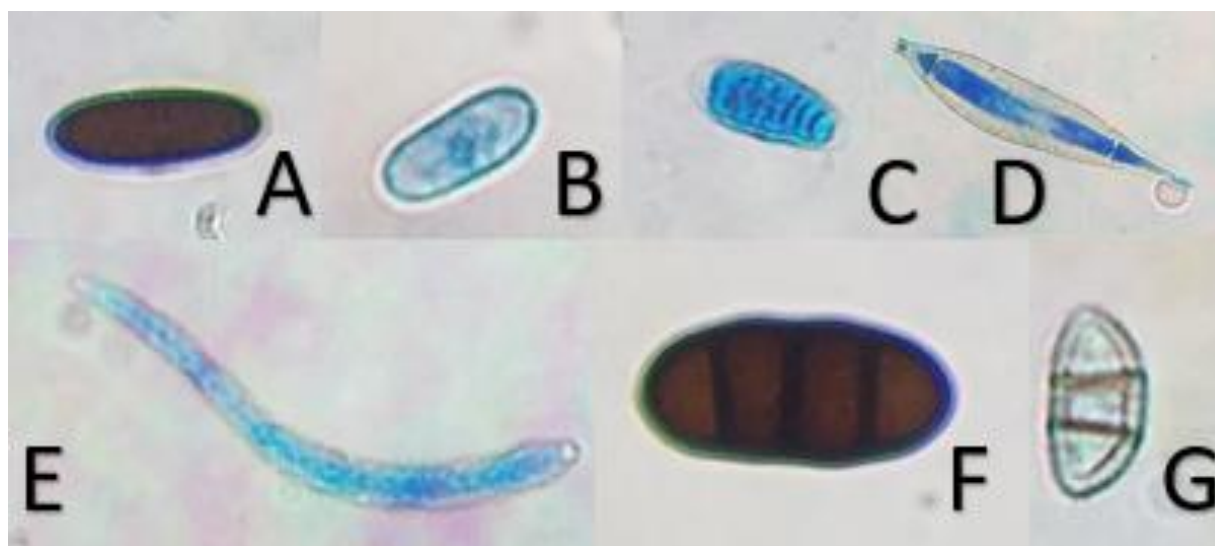


Figura 4-18. Esporas de hongos identificadas. Xylariaceae (A), *Colletotrichum* (B), posible *Pleospora* (C), *Drechslera* (D), *Pseudocercospora* (E), *Meliola* (F) y *Fusariella** (G).

* No hay reportes en Puerto Rico hasta el 2006.

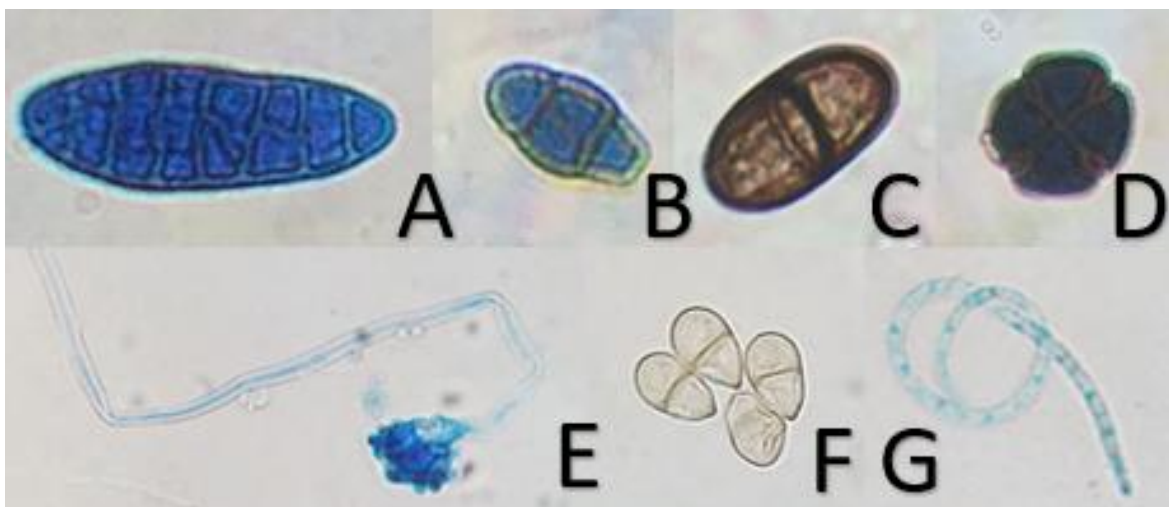


Figura 4-19. Esporas de hongos identificadas. *Leptosphaerulina* (A), *Alternaria* (B), *Amphisphaeria* (C), *Spegazzinia* (D), *Aspergillus* (E), *Polythrincium** (F) y *Helicomyces* (G).
* No hay reportes en Puerto Rico hasta el 2006.

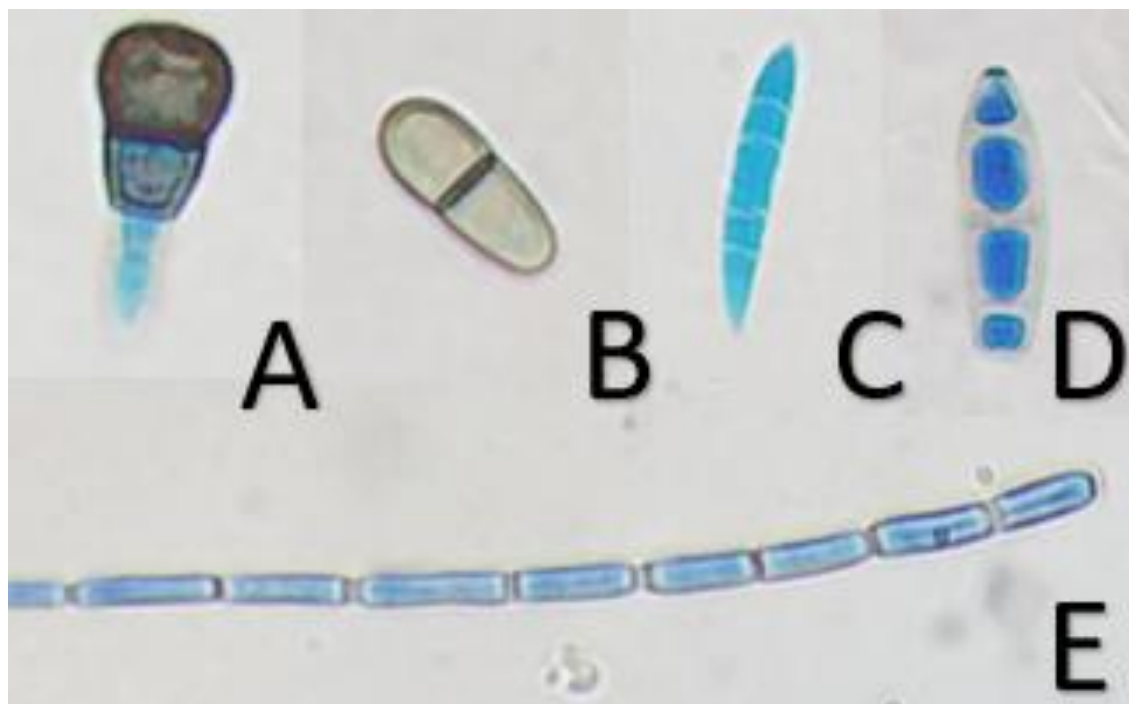


Figura 4-20. Esporas de hongos identificadas. *Endophragmiella** (A), *Amphisphaeria* (B), *Fusarium* (C), *Bipolaris* (D) y *Cercospora* (E).
* No hay reportes en Puerto Rico hasta el 2006.

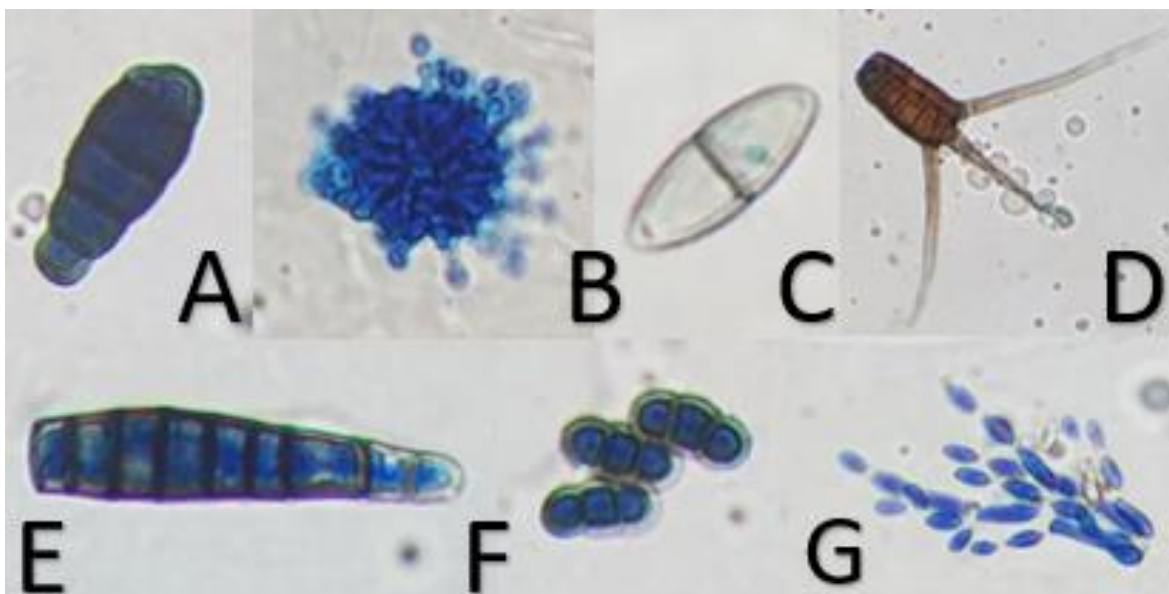


Figura 4-21. Esporas de hongos identificadas. *Alternaria* (A), posible *Aspergillus* (B), *Didymosphaeria* (C), *Tetraploa* (D), desconocida, similar a *Curvularia* (E), *Spondylocodiella** (F) y *Cladosporium* (G).

* No hay reportes en Puerto Rico hasta el 2006.

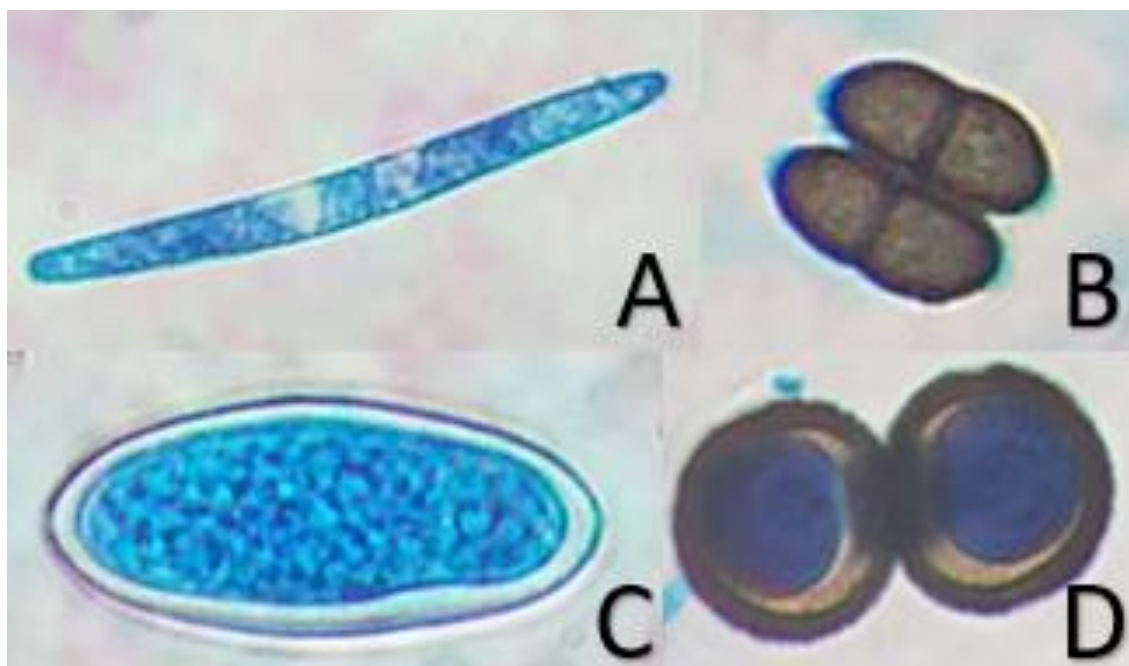


Figura 4-22. Esporas de hongos identificadas. Posible *Massarina* (A), *Amphisphaeria* (B), posible *Peronospora* (C), teliosporas de *Puccinia* (D).

