

Estacionalidad y diversidad de *Aspergillus* en el aire exterior de Badajoz

Seasonality and diversity of airborne *Aspergillus* in the outdoor air of Badajoz

Estacionalidade do *Aspergillus* no ar exterior em Badajoz

Santiago Fernández-Rodríguez^a, Rafael Tormo-Molina^a, José María Maya-Manzano^a, Inmaculada Silva-Palacios^b y Ángela Gonzalo-Garijo^c

^a Departamento de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. Avda. Elvas s/n, 06071 Badajoz. España.

^b Departamento de Física Aplicada. Escuela de Ingenierías Agrarias. Universidad de Extremadura. Badajoz. España.

^c Sección de Alergología. Hospital Universitario Infanta Cristina. Badajoz. España.

Cita: Fernández-Rodríguez S, Tormo-Molina R, Maya-Manzano JM, Silva-Palacios I y Gonzalo-Garijo Á. Estacionalidad y diversidad de *Aspergillus* en el aire exterior de Badajoz. Rev salud ambient. 2014;14(1):54-59.

Recibido: 18 de octubre de 2013. **Aceptado:** 22 de mayo de 2014. **Publicado:** 15 de junio de 2014.

Autor para correspondencia: Santiago Fernández-Rodríguez.

Correo e: santiferro@unex.es

Tel. +34 924 289300; Fax. +34 924289423.

Financiación: Gobierno regional de Extremadura (España) y Fundación Social de Europa.

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran que no existen conflictos de intereses que hayan influido en la realización y la preparación de este trabajo.

Declaraciones de autoría. Todos los autores contribuyeron al diseño del estudio y la redacción del artículo. Asimismo, todos los autores aprobaron la versión final.

Resumen

La presencia de *Aspergillus* en el aire exterior e interior es importante para la salud pública. El objetivo de este trabajo fue estudiar la presencia estacional de *Aspergillus* en el aire exterior. Se muestreó la atmósfera exterior de Badajoz (SO España) en la Universidad de Extremadura durante dos años, desde el 25 de marzo de 2009 hasta el 25 de marzo de 2011, utilizando 3 tipos de captadores volumétricos portátiles viables: dos captadores Burkard, uno con un dispositivo con estructura cónica (Bc) y otro con un tamiz (Bt), y un captador Sampl'air (AES). La velocidad de flujo de aspiración fue 20 L/min. para los captadores Burkard y 100 para AES. Se emplearon dos tipos de medio de cultivo Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) y Agar Extracto de Malta (MEA). En un primer periodo (25/03/2009-26/03/2010) se muestreó con Bc y Bt y con SDA, mientras que en el segundo (30/03/2010-25/03/2011) se muestreó con AES y Bt y con MEA. Los datos se proporcionan en unidades formadoras de colonias por metro cúbico (CFU/m³). Se contabilizaron un total de 610 colonias de *Aspergillus* en el periodo total estudiado. La concentración promedio diaria fue de 17 CFU/m³ en todo el periodo. Se identificaron 15 especies de *Aspergillus* siendo las más frecuentes: *A. niger*, *A. candidus*, *A. fumigatus*, *A. niveus* y *A. versicolor*. Algunas especies se caracterizaron por una marcada estacionalidad, con predominancia en otoño o invierno, o ausencia en verano. Otras no mostraron estacionalidad predominante. En promedio la concentración de *Aspergillus* fue máxima en otoño y mínima en primavera; en verano e invierno los valores fueron intermedios. Se han encontrado diferencias significativas teniendo en cuenta los tres captadores empleados ($\chi^2=28,491$, $p<0,001$).

Palabras claves: hongos aerovagantes; aeromicrobiología; métodos viables.

