

Introducción

JORDINA BELMONTE SOLER

JOAN M. ROURE NOLLA

Unitat de Botànica

Universitat Autònoma de Barcelona

El término Aerobiología, acuñado por Meier en los años 30, fue plenamente adoptado para referirse a la disciplina que se ocupa del estudio de los organismos vivos aerotransportados, su diversidad, modos de vida, dependencia y, al mismo tiempo, repercusión en el entorno. Se ha definido la aerobiología como la ecología de la atmósfera¹. A pesar de que ya en 1873 Blackley realizó estudios en este sentido², no es hasta el siglo XX, en la década de los años 40, que, con la celebración del *Symposium on extramural and intramural aerobiology*³, esta disciplina empieza con fuerza.

Entre las numerosas áreas científicas que implica la aerobiología, están la Botánica, puesto que los vegetales forman pólenes y esporas que liberan a la atmósfera, y la Medicina, debido a que una proporción notable de estos pólenes y esporas interfiere con la salud de las personas.

EL POLEN

Los granos de polen son las células sexuales masculinas de las plantas con flores. Se forman en el interior de los estambres y, una vez maduros, son liberados. Su función biológica es alcanzar la parte femenina de una flor de su misma especie y hacer posible la fecundación de la ovocélula. En algunas especies (plantas autógamas) el polen puede realizar su función en la misma flor o en la misma planta que lo ha formado, pero en la inmensa mayoría de las especies (plantas alógamas) el polen sólo resulta viable si alcanza una ovocélula de otra planta de su misma especie. El traslado del polen desde el órgano donde se ha formado hasta la parte femenina de la flor se conoce con el nombre de polinización y puede efectuarse de maneras diversas, que son características para cada especie. En nuestras latitudes, los casos más frecuentes de polinización son por anemofilia, con el viento como medio de arrastre y diseminación de los granos de polen, y por entomofilia, cuando la polinización corre a cargo de insectos (abejas, mariposas, escarabajos, etc).

El proceso de la polinización requiere que los pólenes sean células especialmente resistentes, ya que se ven sometidos a condiciones ambientales adversas que podrían provocar el colapso y desecación de los componentes celulares, alterándolos y haciendo el polen inviable. Como adaptación a ello, los pólenes están recubiertos por una pared de notable resistencia llamada exina. Está constituida por uno de los materiales más inalterables de la naturaleza, la esporopolenina, muy resistente a ácidos y bases y no afectado por las variaciones térmicas habituales en la naturaleza.

Como cualquier célula, los pólenes se caracterizan por su tamaño y su forma. Pero en el caso de los granos de polen, hay otras características que los describen, como son la estructura y la escultura (ornamentación) de su exina y las aperturas que pueden presentar, de las que debe observarse el tipo (poros, colpos, la

combinación de ambos o su ausencia), el número y la disposición en la superficie del grano. Las figuras 1 a 3 resumen las características generales que permiten diferenciar los granos de polen.

FORMAS DE LOS GRANOS DE POLEN

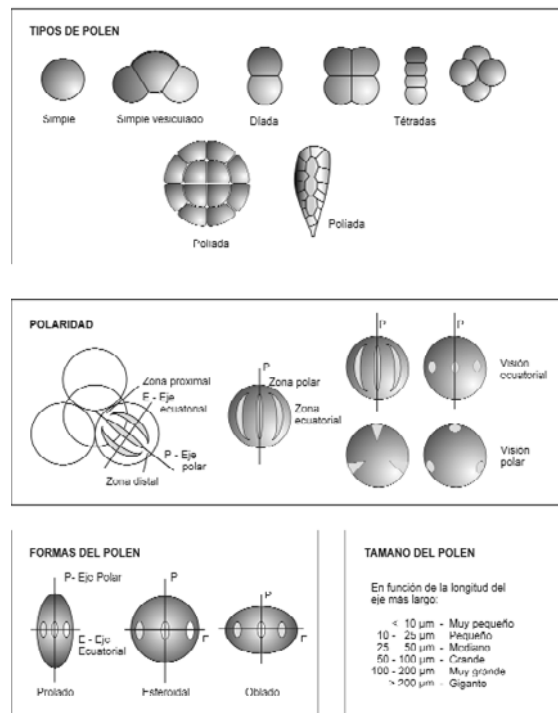


FIGURA 1.