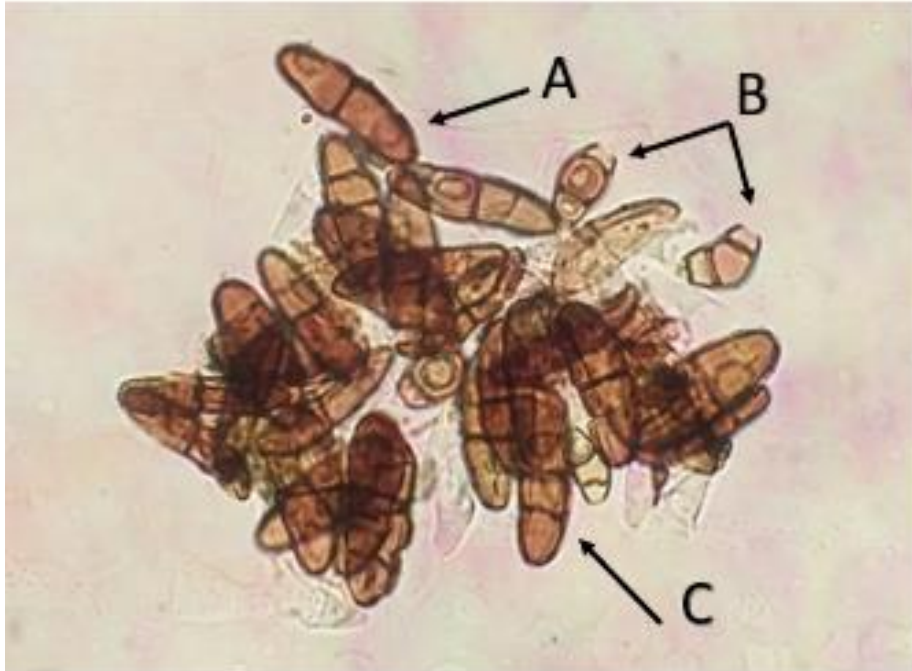


Figura 4-23. Conglomerado de esporas por impacto de vientos fuertes en muestreo Rural 1. Se distinguen, al menos, tres géneros distintos: *Didymosphaeria* (A), *Curvularia* (B), y *Cercophora* (C).

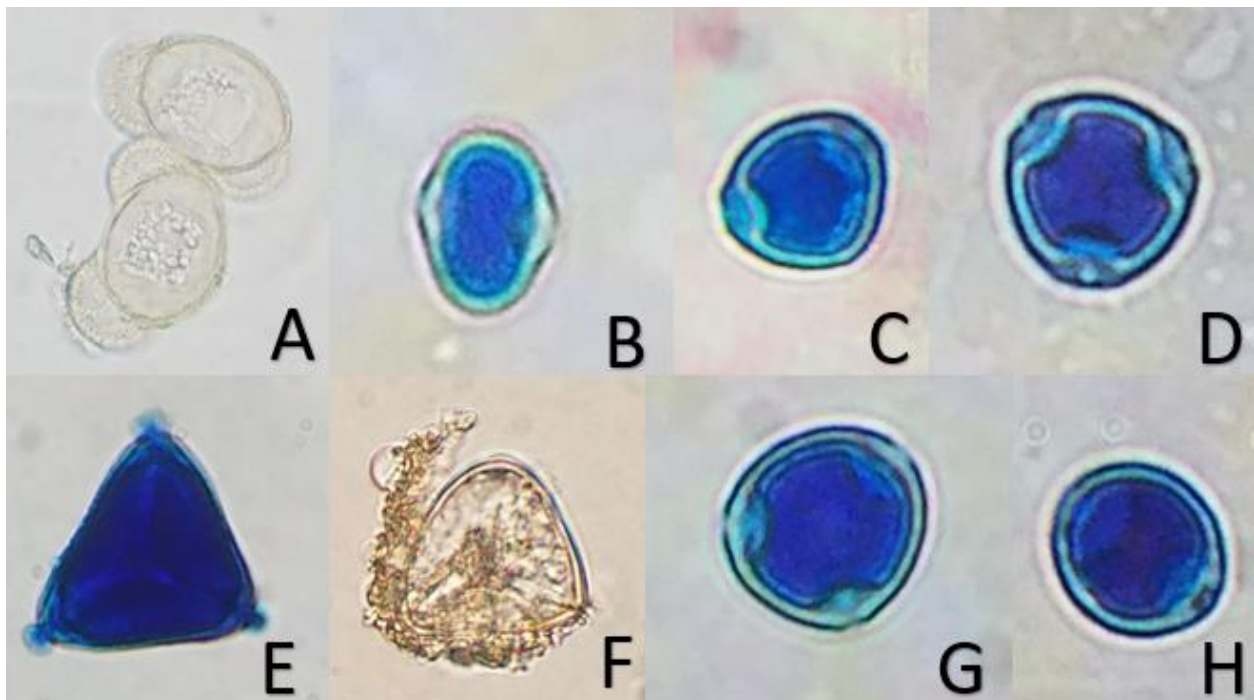


Figura 4-24. Granos de polen identificado. *Pinus* (A), *Cecropia* (B), *Morus* (C), *Morus* (D), *Cyathea* (E), *Cyathea* (F), *Morus* (G) y *Morus* (H).

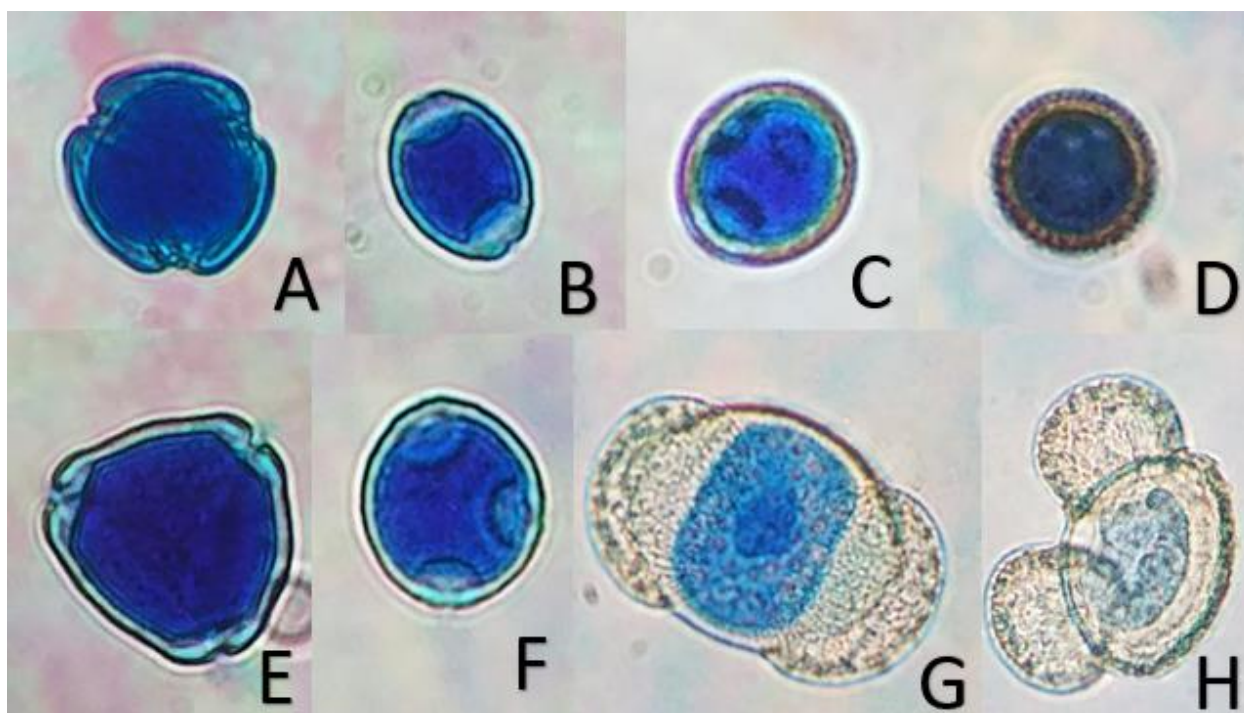


Figura 4-25. Granos de polen identificado. *Tilia* (A), *Morus* (B), *Morus* (C), *Ambrosia* (D), *Myrica* (E), *Morus* (F), *Pinus* (G) y *Pinus* (H).

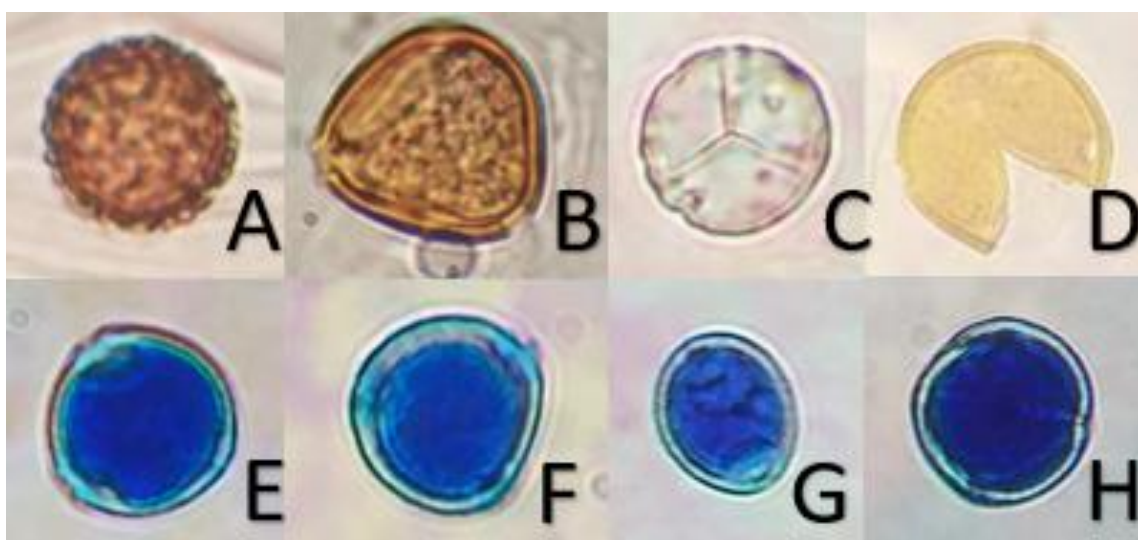


Figura 4-26. Granos de polen identificado. *Persea* (A), *Maclura* (B), *Ophioglossum* (C), *Fraxinus* (D), *Schinus* (E), *Morus* (F), *Morus* (G) y *Morus* (H).

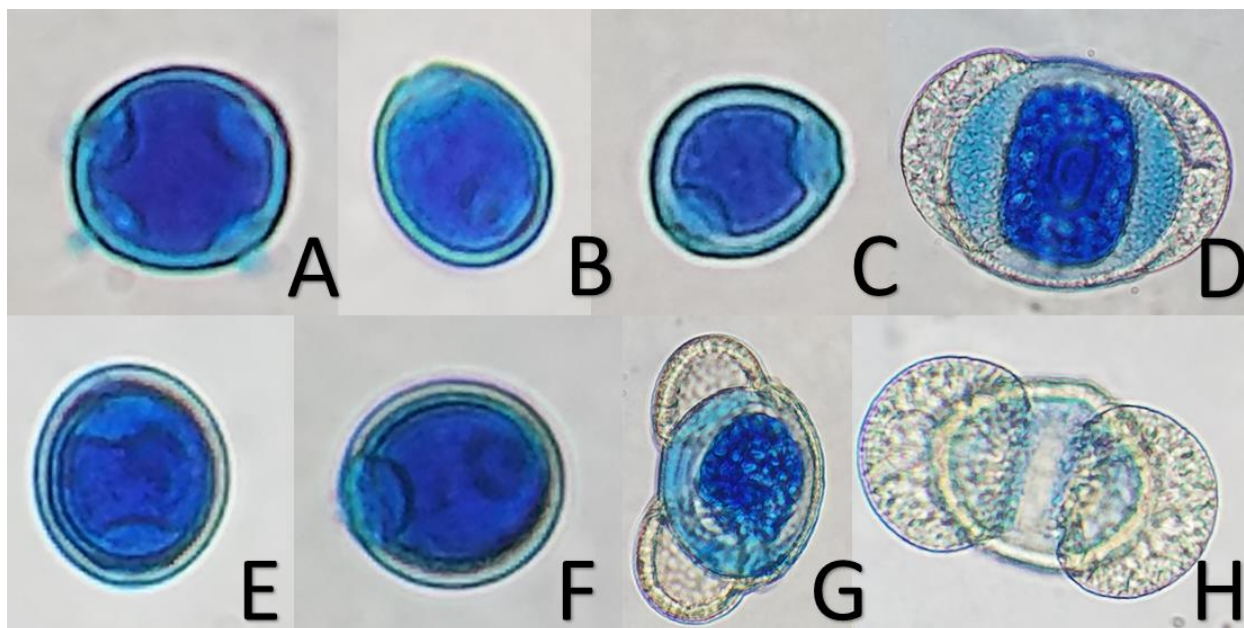


Figura 4-27. Granos de polen identificado. *Morus* (A), *Morus* (B), *Morus* (C), *Pinus* (D), *Morus* (E), *Morus* (F), *Podocarpus* (G) y *Pinus* (H).