Abstract

The airborne presence of *Aspergillus* in both outdoor and indoor air is important from the point of view of environmental and public health. The aim of this work was to study the seasonal presence of *Aspergillus* in outdoor air using viable methods. The exterior atmosphere of the city of Badajoz (SW Spain) was sampled at the University of Extremadura for two years from March 25, 2009, to March 25, 2011, using 3 types of viable portable volumetric samplers: two Burkard samplers—one provided with a device having a conical structure (Bd) and another one fitted with a sieve (Bs)— and one Sampl'air sampler (AES). The aspiration flow rate was 20 liters per minute for the Burkard samplers and 100 liters per minute for the AES sampler. Two kinds of culture media were used: Agar Dextrose Sabouraud (SDA) and Agar Extract Malt (MEA). During the first sampling period (March 25, 2009 - March 26,

2010) sampling was done with Bd and Bs and with SDA, whereas during the second sampling period (March 30, 2010 - March 25, 2011) AES and Bs and MEA were used. Data are provided in colony-forming units per cubic meter (CFU/m³). A total of 610 colonies of *Aspergillus* were counted during the overall period. The daily average concentration was 17 CFU/m³ throughout the period. A total of 15 *Aspergillus* species were identified, the most frequent being, in descending order: *A. niger*, *A. candidus*, *A. fumigatus*, *A. niveus* and *A. versicolor*. Some species were characterized by marked seasonality, predominating during autumn or winter or being absent in the summer. Others showed no marked seasonality. On average, *Aspergillus* concentration was highest in autumn and lowest in spring; the values in summer and winter were intermediate. Significant differences were found considering the three samplers used ($\chi^2=28.491$, $p<0.001$).

Keywords: airborne fungi; aeromycology; viable methods.

Resumo

A presença do *Aspergillus* no ar exterior e interior é importante do ponto de vista da saúde pública. O objetivo do presente trabalho é estudar a abundância sazonal do *Aspergillus* no ar exterior. Recolheram-se amostras da atmosfera exterior de Badajoz (SO Espanha), na Universidade de Extremadura, durante dois anos, a partir de 25 de março de 2009 até 25 de março de 2011. Foram utilizados três tipos de sensores volumétricos portáteis viáveis: dois sensores Burkard, um com um dispositivo de estrutura cônica (Bc) e outro com uma peneira (Bt), e Sampl'air (AES). O caudal de aspiração foi de 20 litros/minuto para os sensores Burkard e 100 litros/minuto para o AES. Foram utilizados dois tipos de meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e extrato de malte Agar (MEA). No primeiro período de amostragem (2009-03-25 a 2010-03-26) operou-se com Bc e Bp e SDA, enquanto no segundo período de amostragem (2010-03-30 a 2011-03-25) operou-se com AES e Bp e MEA. Os dados são fornecidos em unidades formadoras de colónias por metro cúbico (UFC/m³). Foi contabilizado um total de 610 colónias de *Aspergillus*. A concentração média foi de 17 UFC/m³. Foram identificadas 15 espécies do *Aspergillus*. As mais frequentes por ordem decrescente foram *A. niger*, *A. candidus*, *A. fumigatus*, *A. niveus* e *A. versicolor*. Algumas das espécies são caracterizadas por uma assinalada estacionariedade, com predomínio no outono ou no inverno, ou ausência no verão. Outras não mostraram estacionariedade predominante. Em média a concentração do *Aspergillus* foi máxima no outono e mínima na primavera, no verão e no inverno os valores foram intermédios. Registraram-se diferenças significativas tendo em conta os três captadores usados ($\chi^2=28.491$, $p<0.001$).

Palavras chave: fungos aerovagantes, aeromicrologia, métodos viáveis.

INTRODUCCIÓN

Aspergillus es un género compuesto por numerosas especies de hongos filamentosos ubicuos caracterizados por ser saprófitos, termotolerantes y que sobreviven y crecen en los restos orgánicos¹.