ABERTURAS DE LOS GRANOS DE POLEN

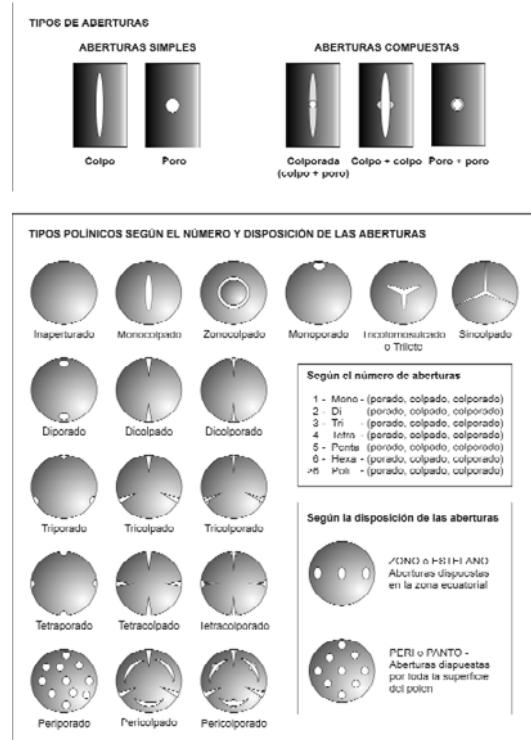


FIGURA 2.

LA PARED DEL GRANO DE POLEN

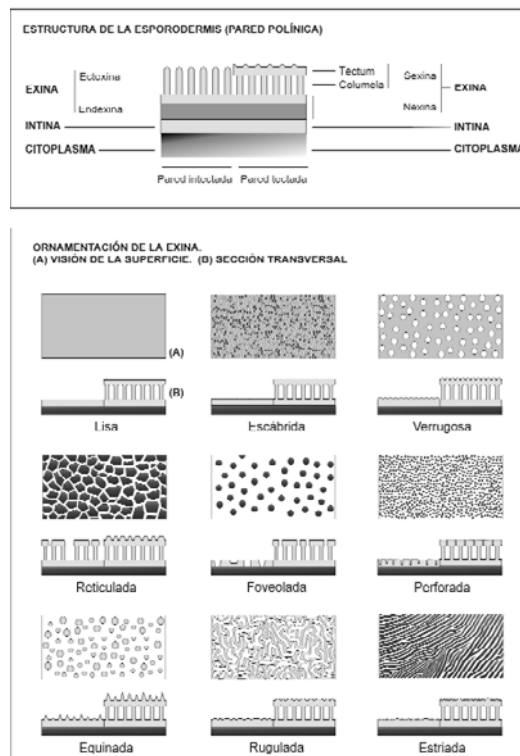


FIGURA 3.

El conjunto de las características de un polen es constante para cada planta y hace posible identificar con más o menos precisión de qué táxon procede el polen. Es necesario el uso de la palabra táxon (que designa cualquier unidad de determinación dentro de un sistema jerárquico de categorías) porque no siempre puede identificarse de que especie procede el polen; en bastantes casos la precisión llega sólo al nivel de género (es decir, a un grupo de especies), familia (es decir, a un grupo de géneros), o incluso a un grupo de familias o categorías superiores.

IDENTIFICACIÓN DE PÓLENES

Se llama Palinología al estudio de las esporas de las plantas y su dispersión y aplicaciones⁴. En esta definición, la palabra esporas se refiere tanto a granos de polen como a esporas de hongos, helechos y musgos. Nehemias Grew (1628-1711) fue uno de los primeros autores en hacer descripciones morfológicas de pólenes⁵. Ya en el siglo XX, y especialmente a partir de los años 40, proliferaron los trabajos en que los autores sistematizaban las descripciones de pólenes y esporas y proponían claves para su identificación⁶.