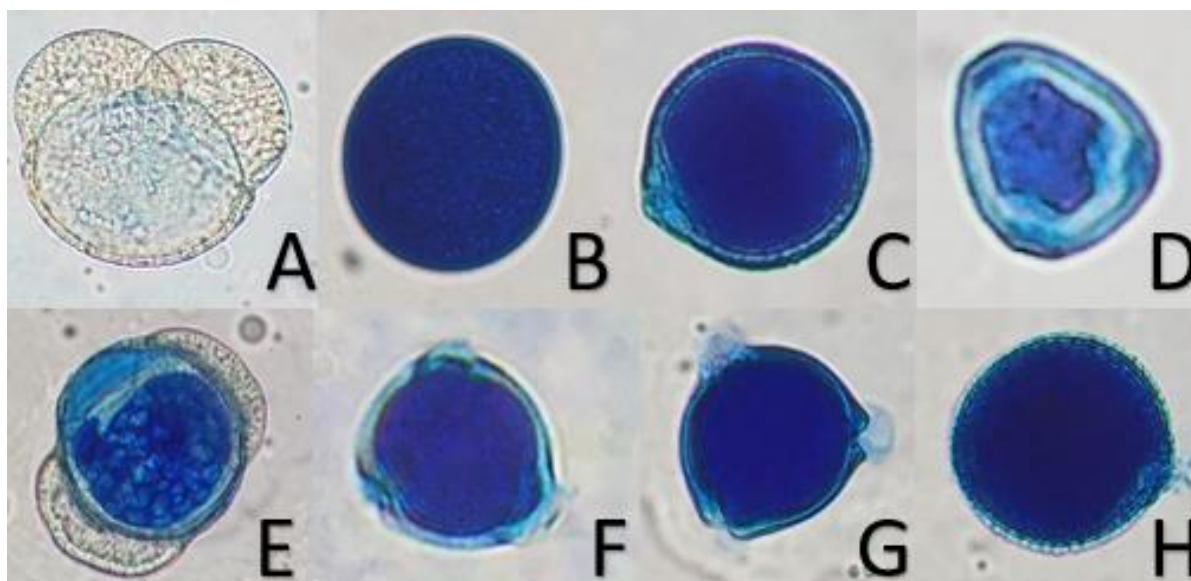


Figura 4-28. Granos de polen identificado. *Pinus* (A), *Chenopodium* (B), *Morus* (C), *Aralia* (D), *Pinus* (E), *Bauhinia* (F), *Bauhinia* (G) y *Persicaria* (H).

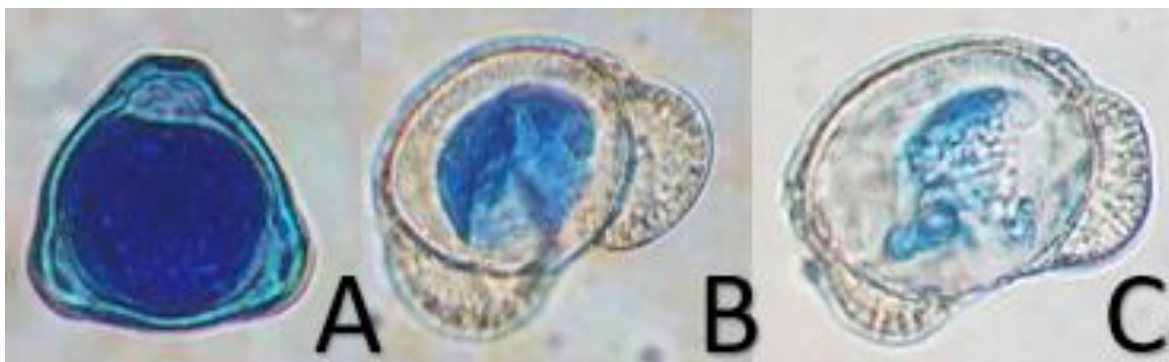


Figura 4-29. Granos de polen identificado. *Bauhinia* (A), *Pinus* (B), *Pinus* (C).

4.3 Variables Meteorológicas Consideradas en los Muestreos

Se realizaron cuatro muestreos y en cada vuelo, se tomaron datos meteorológicos considerados de importancia, debido a que anteriormente se han documentado como relevantes en la recuperación del particulado atmosférico. Se tomaron datos de temperatura, humedad relativa y presión de aire, variables meteorológicas consideradas de importancia según Weber (2003). Las medidas de estas variables se documentaron durante todo el vuelo, pero se consideraron los datos asociados al periodo de muestreo. La Tabla 4-5 documenta los promedios de cada variable por muestreo. Estos promedios fueron obtenidos de un total de 18 datos por área, excepto en el del área rural del muestreo 2, que el total fue 9, ya que el muestreo no se completó por lluvia. Las Figuras 4-30 a 4-41 presentan la comparación entre las colonias recuperadas y las variables meteorológicas consideradas por muestreo, área de muestreo y periodo del día.

Tabla 4-13. Promedio de datos de variables meteorológicas asociadas a cada muestreo.

	Área	Temperatura Promedio	Humedad Relativa Promedio	Presión de Aire Promedio
Muestreo 1	Rural	27.86°C	63.6%	1007.7hPa
	Urbana	27.93°C	66.03%	1009.78hPa
Muestreo 2	Rural	28.36°C	63.06%	999.7hPa
	Urbana	28.71°C	61.05%	998.75hPa

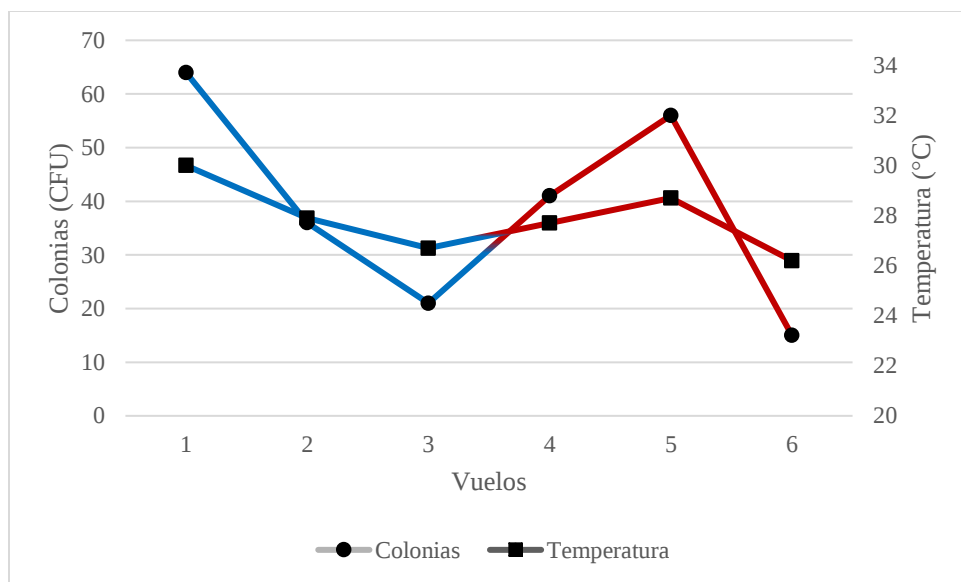


Figura 4-30. Comparación entre temperatura y colonias recuperadas durante el primer muestreo del área rural. El color azul representa los vuelos hechos durante el periodo de la mañana y el color rojo representa los vuelos hechos en la tarde.

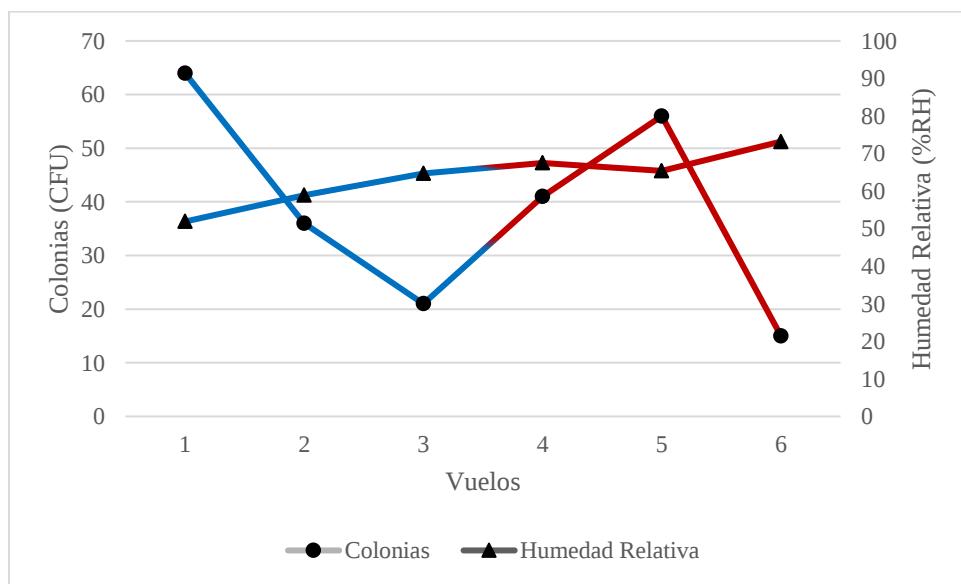


Figura 4-31. Comparación entre humedad relativa y colonias recuperadas durante el primer muestreo del área rural. El color azul representa los vuelos hechos durante el periodo de la mañana y el color rojo representa los vuelos hechos en la tarde.

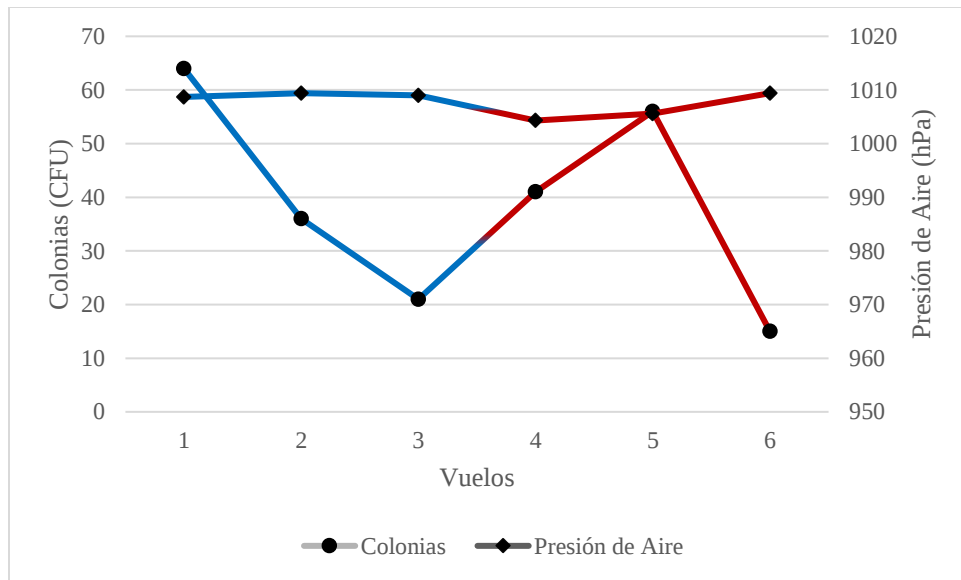


Figura 4-32. Comparación entre presión de aire y colonias recuperadas durante el primer muestreo del área rural. El color azul representa los vuelos hechos durante el periodo de la mañana y el color rojo representa los vuelos hechos en la tarde.