Los conidios son liberados en grandes cantidades al aire, pudiendo desencadenar enfermedades respiratorias que pueden llegar a causar asma bronquial, con una mayor incidencia en la población. Cuando se desarrollan en ambientes interiores, en el medio hospitalario, existe la posibilidad de producir infecciones graves en pacientes inmunodeprimidos, como la aspergilosis invasiva^{2,3}. Debido a este gran interés clínico, en los últimos años se han desarrollado numerosos estudios en interiores para determinar la presencia, distribución y prevalencia de *Aspergillus* en el aire. La mayoría de los estudios de *Aspergillus* han sido realizados en el interior de hospitales^{4,6} y residencias familiares^{7,8}. Con menor frecuencia se han desarrollado, además, en el aire exterior de hospitales⁹ y residencias¹⁰, en ambos casos para comparar los datos con los del aire interior. Hay trabajos que han estudiado la incidencia de *Aspergillus* en cultivos de pistacho¹¹ o en alimentos como la cáscara del huevo¹². *Aspergillus* ha mostrado incidencia en el biodeterioro de

los monumentos¹³ e incluso ha sido propuesto como agente para biorremediación de metales pesados (Mn, Fe y Pb) en los suelos contaminados¹⁴.

Los estudios de *Aspergillus* en el exterior han sido menos frecuentes. Uno de los primeros trabajos europeos fue el de Mullins et ál. en 1976¹⁵, que estudió las variaciones estacionales de *Aspergillus*. Otros trabajos han analizado el contenido fúngico registrado en medios viables y no viables en India y Grecia¹⁶⁻¹⁸. Han sido frecuentes los estudios de hongos en métodos no viables¹⁹⁻²¹ y su relación con la meteorología^{22,23}. La variación estacional de la concentración fúngica se ha estudiado en medios viables²⁴⁻²⁷. Algunos estudios han mostrado que la concentración de hongos está muy relacionada con factores meteorológicos tales como la temperatura y la humedad relativa^{28,29}.

El objetivo principal de este trabajo es estudiar la presencia estacional de *Aspergillus* en el aire exterior utilizando métodos viables en una ciudad del suroeste de España. Además, se ha estudiado la presencia estacional de *Aspergillus* y las diferencias entre distintos métodos viables y medios de cultivos, así como se ha realizado un análisis con variables meteorológicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha muestreado la atmósfera exterior de la ciudad de Badajoz (SO España), durante dos años (desde el 25 de marzo de 2009 hasta el 25 de marzo de 2011) en la terraza del edificio de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura (38 ° 52 ' 58,97 " N, 7 ° 00 ' 29,08 " O), situada a 16 m sobre el nivel del suelo. Badajoz se encuentra a 184 m sobre el nivel del mar y tiene una población de 151 565 (INE 2012). Alrededor de la ciudad de Badajoz hay zonas de regadío (árboles frutales, maíz, tomates, etc), olivares y, más alejado, dehesas de encinas utilizadas para pastoreo extensivo.

Se han utilizado 3 tipos de captadores volumétricos portátiles viables. Dos captadores Burkard, uno con un dispositivo con estructura cónica de entrada de aire (Bc) y otro con un tamiz (Bt) de 100 agujeros de 1 mm de diámetro. Un tercer captador fue el Sampl'air de AES Chemunex (AES) con un tamiz de 258 agujeros de 1 mm de diámetro. En el primer periodo de muestreo (25 marzo 2009 - 26 marzo 2010) se utilizó Bc y Bt, mientras que en el segundo periodo de muestreo (30 marzo 2010 - 25 marzo 2011) se empleó AES y Bt. En el primer caso se pretendió estudiar la influencia del tamiz, mientras que en el segundo caso la comparación entre diferentes dispositivos comerciales. La velocidad de flujo de aspiración fue de 20 L/min para los captadores Burkard y 100 L/min para AES. El muestreo se ha realizado con una periodicidad semanal, a medio día solar, con una duración de 5 minutos para los captadores Burkard y 1 minuto para el captador AES. Se emplearon dos medios de cultivo, SDA (Agar Sabouraud con dextrosa) en el periodo 2009 - 2010 y MEA (Agar extracto de malta) en 2010 - 2011. Por otra parte, el objetivo de emplear dos medios de cultivos diferentes en dos periodos de tiempo permitió realizar una comparación temporal. Las placas de Petri se mantuvieron en una incubadora cerrada a la luz solar a una temperatura de 27 °C durante 5 días antes de proceder a la identificación de las colonias. Los datos se proporcionan en unidades formadoras de colonias por metro cúbico (CFU/m³). La normalidad de los datos se ha analizado con el test Shapiro-Wilk. Para estudiar las variaciones diarias entre captadores se aplicó el test de Wilcoxon (Z) y para analizar la relación entre concentraciones fúngicas y los parámetros meteorológicos se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman (r). El nivel de confianza utilizado para la significación estadística ha sido del 95 %.