La identificación de los granos de polen se basa, como se ha dicho, en la combinación de algunas características, que se tratan, de manera muy esquemática, en las figuras 1 a 3.

MÉTODOS DE MUESTREO AEROBIOLÓGICO

Muchos investigadores han trabajado en el diseño de aparatos muestreadores de la atmósfera, llamados también captadores, para fines aerobiológicos. En el texto que sigue no se pretende hacer un estudio exhaustivo de todos ellos, pero sí una breve presentación de los principios en que se basan y de los métodos que más se han utilizado^{6,7} para estudiar los pólenes y las esporas de hongos aerovagantes. La tabla 1 contiene un esquema de los distintos tipos de captadores.

TABLA 1.
Resumen de los diferentes métodos de muestreo aerobiológico.

MÉTODOS DE MUESTREO AEROBIOLÓGICO		
Muestreadores de precipitación	Precipitación gravimétrica	Placas de Petri Captador Durham Captador Tauber
	Precipitación electrostática Precipitación térmica	
Muestreadores de impacto	Impacto por succión	Captador Hirst
	Impacto en cascada	Captador Andersen
	Muestreadores inerciales y ciclónicos	Captador Rotorod Captador ciclónico
Muestreadores de filtración	Filtros sólidos	Filtros de fibra Captador Cour Filtros por membrana Filtros por cassettes
	Filtrado en medio líquido	Captador McLeod Multi-Stage Liquid Impinger
Muestreadores biológicos	Técnicas de biología molecular Técnicas inmunológicas	

Los primeros captadores utilizados se basaban en el principio de la gravedad y consistían en superficies preparadas con sustancias adhesivas o retentivas, expuestas horizontalmente. A principios del siglo XX se usaban placas de Petri⁸, céspedes compactos de musgos⁹ y portaobjetos¹⁰; posteriormente se idearon soportes más adecuados, naciendo así los captadores Durham¹¹ y Tauber¹². También Cour¹³ completaba su captador (ver más adelante) con filtros horizontales. Este tipo de muestreos permite un buen conocimiento de la cualidad y diversidad de las partículas, pero sólo permiten cuantificarlas por unidad de superficie.

Buscando hacer más comprensibles los resultados, se idearon captadores que miden los pólenes por unidad de volumen de aire. Dado que las partículas son transportadas por el aire en trayectorias que pueden considerarse horizontales, se han diseñado captadores que, aprovechando la inercia de las partículas, propician el impacto de éstas en superficies untadas con sustancias adhesivas, que las retendrán.

Están muy extendidos los muestreadores que se basan en el principio del impacto por succión mediante una bomba de vacío, que impulsa el aire aspirado contra la superficie receptora. El captador de este tipo más universalmente utilizado fue el ideado por Hirst¹⁴ (se explica con detalle más adelante), aunque también son muy utilizados una variante de los iniciales captadores por succión que se llaman captadores en cascada¹⁵. En este caso, el aire succionado hacia el interior del captador pasa a través de una o más superficies receptoras que retendrán selectivamente las partículas en función del tamaño de éstas.

Hay aún otro tipo de captadores por impacto, los basados en la rotación. El más conocido en este grupo es el Rotorod¹⁶. Este captador, de reducidas dimensiones, dispone de dos brazos en forma de U en los que se insertan las superficies receptoras. Al girar a gran velocidad por acción de un motor, interceptan las partículas. Este tipo de captador es ampliamente usado en América del Norte. Otros muestreadores de este grupo, menos conocidos, son los ciclónicos. En ellos, las masas de aire son forzadas a moverse en trayectorias de rotación o en espiral y las partículas resultan discriminadas por la fuerza centrífuga generada. Los captadores basados en impacto por rotación son útiles para recolectar partículas de unos 10 micrómetros de diámetro⁷.