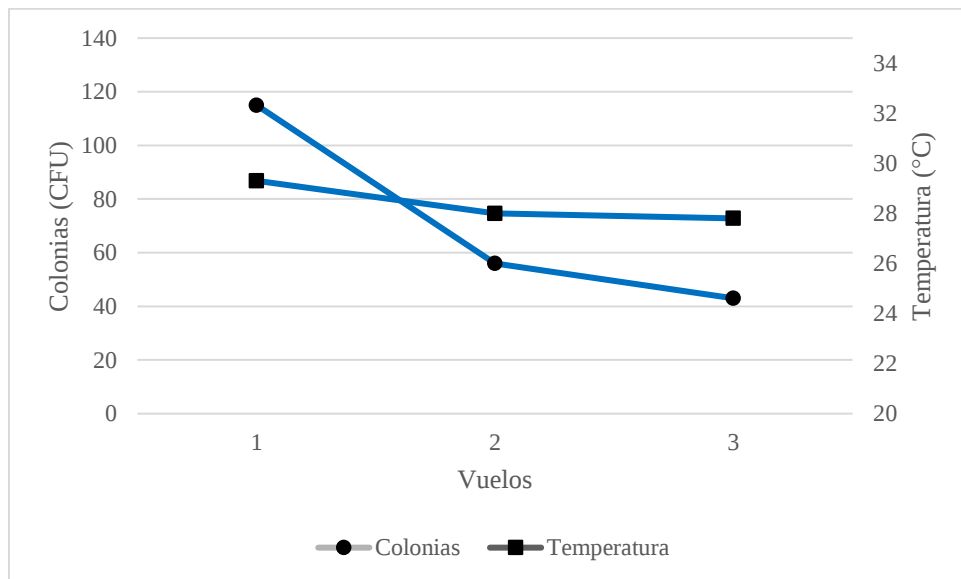


Figura 4-33. Comparación entre temperatura y colonias recuperadas durante el segundo muestreo del área rural. El color azul representa que en este muestreo sólo se hicieron vuelos en la mañana.

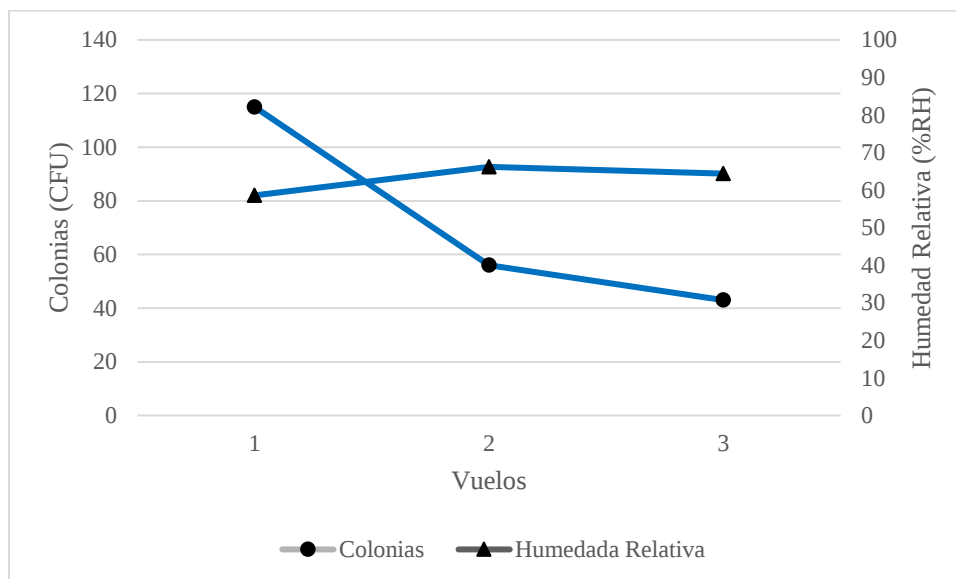


Figura 4-34. Comparación entre humedad relativa y colonias recuperadas durante el segundo muestreo del área rural. El color azul representa que en este muestreo sólo se hicieron vuelos en la mañana.

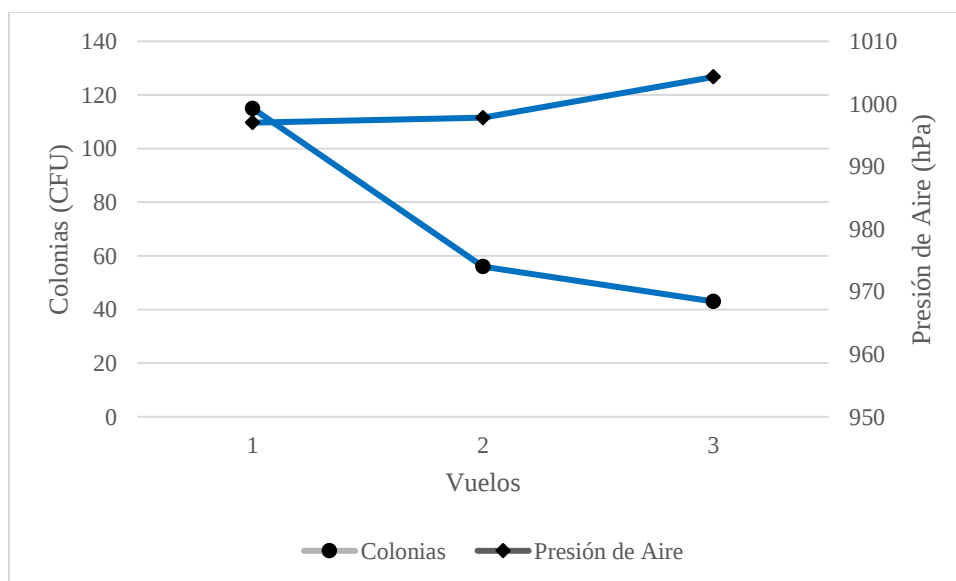


Figura 4-35. Comparación entre presión de aire y colonias recuperadas durante el segundo muestreo del área rural. El color azul representa que en este muestreo sólo se hicieron vuelos en la mañana.

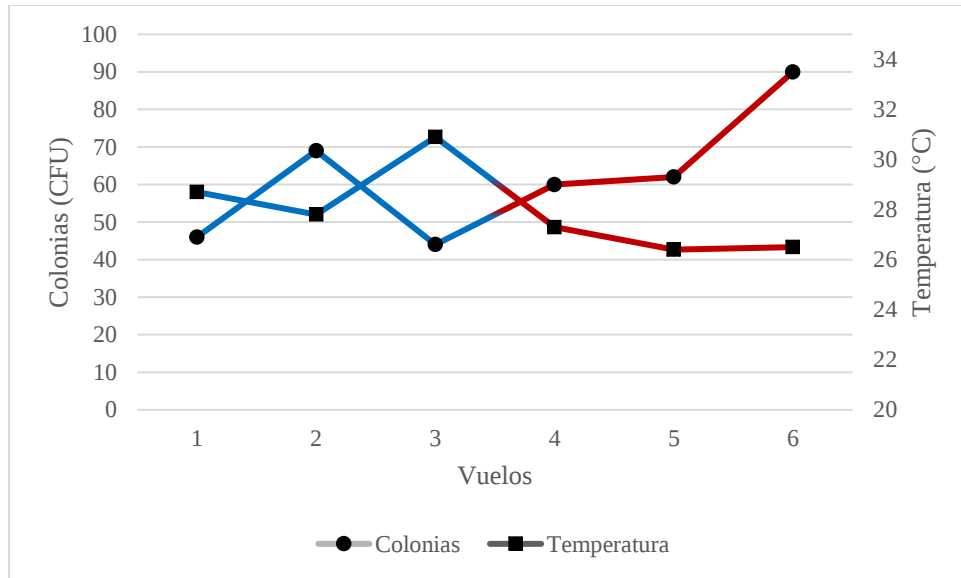


Figura 4-36. Comparación entre temperatura y colonias recuperadas durante el primer muestreo del área urbana. El color azul representa los vuelos hechos durante el periodo de la mañana y el color rojo representa los vuelos hechos en la tarde.

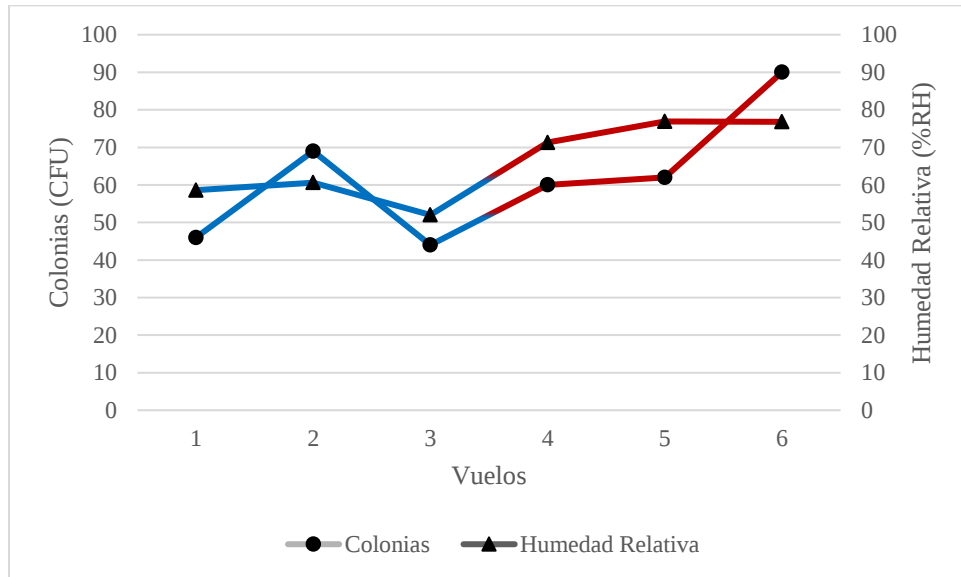


Figura 4-37. Comparación entre humedad relativa y colonias recuperadas durante el primer muestreo del área urbana. El color azul representa los vuelos hechos durante el periodo de la mañana y el color rojo representa los vuelos hechos en la tarde.

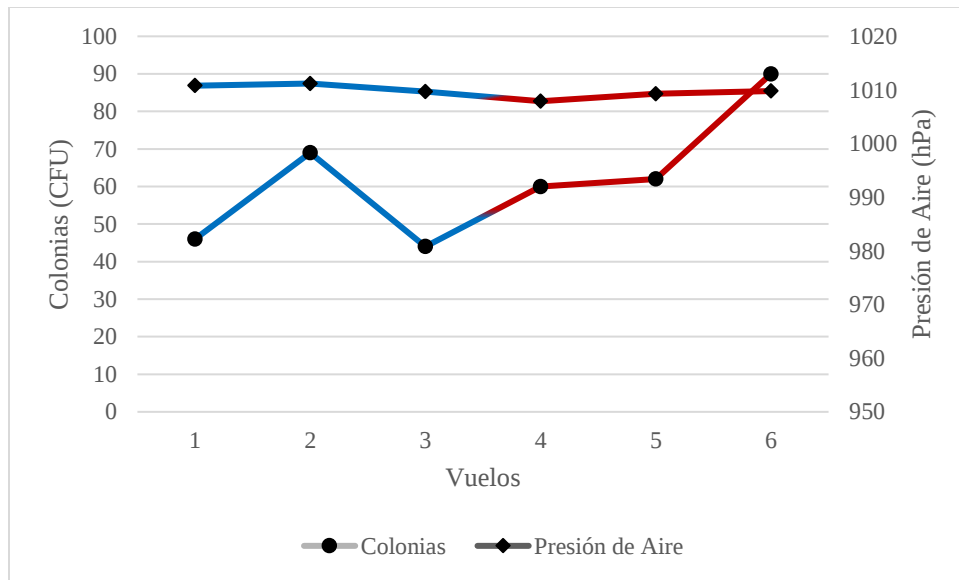


Figura 4-38. Comparación entre presión de aire y colonias recuperadas durante el primer muestreo del área urbana. El color azul representa los vuelos hechos durante el periodo de la mañana y el color rojo representa los vuelos hechos en la tarde.

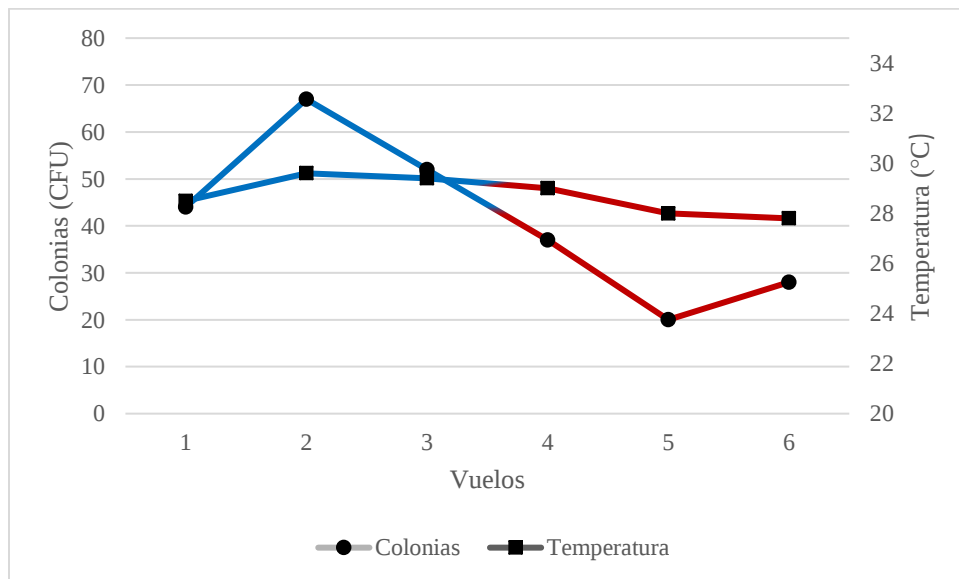


Figura 4-39. Comparación entre temperatura y colonias recuperadas durante el segundo muestreo del área urbana. El color azul representa los vuelos hechos durante el periodo de la mañana y el color rojo representa los vuelos hechos en la tarde.

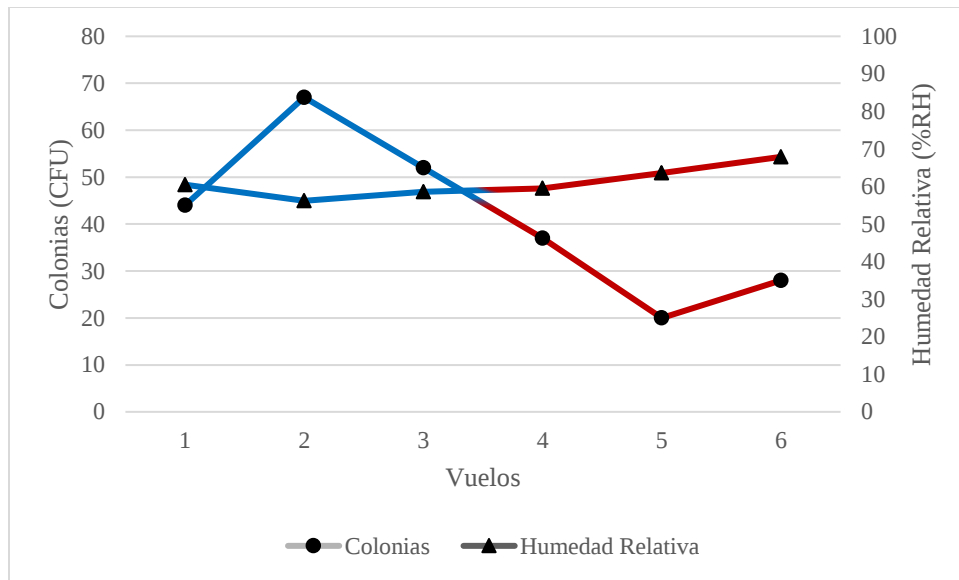


Figura 4-40. Comparación entre humedad relativa y colonias recuperadas durante el segundo muestreo del área urbana. El color azul representa los vuelos hechos durante el periodo de la mañana y el color rojo representa los vuelos hechos en la tarde.

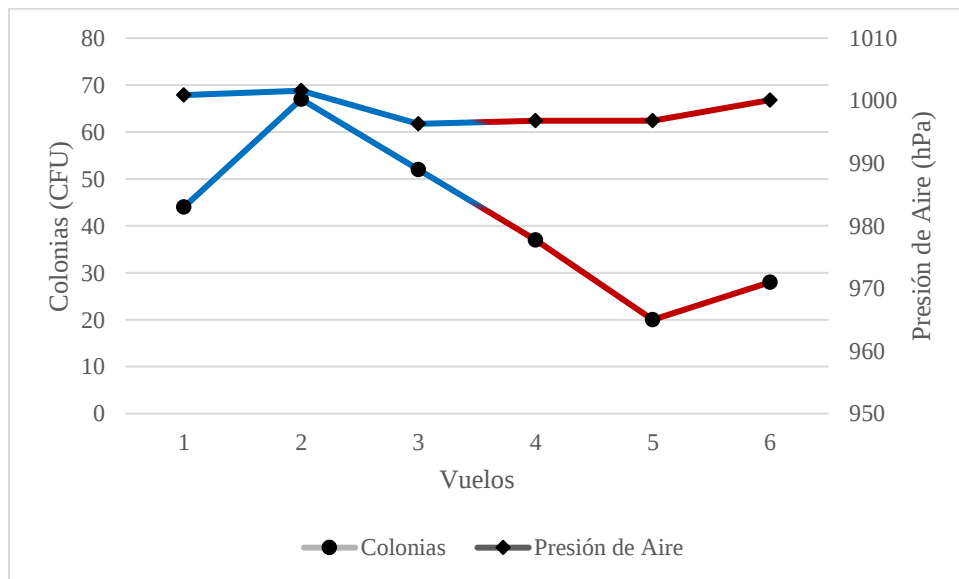


Figura 4-41. Comparación entre presión de aire y colonias recuperadas durante el segundo muestreo del área urbana. El color azul representa los vuelos hechos durante el periodo de la mañana y el color rojo representa los vuelos hechos en la tarde.

4.4 Análisis Estadístico de Muestreos

En cada área se realizaron dos muestreos que consistieron en seis vuelos cada uno. Se cuantificó el número de colonias obtenidas en cada plato y se analizaron los datos utilizando el programa de análisis estadístico *Infostat* (Di Rienzo *et al.*, 2016). La Figura 4-26 documenta, en resumen, el análisis de varianza y presenta si la diferencia en captura por área de muestreo fue significativa o no.

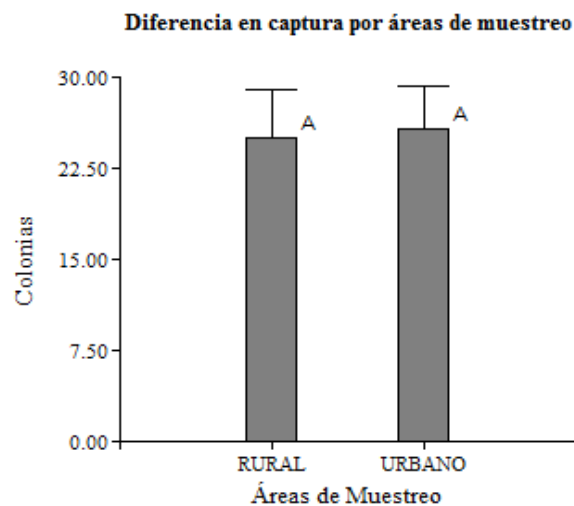


Figura 4-42. Análisis de varianza de la diferencia en captura por áreas muestreo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Tabla 4-14. Análisis de la varianza de diferencia en captura por áreas de muestreo.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	42	5.6E-04	0.00	66.44

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		6.45 1		6.45	0.02 0.8814
Columna3		6.45 1		6.45	0.02 0.8814
Error	11439.96	40	286.00		
Total	11446.40	41			

Test: LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=10.65731

Error: 285.9990 gl: 40

Columna3	Mediasn	E.E.
RURAL	25.00 18	3.99 A
URBANO	25.79 24	3.45 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

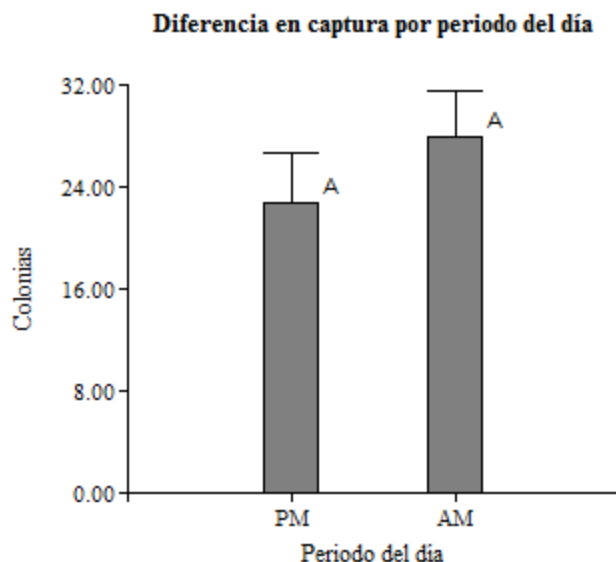


Figura 4-43. Análisis de varianza de la diferencia en captura por periodos del día. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Tabla 4-15. Análisis de la varianza de diferencia en captura por periodos del día.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Columna2	41	0.02	0.00	66.27

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		276.65		1	276.65 0.97	0.3302
Columna3		276.65		1	276.65 0.97	0.3302
Error	11096.57	39	284.53			
Total	11373.22	40				

Test: LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=10.73701

Error: 284.5274 gl: 39

Columna3	Mediasn	E.E.
PM	22.72 18	3.98 A
AM	27.96 23	3.52 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

4.5 Comparación Muestreadores

Con el objetivo de confirmar el uso del dron como método de muestreo útil, novel, seguro y confiable, se compararon los resultados de este trabajo con estudios anteriores que utilizaron aviones, *Hirst Spore Trap* o *Burkard Volumetric Spore Trap* como métodos de muestreo. Las

Tablas 4-15 y 4-16 documentan las comparaciones. En negrilla se presentan los datos pertenecientes al estudio que aquí se presenta.

Tabla 4-16. Resumen de investigaciones donde se han utilizado vehículos controlados remotamente para la recuperación de particulado atmosférico.

Autor	Tiempo de vuelos (minutos)	Cantidad de vuelos	Altura	Esporas Viables (CFU)	Esporas No Viables (CFU)	Polen
Vélez (2018)	5	21	120m	1,069	343	187
Lin <i>et al.</i> (2014)	10	180	100m	0-1,603 <i>Fusarium</i>	N/A	N/A
Techy <i>et al.</i> (2010)	16-19	6	25-45m	<i>Phytophthora infestans</i> en 4 vuelos	N/A	N/A
Techy <i>et al.</i> (2008)	16	10	25-45m	<i>P. infestans</i>	N/A	N/A
Dingus (2007)	15	67	60-100m	0-393 <i>Fusarium</i>	N/A	N/A
Maldonado (2001)	15	150	20-70m	0-281 <i>Gibberella zeae</i>	N/A	N/A

Tabla 4-17. Resumen de investigaciones que han utilizado muestreadores estacionarios para la recuperación de particulado atmosférico.

Autor	Muestreador	Altura	Esporas Viables (CFU)	Esporas No Viables (CFU)	Polen
Vélez (2018)	Dron	120m	1,069	343 54 géneros	187 17 géneros
<i>Alzate et al.</i> (2015)	<i>Hirst</i>	17m	N/A	20 tipos	42 tipos
Grinn-Gofrón & Bosiacka (2015)	<i>Hirst</i>	21m	N/A	Varios géneros	N/A
<i>Rocha et al.</i> (2013)	<i>Hirst</i>	15m	N/A	28 tipos	N/A
<i>Oliveira et al.</i> (2010)	<i>Hirst</i>	20m	N/A	Varios géneros	N/A
<i>Jato et al.</i> (2000)	<i>Hirst</i>	No Disponible	N/A	N/A	6,000 granos <i>Pinus</i>
<i>Aylor & Sutton</i> (1992)	<i>Burkard</i>	0.45m	N/A	<i>Venturia</i>	N/A

CAPÍTULO 5 -DISCUSIÓN

Al finalizar los muestreos se recuperaron en total 1,069 colonias viables (Tabla 4-1). Documenta también, que en todos los vuelos se recuperaron colonias y que el segundo muestreo del área rural no pudo ser completado por lluvia. Se identificaron 55 cultivos en 11 géneros (Tabla 4-4) siendo los más frecuentes: *Cladosporium* (0.25), *Curvularia* (0.20), *Fusarium* (0.15), *Penicillium* (0.07), *Aspergillus* (0.07) y *Nigrospora* (0.07), la mayoría de ellos recuperados del área rural, excepto *Aspergillus* y *Penicillium*, característicos de la baja atmósfera ya que han sido reportados de distintas partes del mundo (Herrero *et al.*, 1996; Oh *et al.*, 1998; Al-Suwaine *et al.*, 1999 & Aira *et al.*, 2001). Algunos de estos géneros son considerados hongos contaminantes (*Aspergillus* y *Penicillium*) y otros como patógenos de plantas (*Fusarium*, *Pestalotia* y *Colletotrichum*). Todos los géneros recuperados del muestreo viable han sido reportados en la baja atmósfera de Puerto Rico por lo que son considerados parte del particulado atmosférico de la isla.