Otro grupo de captadores lo constituyen aquellos que funcionan por filtración, ya sea a través de membranas de materiales diversos o a través de fibras, como es el caso del Captador Cour¹³ (se explica con detalle más adelante). Los captadores por filtros de membranas son usados mayoritariamente en la captura de partículas no biológicas, excepto una modificación de ellos, el CAP¹⁷, diseñado especialmente para pólenes y esporas.

Pueden citarse otros métodos, como los de impregnación en medio líquido (para partículas viables), precipitación electrostática y precipitación térmica.

De entre todos los captadores presentados hasta ahora, los más utilizados en Europa en estudios destinados a conocer la composición en pólenes y esporas de la atmósfera son el Cour¹³ y, muy especialmente, el Hirst¹⁴.

Un captador Cour¹³ (ver figura 4) es un muestreador por filtración que consiste en un eje perpendicular al suelo, que sostiene, encajado en su extremo superior, un eje perpendicular capaz de girar 360°. En un extremo de este eje hay dos marcos protegidos, cada uno, por una visera y, en el otro, una veleta (que lo orienta siempre según el viento dominante). Levantando las viseras de los marcos se puede encajar la superficie que interceptará las partículas aerotransportadas, un filtro preparado con cinco pliegues de gasa hidrófila untados con una mezcla de aceite de silicona y rodeado por un marco de plástico. Este filtro es cuadrado y mide 20 cm de lado. En el captador se exponen dos filtros: uno se cambia una vez por semana, normalmente los lunes, y el otro se usa como contrapeso y como resumen mensual. El filtro retirado del captador se somete a un tratamiento^{13,6} que combina procesos químicos (ácidos sulfúrico, fluorhídrico...) con físicos (centrifugaciones, decantaciones...) para obtener un sedimento formado, mayoritariamente, por los pólenes y las esporas retenidos. Para poder medir este sedimento con precisión y prepararlo para el análisis al microscopio óptico, se incluye en una matriz semilíquida de glicerogelatina, de la que se estudiará una porción representativa. La consistencia semilíquida del medio en que se encuentran las partículas y el hecho de que el tratamiento incluye la acetólisis¹⁸, es decir, la eliminación de las partes blandas de la célula mediante una digestión química, facilita la identificación de los granos de polen. Hay que señalar, en contrapartida, que algunas esporas



FIGURA 4. Captador Cour.

de hongos se rompen y no pueden ser estudiadas con precisión con esta metodología, ya que se obtienen valores por debajo de los reales. Si se quiere obtener una lectura representativa de una muestra Cour deben seguirse las indicaciones propuestas al describir la metodología^{19,20}.

Cuando se trabaja con un captador Cour, es necesario disponer de un anemómetro totalizador (ver figura 5), aparato dotado de una cazoletas, que giran impulsadas por el viento reinante, conectadas a un cuentakilómetros. Este aparato registra los metros equivalentes al espacio recorrido por el aire que pasa a través de sus cazoletas. La medida del recorrido de viento correspondiente al periodo de exposición de un filtro hace posible interpretar la cantidad de pólenes y esporas contados por unidad de volumen (se considera que los pólenes y esporas estaban en el interior de un prisma que tiene por base el filtro de 20x20 cm² y por altura la columna de aire que ha pasado durante la exposición).

Para obtener el valor de la concentración media semanal de partículas debemos hacer cálculos matemáticos en los que intervienen:

- el número de partículas contadas (N).
- la proporción de sedimento analizado [siempre 50 micrólitros (K_1)] respecto del volumen total de sedimento semilíquido (V) obtenido al final del tratamiento.



FIGURA 5. Captador Cour y anemómetro totalizador.

- la proporción de filtro tratado (S) respecto a la superficie total del filtro (400 cm²), ya que una parte de él se guarda como testimonio por si fuera necesario repetir el tratamiento.
- la superficie de muestra analizada al microscopio óptico. Para calcularla se necesita conocer el número (n) de líneas contadas y su longitud (K₂) y anchura (K₃) (ambas dependen del microscopio y del objetivo que se use en la lectura). Con estos parámetros se calcula la proporción analizada respecto de toda la superficie útil de la preparación microscópica (K₄).
- el recorrido de viento registrado durante el periodo de exposición (Rv).

La combinación de estos factores, multiplicativos y cocientes según los casos, da lugar a una fórmula matemática que, aplicada a los datos brutos correspondientes a cada semana, nos permite obtener el valor de la concentración media semanal.

La fórmula a aplicar⁶ es:

$$\text{Concentración media semanal} = K \times (N \times V / n \times S \times Rv)$$

- donde K es una constante que incorpora todos aquellos valores fijos cuando la metodología se aplica siguiendo siempre la misma rutina (K₁ a K₄).
- debe tenerse la precaución de utilizar las unidades de medida oportunas (V debe expresarse en micrólitros; S en metros cuadrados y Rv en metros)

Por tanto, los resultados que se obtienen a partir de un captador Cour son concentraciones medias semanales de pólenes y esporas (éstas, como ya se ha indicado, infraestimadas por la inevitable destrucción de parte de ellas durante la preparación de las muestras).

Un captador Hirst¹⁴ (ver figuras 6 y 7) es un muestreador de impacto por succión que consiste en un aparato eléctrico que aspira volúmenes constantes y conocidos de aire y los hace impactar contra la superficie receptora. Ésta es una cinta plástica de 19 mm de ancho que se dispone tensada alrededor de una pieza cilíndrica llamada tambor. Para darle la capacidad de adherir y retener las partículas, se deposita sobre la cinta una fina película de aceite de silicona, usando un pincel. La disposición del tambor así preparado en el interior del captador es tal que, impulsado por mecanismo de relojería, gira continuamente a razón de 2mm/hora. Ello hace que las partículas impulsadas contra la superficie receptora queden retenidas de forma secuencial. Una vez a la semana se sustituye la superficie receptora. La ya expuesta, es cortada en los fragmentos correspondientes a cada día de la semana. Cada fragmento es montado en una preparación microscópica, teñido y fijado y es analizado al microscopio óptico. El análisis microscópico de las muestras procedentes de un captador Hirst se hace sobre el material tal como se obtiene, es decir, con las partículas bióticas llenas y junto con otras partículas, minerales y orgánicas, cosa que puede dificultar su identificación pero que tiene como muy positivo que no estropea las esporas de hongos. También es interesante en este método que, debido al hecho que las partículas se van depositando secuencialmente sobre una cinta que avanza regularmente, es posible obtener resultados con precisión horaria, aunque el volumen de trabajo añadido que esto comporta hace que no se prodiguen demasiado estos resultados.

Los resultados que se obtienen de un captador Hirst son concentraciones medias diarias de pólenes y esporas (pólenes/m³ y esporas/m³).

Para obtener estos valores basta realizar un simple cálculo matemático en el que intervienen como factores:

- el número de partículas contadas (n).
- la superficie de muestra analizada. Para calcularla se necesita conocer el número (n) de líneas contadas y su longitud (K₂) y anchura (K₃) (ambas dependen del microscopio y del objetivo que se use en la lectura). Con estos parámetros se calcula la proporción analizada respecto de toda la superficie útil de la preparación microscópica (K₄).
- el volumen de aire que aspira el captador, normalmente 10 l/minuto, que, al cabo de un día equivalen a 14,4 m³ de aire (K₅).



FIGURA 6.
Captador Hirst marca Burkard.



FIGURA 7.
Captador Hirst marca Lanzoni.

Muchos de los parámetros se mantienen constantes (mientras no se cambie de microscopio u objetivo y se siga una rutina de conteo), de manera que es habitual tenerlos establecidos para que la operación de conversión de los datos brutos diarios a concentraciones medias diarias quede reducida a una simple multiplicación entre una constante y el número de partículas detectadas.

La fórmula a aplicar es:

Concentración media semanal = $K \times N$

- donde K es una constante que incorpora todos aquellos valores fijos cuando la metodología se aplica siguiendo siempre la misma rutina (K_1 a K_5).