Considerando las áreas de muestreo, algunos de los géneros identificados ya han sido reportados en estudios anteriores para las mismas localidades. Por ejemplo, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Pestalotia* y *Curvularia* habían sido reportados para el área urbana (Recinto Universitario de Mayagüez) en un estudio por Betancourt *et al.* (1980). En este estudio, el método de muestreo utilizado fue distinto al que aquí se presenta, pero en cuanto a resultados para esporas viables, los géneros identificados coinciden.

A pesar de que se recuperaron 97 morfotipos, sólo 55 pudieron ser identificados. De los 48 cultivos restantes, siete son levaduras y 41 no pudieron ser identificados por diversas razones. Ocho de estos tuvieron crecimiento, pero no presentaron estructuras de reproducción que permitan su identificación. En el caso de los 32 restantes, se han cultivado en distintos medios y en cámaras húmedas para inducir crecimiento y esporulación, pero la mayoría de ellos sólo creció bien la

primera vez que fueron cultivados. Antes del huracán María ya estos cultivos habían presentado problemas de crecimiento y esporulación, fueron cultivados en medios más específicos, pero los mismos tuvieron que ser descartados luego del huracán por lo que no se pudo determinar si eran o no cultivos viables. Luego del huracán se intentó cultivarlos nuevamente en los medios específicos, pero las condiciones del Edificio de Biología, como altas temperaturas por falta de aire acondicionado por más de ocho meses, probablemente influyeron para que los mismos no crecieran ni esporularan efectivamente.

En cuanto al particulado no viable, se identificaron 54 géneros de esporas de hongos, un grupo de 11 posibles mixomicetos, un grupo de nueve esporas pertenecientes a la familia Xylariaceae y un grupo de 18 uredosporas de royas (Figuras 4-7 a 4-22). Este particulado representa unas 87 especies o morfotipos distintos. De los 54 géneros identificados, 46 son ascomicetos, 7 basidiomicetos y uno pertenece a los oomicetos. La recuperación de mayor cantidad de ascosporas contrasta con un estudio realizado en San Juan por Quintero *et al.* (2010) donde, en ese caso, se reportó mayor cantidad de basidiomicetos. También se identificaron 17 géneros de granos de polen (Figuras 4-24 y 4-29). La Tabla 4-6 documenta el conteo de esporas de hongos y granos de polen recuperados por muestreo y por área. Las Tablas 4-7 a 4-10 documentan el particulado no viable recuperado en las laminillas adhesivas por muestreo y por área.

Entre los géneros de esporas de hongos, se han observado varias especies de un mismo género como en el caso de *Curvularia* (Figuras 4-7C, 4-9F, 4-13A, 4-13H, 4-14B, 4-14F, 4-15G y 4-21E) y *Tetraploa* (Figuras 4-7A, 4-12H y 4-21D). En la mayor parte del particulado fúngico, se recuperaron únicamente esporas. Sin embargo, también se recuperaron estructuras reproductivas completas (conidias, fiálides y/o conidióforos). Por ejemplo, *Aspergillus* (Figuras 4-9A, 4-19E) donde se observa el conidióforo completo con su vesícula, fiálides y conidias y en la

Figura 4-21B, donde se observa una posible vesícula globosa con sus fiálides y conidias adheridas. De igual forma, hay tres *Cladosporium* (Figuras 4-8G, 4-12B y 4-21G) que presentan parte del conidióforo, fiálides y conidias que permiten realizar una identificación exacta. Se identificaron entre este particulado de esporas, siete géneros no reportados en la baja atmósfera de la isla anteriormente. Estos récords nuevos incluyen *Delitschia* (Figuras 4-8C y 4-17C), *Solheimia* (Figura 4-16B), *Venturia* (Figura 4-16D), *Fusariella* (Figura 4-18G), *Polythrincium* (Figura 4-19F), *Endophragmiella* (Figura 4-20A) y *Spondylocradiella* (Figura 4-21F). Las Figuras 4-7 a 4-22, correspondientes al muestreo no viable de esporas, son representativas de los géneros identificados mas no de la cantidad de esporas presentes en las laminillas. En varias ocasiones se observaron esporas pertenecientes a los géneros ya identificados y con el mismo morfotipo por lo que sólo se incluyó una figura representativa del género. La Tabla 4-11 documenta las frecuencias de los géneros de las esporas de hongos no viables por área de muestreo y sus frecuencias totales. Entre los géneros de esporas más frecuentes se encuentran *Aspergillus/Penicillium* (0.181), *Cladosporium* (0.103), *Curvularia* (0.098), *Massarina* (0.061), *Nigrospora* (0.051) y *Agaricus* (0.051).

En cuanto a los géneros recuperados en área urbana, se encontró que *Alternaria*, *Cladosporium*, *Coprinus*, *Curvularia*, *Venturia* y *Leptosphaeria* también han sido reportados anteriormente en estudios para área urbanas, por ejemplo, Rocha *et al.* (2013), utilizaron otro método de muestreo, pero reportan los mismos géneros. Gofrón & Bosiacka (2015) también coinciden con el reporte de los géneros *Cladosporium*, *Alternaria*, *Drechslera*, *Leptosphaeria* y *Torula*.

El proceso de identificación del polen fue más complejo ya que no hay disponibles reportes de la diversidad de polen en la isla ni el Caribe. Esto dificultó su identificación, pero a la misma

vez estos datos representan el primer inventario de polen para Puerto Rico. A pesar de la dificultad para lograr la identificación de los granos de polen, se identificaron 17 géneros (Figuras 4-24 a 4-29), siendo los más frecuentes: *Cecropia* (0.436), *Morus* (0.227), *Ambrosia* (0.139) y *Pinus* (0.118). Este último se ha encontrado bajo estudio anteriormente en España y del cual se ha encontrado que puede representar hasta un 20% del nivel de polen anual en algunas ciudades (Jato *et al.*, 2000). Los géneros *Cecropia* y *Fraxinus* también han sido reportados en otros estudios como el hecho por Alzate *et al.* (2015). Esto sugiere que estos tres géneros son parte del particulado ambiental y que su presencia puede ser de importancia en nuestra atmósfera. De los 17 géneros de polen identificados, 12 pertenecen a árboles, tres a yerbajos y dos a arbustos. La Tabla 4-12 documenta las frecuencias de los géneros de polen por área de muestreo y sus frecuencias totales. Todas las plantas asociadas a los granos de polen identificados han sido reportadas en Puerto Rico.

Comparando lo recuperado en los muestreos viables *versus* los no viables, se pudo notar que en ambos se logró recuperar particulado, en el caso de los hongos, perteneciente a los mismos géneros como en el caso de *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Nigrospora*, *Leptosphaerulina* y posible *Penicillium*. Esto permite confirmar que lo reportado se obtuvo como parte de los muestreos y no por factores externos como contaminación de medios o mal manejo de material o del muestreador. Considerando las Tablas 4-1 y 4-6, en cuanto a captura, se determinó que la cantidad de particulado recuperado fue mayor en los muestreos no viables. Con el propósito de conocer si había diferencias significativas en captura por área de muestreo, se realizó un análisis de varianza y se obtuvo que la diferencia en captura promedio por área de muestreo no es significativa obteniendo un valor de p mayor de 0.05 (Figura 4-42 y Tabla 4-14). También se realizó un análisis de varianza para conocer si había diferencias significativas en captura por periodo del día, pero también se obtuvo que la diferencia no es significativa con un

valor de p mayor de 0.05 (Figura 4-43 y Tabla 4-15). Estos resultados de los análisis de varianza se deben a que la cantidad de particulado capturado no cambió drásticamente tanto por área de muestreo como por periodo del día. La Tabla 4-1 documenta la cantidad de colonias recuperadas por vuelo durante los diferentes periodos del día y por muestreo.

Las condiciones atmosféricas al momento de llevar a cabo los muestreos son un factor importante. La Figura 4-23 presenta un conglomerado de esporas en una de las laminillas del último vuelo del primer muestreo rural, en el cual hubo ráfagas de viento fuertes, las cuales hicieron que el muestreador tuviera movimientos erráticos que resultaron en la recuperación de varios conglomerados de esporas como el presentado. Por el mismo motivo de condiciones atmosféricas adversas, los vuelos de la tarde del segundo muestreo de esa área no pudieron llevarse a cabo debido a lluvias y fuertes vientos. Esto permitió observar cuán importantes son las condiciones atmosféricas al momento de muestrear. En la Tabla 4-13 se documentan los datos en promedio de las variables atmosféricas como temperatura, humedad relativa y presión de aire para los muestreos. Se observa que, en ambos muestreos del área urbana, las tres variables presentaron valores más altos que para el área rural.

Weber (2003) menciona que mientras más alta la temperatura, mayor humedad y mayor presión de aire, se espera un aumento, particularmente, en la presencia de esporas de hongos. Con el propósito de conocer cómo las variables meteorológicas (temperatura, humedad relativa y presión de aire) influyeron en la captura de colonias, se realizaron unas gráficas comparativas. Las Figuras 4-30 a 4-41 documentan la comparación entre las tres variables y las colonias recuperadas por muestreo por periodos del día. Considerando estas gráficas se obtuvo que, para ambos muestreos del área rural y el segundo muestreo del área urbana, la tendencia fue que mientras la temperatura aumentaba, la cantidad de colonias recuperadas también aumentaba. En el primer

muestreo del área urbana, el caso fue, al contrario, mientras la temperatura disminuía, la cantidad de colonias recuperadas aumentó. En el caso de la humedad relativa, si esta aumentaba, la cantidad de colonias recuperadas disminuía y si la humedad relativa disminuía, la recuperación de esporas aumentaba. Para el primer muestreo del área urbana si la humedad relativa aumentaba, también aumentaban las colonias recuperadas. Por último, para la variable de presión de aire, ambos muestreos del área rural mostraron que, si la presión de aire aumentaba, la cantidad de colonias recuperadas disminuía, mientras que los muestreos del área urbana mostraron que, si la presión de aire aumentaba, también aumentaba la cantidad de colonias recuperadas. Los resultados obtenidos coinciden con lo mencionado por Weber (2003) sólo para temperatura y para presión de aire en el caso de los muestreos del área urbana. No coincide con la variable de humedad relativa ya que se demostró que mientras aumenta la humedad, la cantidad de colonias recuperadas disminuye y no coincide para la variable de presión de aire en el caso del muestreo del área rural, donde se demuestra que, si hay aumento en presión de aire, la cantidad de colonias disminuye. Estos resultados no fueron afectados por la presencia de polvos del desierto de Sahara pues para los días de muestreo no se reportó la presencia de los mismos.

Finalmente, con el objetivo de confirmar que el dron es un método de muestreo útil, novel, seguro y confiable, se compararon los resultados obtenidos utilizando el dron con estudios que utilizaron aviones u otros métodos de muestreo como *Hirst Spore Trap* o *Burkard Volumetric Spore Trap*. La Tabla 4-16 documenta un resumen de los resultados obtenidos con el dron como método de muestreo y de otras investigaciones estudios que han utilizado aviones. En esta comparación, el tiempo de los vuelos resulta ser de importancia pues los vuelos con el dron fueron de 5 minutos mientras que, los vuelos hechos en los otros estudios el tiempo varía entre 10 y 19 minutos. Es un rango amplio de tiempo, pero, sin embargo, a pesar de que con el dron fue poco

tiempo, se recuperó más particulado viable que en los otros estudios. El único método en el cual se recuperó particulado viable y no viable (esporas de hongo y polen) fue con el dron. Se comparó también la altura a la cual se hicieron los muestreos, con el dron fue 120m, mientras que, en los estudios restantes, la altura fluctuó entre 20m y 100m, siendo la del dron la altura más alta alcanzada para muestrear. La cantidad de vuelos realizados también se tomó en consideración. Con el dron se hicieron 21 vuelos y en los otros estudios la cantidad de vuelos fue entre 6 y 180. A pesar de que en algunos estudios la cantidad de vuelos fue mayor que con el dron, con este último hubo mayor recuperación de esporas viables.

Los aviones no son el único método de muestreo que se utilizó para comparar resultados. La Tabla 4-17 documenta un resumen de resultados del dron como método de muestreo y de otras investigaciones que utilizaron *Hirst Spore Trap* o *Burkard Volumetric Spore Trap*. En esta comparación no se consideró, como con los aviones, el tiempo de muestreo ni cantidad de vuelos, se consideró sólo la altura del muestreador y la recuperación del particulado, tanto viable como no viable. En cuanto a altura, el dron estuvo a una altura de 120m, mientras que los otros muestreadores estuvieron colocados a una altura que fluctuó entre 0.45m a 21m sobre el nivel del suelo. Ninguno de los métodos de muestreo capturó esporas viables y sólo dos capturaron granos de polen. Aunque, excepto Jato *et al.* (2000), todos capturaron esporas de hongos no viables, con el dron se recuperó mayor cantidad y diversidad o tipos de esporas. Al lograr capturar particulado viable y no viable en vuelos cortos y una altura mayor a las presentadas, se demuestra y confirma que es un método de muestreo útil para capturar esporas en la baja atmósfera, que es seguro y confiable para ser utilizado para trabajos posteriores.

CAPÍTULO 6 -CONCLUSIÓN

Esta investigación permitió confirmar el uso de drones no comerciales como herramienta útil y confiable para la captura de polen y esporas de hongos viables y no viables en la baja atmósfera y en áreas con actividad antropogénica distinta. En los muestreos para esporas de hongos viables se capturaron 1,069 colonias de las cuales se lograron aislar cultivos pertenecientes a los géneros *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Nigrospora*, *Pestalotia*, *Rhizopus*, *Colletotrichum*, *Paecilomyces* and *Leptosphaerulina*. En los muestreos para esporas de hongos no viables y polen se capturaron 332 esporas de hongos y 187 granos de polen. Se logró identificar 54 géneros de hongos distintos y 17 géneros de polen. Entre los géneros de hongos se identificaron *Delitschia*, *Solheimia*, *Venturia*, *Fusariella*, *Polythrincium*, *Endophragmiella* y *Spondylocyadiella* los cuales no han sido reportado anteriormente en la baja atmósfera de la isla. Al no tener disponible una clave o guía de polen en Puerto Rico, estos resultados representan el primer inventario de granos de polen en la isla. Las esporas identificadas también pueden ser utilizadas como la primera guía del particulado fúngico presente en nuestra baja atmósfera.

Se determinó que la mayor diversidad de hongos viables fue recuperada de los muestreos del área rural y se encontró que en ambos muestreos, viables y no viables, se recuperó particulado perteneciente a los mismos géneros. Las condiciones atmosféricas presentes al momento de los muestreos, como altas temperaturas, alta humedad relativa y presión atmosférica fueron de influencia en la captura del particulado.

Cumpliendo con el objetivo principal de este estudio, se demuestra que el dron es una herramienta útil para estudios aerobiológicos. Esto ya que con los mismos se logró detectar patrones de cantidades de esporas de hongos de especies distintas bajo condiciones ambientales diferentes. Se demuestra, también, ya que permite capturar y, posteriormente, analizar particulado

no viable en los mismos vuelos que capturan particulado viable, lo que permite tener información completa del particulado presente en la baja atmósfera. Esto permite considerar el dron como una herramienta útil y efectiva con gran potencial para su desarrollo y llevarla a un nivel más avanzado e incluso, para que pueda ser utilizada en muestreos de ambientes interiores, como edificios enfermos con techos altos o lugares de difícil acceso para una persona.

CAPÍTULO 7 -RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un estudio más inclusivo y/o regionalizado sobre la diversidad de granos de polen en la isla, que amplíen los registros que se proveen en este trabajo. Existen claves taxonómicas de otros países y/o regiones, pero al momento no se conoce que haya para el Caribe ni Puerto Rico (Com. personal Ramírez-Domenech; Dr. Carlos Muñoz; Bárbara Sánchez), por lo que sería ideal tener una de la región del Caribe y/o Puerto Rico para lograr hacer una clasificación completa y exacta del particulado presente en la isla.

Los resultados obtenidos en esta investigación podrían validarse ampliando el número de muestras, los lugares de muestreo y la frecuencia de muestreos. También sería interesante llevar a cabo este tipo de investigación durante horas de la noche y posiblemente sobre cuerpos de agua como lagos y el océano, para compararlos con los datos que se presentan en este trabajo.

REFERENCIAS

- Abler, S. 2003. Ecology and taxonomy of *Leptosphaerulina* spp. associated with turfgrasses in the United States. Master of Science Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University. 64pp.
- Aira, M., Dopazo, A. & Jato, M. 2001. Aerobiological monitoring of Cupressaceae pollen in Santiago de Compostela (NW Iberian Peninsula) over six years. *Aerobiologia*. 17:319-325.
- Almaguer-Chávez, M., Aira, M., Rojas, T., Fernández-González, M. & Rodríguez-Rajo, F. 2018. New findings of airborne fungal spores in the atmosphere of Havana, Cuba, using aerobiological non-viable methodology. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 25(2): 349-359.
- Al-Suwaine, A., Hasnain, S. & Bahkali, A. 1999. Viable fungi in Riyadh, Saudi Arabia. *Aerobiologia*. 15:121-130.
- Alzate, F., Quijano, M., Álvarez, A. & Fonnegra, R. 2015. Atmospheric and spore content in the urban area of the city of Medellin, Colombia. *Hoehnea*. 42: 9-19.
- Andersen, A.A. 1958. New sampler for the collection, sizing and enumeration of viable airborne particles. *Journal of Bacteriology*, 76: 471-484.
- Aylor, D. & Sutton, T. 1992. Release of *Venturia inaequalis* ascospores during unsteady rain: relationship to spore transport and deposition. *Phytopathology*. 82: 532-540.
- Barreda, V., Encinas, A. & Hinojosa, L. 2011. Polen y esporas de la Formación Navidad, Neógeno de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*. 84:341-355.
- Barnett, H. L. & Hunter, B. 1989. Illustrated genera of imperfect fungi, fourth edition. St. Paul, Minn.: APS Press. 218p.
- Baxter, D. 2009. Air-O-Cell[®] Bioaerosol sampling cassette laboratory & user manual. Zefon International Inc. 12pp.
- Betancourt, C., Acevedo, C.R. & Busquets, J. 1980. Reconocimiento de los hongos presentes en la atmósfera de Mayagüez, Puerto Rico. *Carib J Sci*. 15(3-4): 133-137.
- Bucher, E. & Kofler, V. 2004. Pollen Atlas. Biological Laboratory of the State Agency for the Environment, Bolzano. Disponible en línea a través de:
<https://www.pollenwarndienst.at/en/aerobiology/pollen-atlas.html>
- Burge, H. 2002. An update on pollen and fungal spore aerobiology. *J Allergy Clin Immunol*. 110:544-552.

- CABI_Biosciences. 2018. Index Fungorum. Retrieved from <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>
- Cantrell, S.A., Lodge, D.J., Minter, D.W. & Ortíz Santana, B. 2006. Fungi of Puerto Rico. www.cybertruffle.org.uk/puerfung
- Chanagá, X., Plácido, J., Marín, M. & Yepes, M. 2012. Hongos nativos con potencial degradador de tintes industriales en el Valle de Aburrá, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 65:6817-6827.
- Consentino, S. & Palmas, F. 1991. Assessment of airborne fungal spores in different industrial working environments and their importance as health hazards to workers. *Environmental Monitoring and Assessment*. 16: 127-136.
- Cugny, C., Mazier, F. & Galop, D. 2010. Modern and fossil non-pollen palynomorphs from the Basque mountains (western Pyrenees, France): the use of coprophilous fungi to reconstruct pastoral activity. *Vegetation History and Archaeobotany*. 19:391-408.
- Demske, D., Tarasov, P., Nakagawa, T. & Suigetsu 2006 Project Members. 2013. Atlas of pollen, spores and further non-pollen palynomorphs recorded in the glacial-interglacial late Quaternary sediments of Lake Suigetsu, central Japan. *Quaternary International*. 290-291:164-238.
- Dingus, B. 2007. Development of an autonomous unmanned aerial vehicle for aerobiological sampling. Master of Science in Mechanical Engineering Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University. 57pp.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Federal Aviation Administration. The rule for operating an unmanned aircraft depend on why you want to fly. 07/13/2017. Disponible en línea a través de: www.faa.gov/uas/getting_started/
- Galán, C. & Alcázar, P. 2002. Red Española de Aerobiología. Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal de la Universidad de Córdoba, España. Disponible en línea a través de: <https://www.uco.es/rea/index.htm>
- Gann, G.D., Trejo-Torres, J.C. & Stocking, C.G. 2015-2018. Plantas de la isla de Puerto Rico/Plants of the island of Puerto Rico. The Institute of Regional Conservation. Delray Beach, Florida, USA.
- Gelorini, V., Verbeken, A., van Geel, B., Cocquyt, C. & Verschuren, D. 2011. Modern non-pollen palynomorphs from east African lake sediments. *Review of Paleobotany and Palynology*. 164: 143-173.

- González, F., Castro, M., Narayan, P., Walker, R. & Zeller, L. 2011. Development of an autonomous unmanned aerial system to collect time-stamped samples from the atmosphere and localize potential pathogen sources. *Journal of Field Robotics* 28: 961-976.
- Gottwald, T. & Tedders, L. 1985. A spore and pollen trap for use on aerial remotely piloted vehicles. *Phytopathology*. 75: 801-807.
- Grant Smith, E. 2000. Sampling and identifying allergenic pollens and molds. Blewstone Press. 196p.
- Gravesen, S. 1979. Fungi as a cause of allergic disease. *Allergy*. 34: 135-154.
- Grenzdörffer, G., Engel, A. & Teichert, B. 2008. The photogrammetric potential of low-cost UAV's in forestry and agriculture. *The International archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences*. 37: 1207-1213.
- Grinn-Gofrón, A. & Bosiacka, B. 2015. Effects of meteorological factors on the composition of selected fungal spores in the air. *Aerobiologia*. 31: 63-72.
- Hardy Diagnostics. 1996. Rose Bengal agar with chloramphenicol. Instructions for use. Disponible en línea a través de:
https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/content/hugo/rosebengalagarwchloram.htm
- Hawksworth, D. & Wiltshire, P. 2015. Forensic mycology: current perspectives. *Dovepress*. 5: 75-83.
- Herrero, B., Fombella-Blanco, M., Fernández-González, D. & Valencia-Barrera, R. 1996. Aerobiological study of fungal spores from Palencia (Spain). *Aerobiologia*. 12:27-35.
- Hirst. J.M. 1952. An automatic volumetric spore trap. *Annals of Applied Biology*. 39: 259-265.
- Hoog, G., Guarro, J., Gené, J. & Figueras, M. 2000. Atlas of clinical fungi. Central bureau voor Schimmelcultures Utrecht, The Netherlands/ Universitat Rovira I Virgili Reus, Spain. 1126pp.
- Jato, M., Rodríguez, F. & Seijo, M. 2000. *Pinus* pollen in the atmosphere of Vigo and its relationship to meteorological factors. *Int J Biometeorol*. 43:147-153.
- Kapp, R. 1969. How to know pollen and spores. WM. C. Brown Company Publishers. 231pp.
- Kellogg, C. & Griffin, D. 2006. Aerobiology and the global transport of desert dust. *TRENDS in Ecology and Evolution*. 21:638-644.
- Klich, M. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Amer. Society for Microbiology. 116pp.