El captador Hirst es el que se ha adoptado más universalmente, especialmente en el continente europeo, para el estudio de los pólenes y las esporas atmosféricas desencadenantes de alergias respiratorias.

En el mercado hay actualmente dos marcas comerciales que fabrican y distribuyen captadores basados en el método Hirst: la británica Burkard (figura 6) y la italiana Lanzoni (figura 7).

ELABORACIÓN DE DATOS AEROBIOLÓGICOS

El análisis microscópico de las muestras aerobiológicas da lugar a una relación cuantificada de taxones polínicos (un espectro), correspondiente a los datos brutos de un día o de una semana, según se haya utilizado un captador Hirst o Cour. Aplicando los cálculos adecuados a la metodología de muestreo, estos resultados se expresan en unidades de concentración: pólenes/m³, unidades muy útiles a la hora de hacerse una idea gráfica de la medida expresada, el número medio de granos de polen contenidos en un espacio cúbico de un metro de lado, durante el periodo de tiempo que duró el muestreo (un día o una semana, según el método).

Para realizar comparaciones entre las cantidades de polen observadas y la casuística de polinosis detectadas, son muy interesantes los datos de concentraciones medias diarias de pólenes; pero cuando se pretende elaborar gráficos y resúmenes resulta más interesante recurrir a otros periodos de tiempo, como son la semana, periodos de diez días, etc. (concentraciones medias semanales, de diez días, etc.).

Si quieren expresarse concentraciones medias diarias en forma de concentraciones medias semanales, de diez días o de otro periodo de tiempo, debe calcularse la media aritmética de los siete, diez o n valores de concentración media diaria de los días que corresponden a la semana, los diez días o el periodo de tiempo escogido.

Para que los resultados que se expresan resulten útiles a los usuarios, debe indicarse muy claramente, no solamente en qué unidades se expresan, sino también a qué periodo de tiempo se refieren. Si el periodo elegido es la semana, el número orden de éstas debe asignarse de acuerdo a la normativa de la Organización Internacional de Normalización, según la cual la primera semana del año es aquella que contiene el primer jueves.

Los espectros diarios (método Hirst) o semanales (método Cour) son incluidos en las bases de datos y procesados adecuadamente para la generación de resúmenes correspondientes a periodos de tiempo más largos. Así, es frecuente que se elaboren espectros polínicos anuales, eso es, relaciones ordenadas de los distintos tipos polínicos identificados en una localidad a lo largo de todo un año y de las cantidades registradas (suma de las concentraciones medias diarias o semanales, según metodologías). Suele incorporarse al espectro el valor de la concentración máxima alcanzada. Estos espectros resultan muy válidos, no sólo para identificar los taxones con mayor incidencia en la localidad, sino también para evidenciar la variabilidad interanual de las polinizaciones.

CALENDARIO POLÍNICO

Con el nombre de calendario polínico se designa una representación gráfica que resume la dinámica anual de los principales tipos polínicos de una localidad, ordenados en función de su periodo de polinización.

Este tipo de representación, que compendia en una sola figura toda la información aerobiológica de una localidad, facilita la comprensión de la composición polínica de la atmósfera en todo momento del año, infor-

ma de los pólenes que pueden resultar más perjudiciales en cada periodo anual y destaca la importancia relativa de unos pólenes respecto a otros.

Aunque un calendario polínico confeccionado con los datos de un solo año de muestreo es ya una información muy válida, resultan más representativos aquellos calendarios elaborados con los datos promedio de diversos años de estudio, puesto que en ellos queda reflejada la variabilidad interanual que tiene como causa la meteorología y aquella que presentan determinadas especies que alternan años de elevada producción polínica con años de baja polinización.

Los calendarios polínicos pueden confeccionarse de muy diversas maneras. En lo referente a la escala de tiempo, los calendarios polínicos pueden representar la dinámica de los pólenes en unidades de tiempo que sean meses o semanas, más raramente la precisión del tiempo es diaria. Suele mantenerse constante el hecho que la escala de tiempo se represente en el eje de abscisas.