- Lacey, J. & Crook, B. 1988. Fungal and actinomycete spores as pollutants of the work place and occupational allergens. *Ann Occup Hyg.* 32: 515-533.
- Lacey, M. & West, J. 2006. *The Air Spora: A manual for catching and identifying airborne biological particles.* Dordrecht, The Netherlands. Springer. 156p.
- Lin, B., Ross, S.D., Prussin II, A.J., Schmale III, D.G. 2014. Seasonal associations and atmospheric transport distances of fungi in the genus *Fusarium* collected with unmanned aerial vehicles and ground-based sampling devices. *Atmo. Environ.* 94: 385-391
- Maldonado-Ramírez, S.L. 2001 Aerobiology of the wheat scab fungus, *Gibberella zeae*: discharge, atmospheric dispersal, and deposition of ascospores. Doctor of Philosophy Thesis, Cornell University. 80pp.
- Munsell Soil Color Chart. 2000. Munsell Color Company. 50pp.
- Nitíu, D., Mallo, A., Gardella, M. & Morbelli, M. 2010. Contribución a la identificación de esporas del Reino Fungi en la atmósfera de La Plata, Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 45:301-308.
- Oh, J.W., Lee, H.B., Lee, H.R., Pyun, B.Y., Ahn, Y.M., Kim, K.E., Lee, S.Y. & Lee, S. 1998. Aerobiological study of pollen and mold in Seoul, Korea. *Allergology International.* 47:263-270.
- Oliveira, M., Ribeiro, H., Delgado, L., Fonseca, J. Castel-Branco, M. & Abreu, I. 2010. Outdoor allergenic fungal spores: comparison between an urban and a rural area in Northern Portugal. *J Investig Allergol Clim Immunol* 20: 117-128.
- Ottow, J. C. G. 1972. Rose Bengal as a selective aid in the isolation of fungi and actinomycetes from natural sources. *Mycologia.* 64:304-315.
- Quintero, E., Rivera, F. & Bolaños, B. 2010. Analysis of environmental factors and their effects on fungal spores in the atmosphere of a tropical urban area (San Juan, Puerto Rico). *Aerobiologia.* 26:113-124.
- Pitt, J. 1985. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Research. 184pp
- Rivera-Jiménez, H.J. & Maldonado, S.L. 2012. Characterization of pollen from the low atmosphere in the North area of Puerto Rico. XIII Symposium of Mycology, Center for Education and Research in Biotechnology, Pontifical Catholic University of Puerto Rico (PUCPR) at Ponce, PR-Poster.
- Rocha, A., Alvarado, M., Gutiérrez, R., Salcedo, S. & Moreno, S. 2013. Variación temporal de esporas de *Alternaria*, *Cladosporium*, *Coprinus*, *Curvularia* y *Venturia* en el aire del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29: 155-165.

- Schmale III, D., Leslie, J., Zeller, K., Saleh, A., Shields, E. & Bergstrom, G. 2006. Genetic structure of atmospheric populations of *Gibberella zeae*. *Phytopathology*. 96:1021-1026.
- Shumilovskikh, L., Schlütz, F., Achterberg, I., Bauerochse, A. & Hubert, H. 2015. Non-pollen palynomorphs from mid-holocene peat of the raised bog Borsteler Moor (Lower Saxony, Germany), *Studia Quaternaria*. 32:5-18.
- Techy, L., Schmale III, D.G., Woolsey, C.A. 2008. Path planning for efficient UAV coordination in aerobiological sampling missions. 47th IEEE Conference on Decision and Control. 2814-2819.
- Techy, L., Schmale III, D. & Woolsey, C. 2010. Coordinated aerobiological sampling of a plant pathogen in the lower atmosphere using two autonomous unmanned aerial vehicles. *Journal of Field Robotics*. 27: 335-343.
- Uchida, J. 2007. Widely prevalent fungi of the United States. Center for Invasive Species and Ecosystem Health. University of Georgia.
- van Geel, B, Gelorini, V, Lyaruu, A., Aptroot, A., Rucina, S., Marchant, R., Sinninghe, J. & Verschuren, D. 2011. Diversity and ecology of tropical African fungal spores from a 25,000-year palaeoenvironmental record in southeastern Kenya. *Review of Palaeobotany and Palynology*. 164:174-190.
- Villa, T., González, F., Miljievic, B., Ristovski, Z. & Morawska, L. 2016. An overview of small unmanned aerial vehicles for air quality measurements: present applications and future perspectives. *Sensors*. 16: 1-29.
- Wang, L., Patel, V., Woolsey, C. Hovakimyan, N. & Schmale, D. 2007. $\mathcal{L}_1$ Adaptive control of UAV for aerobiological sampling. *Proceedings of the 2007 American Control Conference*. IEEE. 4660-4665.
- Wang, L., Zhou, W. & Zhao, S. 2013. Application of mini-UAV in emergency rescue of major accidents of hazardous chemicals. *International Conference on Remote Sensing, Environment and Transportation Engineering*. Atlantis Press. 152-155.
- Watanabe, T. 2002. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. Boca Raton, Florida. CRC Press. 486pp.
- Watts, A., Ambrosia, V. & Hinkley, E. 2012. Unmanned aircraft systems in remote sensing and scientific research: Classification and Considerations of Use. *Remote Sens*. 4: 1671-1692.
- Weber, R. 2003. Meteorologic variables in aerobiology. *Immuno Allergy Clin N Am*. 23:411-422.

- West, J., Jedryczka, M., Leech, P., Dakowska, S., Huang, Y., Steed, J. & Fitt, B. 2002. Biology of *Leptosphaeria maculans* ascospore release in England and Poland. IOBC/wprs Bulletin. 25: 21-29.
- West, J. & Kimber, R. 2015. Innovations in air sampling to detect plant pathogens. Ann Appl Biol. 166: 4-17.
- Willard, D. Bernhardt, C., Weimer L., Cooper, S. Gamez, D. & Jensen, J. 2004. Atlas of pollen and spores of the Florida Everglades. Palinology. 28(1): 175-227.
- Zamora, N., Medeanic, S. & Correa, I.C.S. 2008. Preliminary study of pollen and spores from the surface sediment in Platanares river and adjacent regions, Costa Rica. Gravel. 6:47-54.
- Zimmermann, B., Tkalčec, Z., Mešić, A. & Kohler, A. 2015 Characterizing aeroallergens by infrared spectroscopy of fungal spores and pollen. PLoS ONE 10: 0124240.

APÉNDICES

Apéndice 1. Medios de cultivo utilizados

Potato Dextrose Agar (PDA):

39.0g de medio

1000mL Agua destilada

Homogenizar y esterilizar en autoclave 15lbs de presión (121°C) por 15 minutos.

Malt Extract Agar (MEA):

33.6g de medio

1000mL Agua destilada

Homogenizar y esterilizar en autoclave 15lbs de presión (121°C) por 15 minutos.

Corn Meal Agar (CMA):

17.0g de medio

1000mL Agua destilada

Homogenizar y esterilizar en autoclave 15lbs de presión (118-121°C) por 15 minutos.

Water Agar (WA)

18.0g Agar

1.0L Agua destilada

V8

10.0g Peptona

11.0g Agar

400.0mL jugo V8 de vegetales

Completar los 1000mL con agua destilada

Cloranfenicol como suplemento

Añadir 1.0mL por cada 100mL de medio

Medios para *Aspergillus*

Solución *Czapek* con trazas de metales:

30.0g NaNO₃

5.0g KCl

5.0g MgSO₄ • 7H₂O

0.1g FeSO₄ • 7H₂O

0.1g ZnSO₄ • 7H₂O

0.05g CuSO₄ • 5H₂O

100mL Agua destilada

Czapek Yeast Agar con 20% de sacarosa (CY20S):

1.0g K₂HPO₄
10mL Solución *Czapek*
5.0g Extracto de levadura en polvo
200.0g Sacarosa
15.0g Agar
1.0L Agua destilada

Czapek Dox Agar:

10.0mL Solución *Czapek*
1.0g K₂HPO₄
30.0g Sacarosa
17.5g Agar
1.0L Agua destilada

Czapek Yeast Agar (CYA25, CYA37):

1.0g K₂HPO₄
10.0mL Solución *Czapek*
5.0g Extracto de levadura en polvo
30.0g Sacarosa
15.0g Agar
1.0L Agua destilada

Malt Extract Agar (MEA):

20.0g Extracto de malta en polvo
1.0g Peptona
20.0g Glucosa
20.0g Agar
1.0L Agua destilada

PDA Homemade

15.0g papa hervida en 500mL de agua destilada
7.0g Dextrosa
7.5g Agar
Completar a 500mL con agua destilada

Medios para *Penicillium*

Solución *Czapek*

30.0g NaNO₃
5.0g KCl
5.0g MgSO₄ • 7H₂O
5.0g FeSO₄ • 7H₂O
100mL agua destilada

Czapek Yeast Agar (CYA)

1.0g K_2HPO_4
10mL Solución *Czapek*
5.0 Extracto de levadura en polvo
30.0g Sacarosa
15.0g Agar
1.0L Agua destilada

Malt Extract Agar (MEA)

20.0g Extracto de malta en polvo
1.0g Peptona
20.0g Glucosa
20.0g Agar
1.0L Agua destilada

25% Glycerol Nitrate Agar (G25N)

0.75g K_2HPO_4
7.5mL Solución *Czapek*
3.7g Extracto de levadura
250.0g Glicerol
12.0g Agar
750mL Agua destilada

Suspensión de esporas para medios de *Aspergillus* y *Penicillium*

Alícuotas de 1mL:

Agar al 0.2%

Tween 80 al 0.05%

Se añaden 2μL en tres puntos equidistantes del medio de cultivo utilizando una micropipeta.

Apéndice 2. Caracterización de especies utilizando medios específicos para *Aspergillus*

Según Klich (2002).

Características macroscópicas- *Aspergillus fumigatus*

	CYA 25	MEA	CYA 37	CY20S	CZ
Diámetro	70	70	70	70	70
Colores					
Conidias	Gris	Verde grisáceo	Gris	Gris	Gris
Micelio	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
Exudado	Sí	Sí	No	No	Sí
Reverso	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
Pigmento soluble	No	Amarillo	No	No	Amarillo
Cleistotecio/esclerocio	No	No	No	No	No

Características Microscópicas

Estipo: Largo: 163.00µm
 Ancho: entre 5-6µm
 Textura de superficie: lisa

Vesícula: Diámetro: 13 x 11µm y 17 x 14µm
 Forma: forma de espátula

Seriación: **Uniseriado**/Biseriado

Conidias: Largo: 2.7µm
 Forma: circulares a elipsoidales
 Textura de superficie: lisa

Cleistotecio/Esclerocio: Diámetro: N/A
 Forma: N/A
 Color: N/A
 Células superficiales- hifa/parénquima

Ascosporas: Días de maduración: N/A
 Largo: N/A
 Ancho: N/A
 Textura de superficie: N/A
 Surcos/Bordes: N/A

Características macroscópicas- *Aspergillus japonicus*

	CYA 25	MEA	CYA 37	CY20S	CZ
Diámetro	70	29 x 32	11 x 11	70	34 x 47
Colores					
Conidias	Negras	Negras	N/A	Negras	Negras
Micelio	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
Exudado	No	No	No	No	No
Reverso	Blanco	Amarillo pálido	Blanco	Blanco	Blanco
Pigmento soluble	No	No	No	No	No
Cleistotecio/esclerocio	No	No	No	No	No

Características Microscópicas

Estipo: Largo: 231.00µm

 Ancho: entre 5-7µm

 Textura de superficie: lisa

Vesícula: Diámetro: 14 x 16µm y 21 x 22µm

 Forma: forma de espátula

Seriación: **Uniseriado**/Biseriado

Conidias: Largo: 3.7µm

 Forma: circulares a elipsoidales

 Textura de superficie: lisa

Cleistotecio/Esclerocio: Diámetro: N/A

 Forma: N/A

 Color: N/A

 Células superficiales- hifa/parénquima

Ascosporas: Días de maduración: N/A

 Largo: N/A

 Ancho: N/A

 Textura de superficie: N/A

 Surcos/Bordes: N/A

Apéndice 3. Caracterización de especies utilizando medios específicos para *Penicillium*

Según Pitt (1985)

Penicillium corylophilum

Características Macroscópicas:

CYA: 20mm Diam. Color blanco, aterciopelado, arrugado.

Reverso: amarillo pálido.

MEA: 25mm Diam. Color verde oliva y grisáceo, polvoriento, plano.

Reverso: amarillo pálido.

G25N: 20mm Diam. Color blanco, aterciopelado con pliegues.

Reverso: amarillo pálido.

5°C: No hubo crecimiento.

37°C: No hubo crecimiento

Características Microscópicas:

Conidióforos: 100µm, liso

Nivel de ramificación: Biverticilado- Furcatum

Métula: Entre 10- 12µm, lisa

Fiálides: 6µm, lisos

Conidias: 2µm, lisas

Penicillium implicatum

Características Macroscópicas:

CYA: 20mm Diam. Color blanco con líneas amarillas, convexo, aterciopelado con pliegues, exudado marrón.

Reverso: marrón rojizo, pigmento soluble marrón.

MEA: 18mm Diam. Color verde oliva oscuro y extremos amarillo pálido, polvoriento, plano.

Reverso: amarillo pálido.

G25N: 20mm Diam. Color blanco, aterciopelado, algodonoso, plano con pliegues.

Reverso: marrón claro, pliegues.

5°C: No hubo crecimiento.

37°C: 4mm Diam. Color amarillo pálido, levaduriforme.

Características Microscópicas:

Conidióforos: 120µm, liso

Nivel de ramificación: Monoverticilado- Vesiculado

Métula: Entre 7µm, lisa

Fiálides: 6µm, lisos

Conidias: 2µm, lisas