En lo referente a la escala del polen, que suele ocupar el eje de ordenadas, los calendarios polínicos pueden representarse con diversas unidades de medida del polen:

- Con los valores precisos de las concentraciones medias del periodo de tiempo. Así, el calendario resulta ser una sucesión de gráficos, cada uno con la curva de un táxon. Este tipo de presentación tiene una ventaja, la precisión; pero tiene también un inconveniente, la cantidad de espacio que requiere, debido al hecho que hay algunos taxones que alcanzan concentraciones atmosféricas muy elevadas. La publicación de calendarios polínicos de este tipo consume bastante espacio y esto, además de complicar la edición, crea dificultades a la hora de comparar la dinámica entre taxones y de interpretar la información contenida.
- Con clases de valores (categorías) establecidos a partir de las concentraciones medias del periodo de tiempo. Normalmente se definen entre 3 y 5 categorías. Siguiendo este método, la dinámica anual de cada táxon queda representada por un gráfico de dimensiones similares al del resto de taxones. Una ventaja que ofrece este diseño sobre el anterior es que permite economizar mucho espacio y ello redundará también en resaltar las tendencias de cada tipo polínico.
- Con conceptos relacionados con la polinización. En este caso se establecen previamente los conceptos de inicio de la polinización, periodo de polinización principal u otros que se decida representar (diversos autores han propuesto definiciones de estos conceptos^{6,23}). En este tipo de calendario polínico cada táxon queda representado por un rectángulo. Dentro del rectángulo se encajan, en las áreas que corresponden según la época del año, los colores o tramas que se han elegido para representar las diferentes etapas o conceptos de la polinización. La elección de este diseño ofrece las mismas ventajas que el caso anterior; pero presenta una complicación: los taxones que inician su polinización a finales de año y la prolongan al año siguiente deben ser tratados de forma distinta a los taxones que polinizan dentro de un ciclo anual. De no hacerlo así, las dinámicas representadas para los primeros pueden ser totalmente falsas.

REDES AEROBIOLÓGICAS

En las últimas décadas la mayor parte de las disciplinas científicas se han organizado en redes, es decir, que los distintos grupos de investigación que compartían líneas comunes han acordado crear bases de datos coordinadas. Esta forma de funcionar permite una mayor difusión del conocimiento y posibilita optimizar esfuerzos. A la par que las redes se abren a los científicos contribuyentes, también pueden abrirse, con las restricciones que sean necesarias para no perjudicar la propiedad intelectual, al público en general.

Este planteamiento en la organización de la información llegó también a los diversos grupos de aerobiólogos que investigaban localmente y surgió la organización en redes aerobiológicas no sólo a escala nacional sino también superior (European Allergy Network, EAN, con sede en Viena, Austria).

Los datos que se publican y divulgan a través de redes aerobiológicas nacionales e internacionales en la mayor parte de Europa provienen de captadores de tipo Hirst y se han obtenido con métodos estandarizados de recuento.

A escala intranacional, multitud de países han hecho esfuerzos para converger en un método estandarizado de muestreo atmosférico; a escala internacional se presentan algunas diferencias entre países, especialmente en las rutinas de recuento de las muestras.

En España están funcionando dos grandes redes nacionales de muestreo atmosférico, la organizada en el seno del Comité de Aerobiología de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC) y la de la Red Española de Aerobiología (REA). Ambas redes siguen un protocolo similar de recuentos polínicos^{21,22}, que se hacen identificando y contando todos los granos que se observan en cuatro líneas longitudinales repartidas proporcionalmente en la superficie de la lámina. El recuento de las esporas de hongos no está tan sistematizado ni generalizado, aunque empieza a extenderse.

Las redes nacionales son posibles gracias a la contribución de redes a escalas menores (autonómicas y provinciales) y de investigadores individuales que adoptan sus normas de muestreo y envían periódicamente sus resultados a la base de datos de la red nacional. De la misma manera, las redes internacionales no son más que el compendio de datos servidos por las distintas redes nacionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EDMONDS RL, BENNINGHOFF WS. *Aerobiology and its modern applications*. US/IPB Aerobiology Report nº 3. Botany Department, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, 1973: 1-18.
2. BLACKLEY CH. *Experimental researches on the causes and nature of Catarrhus Aestivus (Hay fever or Hay asthma)*, 1873: 1-202. (Reprinted by Dawson's. London, 1959).
3. Moulton S ed. *Aerobiology*. Amer. Assoc. Adv. Sci., Washington, 1942; 17: 1-289.
4. HYDE HA. *Pollen analysis and the museums*. Museums journal, 1944; 44: 145-149.
5. PLA J. *Polen*. Talleres gráficos D.C.P., Girona, 1961: 1-511.
6. BELMONTE J. *Identificació, estudi i evolució anual del contingut pol·línic a l'atmosfera de Catalunya i Balears*. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, 1988; 1: 11-14.
7. MANDRIOLI P, COMTOIS P, DOMÍNGUEZ E, GALAN C, SYZDEK LD, ISARD SA. *Sampling: Principals and Techniques*. In: Mandrioli P, Comtois P & Levizzani L eds. *Methods in Aerobiology*, Bologna: Pitagora Editrice, 1998: 47-68.
8. HESSELMAN H. *Über die Verbreitungsfähigkeit des Waldbaumpollens*. Medd. Skogsförsöksanst., 1919; 16: 27-60.
9. FIRBAS F. *Über die Bestimmung der Walddichte und der Vegetation Waldloser Gebiete mit Hilfe der Pollenanalyse*. Planta, 1931; 22: 109-145.
10. WODEHOUSE RP. *Pollen grains*. Mc. Graw-Hill Book Co. Inc., New York and London, 1935: 1-574.
11. DURHAM OC. *The volumetric incidence of atmospheric allergens IV. A proposed standard method of gravity sampling, counting and volumetric interpolation of results*. J. Allergy, 1946; 17(2): 79-86.
12. TAUBER H. *A static non-overload pollen collector*. New Phytol., 1974; 73: 359-369.
13. COUR P. *Nouvelles techniques de détection des flux et des retombées polliniques: étude de la sédimentation des pollens et des spores à la surface du sol*. Pollen et spores, 1974; 16(1): 103-141.
14. HIRST JM. *An automatic volumetric spore trap*. Ann. Appl. Biol., 1952; 39: 257-265.
15. MAY KR. *The cascade impactor: an instrument for sampling coarse aerosols*. J. Sci. Instrum., 1945; 22:187-195.
16. PERKINS WA. *The Rotorod sampler*. Second Semiannual CML 186, Aerosol Laboratory, Stanford University, California, 1957.
17. SUAREZ M., SEOANE JA. *Estudio del contenido polínico de la atmósfera de Barcelona según un nuevo método de filtración*. Collect. Bot., 1983; 14: 587-615.
18. ERDTMAN G. *The acetolysis method. A revised description*. Sv. Bot. Tidskr., 1960; 54: 561-564.
19. CAMBON G. *Rérelations entre le contenu pollinique de l'atmosphère et le couvert vegetal en Méditerranée occidentale à Montpellier (France), Valencia (Espagne) et Oran (Algerie)*. Tesis doctoral. Université Sciences et Techniques du Languedoc. Montpellier, 1981.
20. GROS R. *Contrôle de validité des analyses sporo-polliniques*. Rev. Paléobiol., 1984; vol. special: 85-95.
21. Comité de Aerobiología de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica. *Introducción en la captación e identificación de los pólenes*. SEAIC-Almirall Prodeslarma: 6-9.
22. DOMÍNGUEZ E, GALÁN C, VILLAMANDOS F & INFANTE F. *Handling and evaluation of the data from the aerobiological sampling*. Monografías REA/EAN, 1992; 1: 1-18.
23. BELMONTE J, CANELA M & HINOJOSA C. *Paràmetres de la dinàmica aerobiològica del pol·len d'olivera a Catalunya*. Butll. Inst. Cat. Hist. Nat., 2000; 68: 97-111.