La información meteorológica utilizada fue suministrada por una estación meteorológica fija AT Delta-T DL2 situada en el jardín experimental del área

Botánica junto al edificio de Biología de la Facultad de Ciencias a 16 m de la terraza de dicho edificio. Los parámetros meteorológicos tenidos en cuenta fueron la humedad relativa (Rh), precipitación (R), radiación solar (Sr), temperatura media del aire (T mean) y velocidad del viento (Ws). Todos los valores meteorológicos registrados son datos medios diarios.

RESULTADOS

Se contabilizaron un total absoluto de 610 colonias de *Aspergillus*. La concentración promedio diaria fue de 17 CFU/m³. Se identificaron un total de 15 especies de *Aspergillus* con al menos una concentración de 1 CFU/m³ (*A. candidus*, *A. chevalieri*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. niveus*, *A. ochraceus*, *A. restrictus*, *A. sclerotium*, *A. sojae*, *A. sydowii*, *A. terreus*, *A. ustus* y *A. wentii*). Las especies más frecuentes de *Aspergillus* fueron en orden decreciente; *A. niger* (21,4 CFU/m³), *A. candidus* (2,3 CFU/m³), *A. fumigatus* (2,2 CFU/m³) y *A. niveus* (1,4 CFU/m³) (Figura 1). La concentración de *Aspergillus* fue máxima en otoño (79 CFU/m³) y mínima en primavera (4 CFU/m³). En verano y primavera los valores fueron intermedios (22 y 15 CFU/m³, respectivamente) (Figura 2). Las máximas concentraciones de *Aspergillus* se registraron el 5 de noviembre de 2010 en Bc (626 CFU/m³) y en AES (1252 CFU/m³). Algunas especies se caracterizaron por una marcada estacionalidad, con predominancia en otoño (*A. niger*, *A. ustus*) o invierno (*A. versicolor*, *A. sydowii*), o ausencia en verano (*A. niveus*). Otras no mostraron estacionalidad predominante (*A. candidus*, *A. fumigatus*).

Figura 1. Concentración media diaria de las especies de *Aspergillus* durante todo el periodo de estudio y de todas las muestras (CFU/m³)

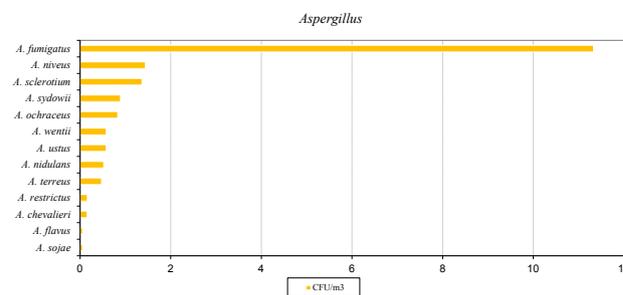
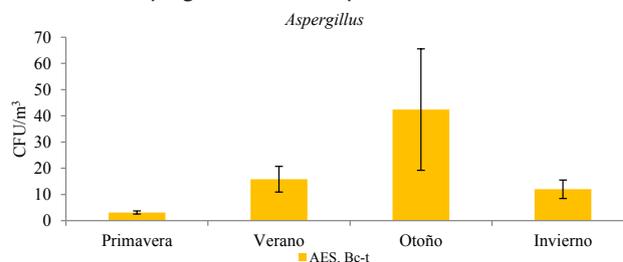


Figura 2. Concentración estacional, con barras de error, de las colonias de *Aspergillus* durante el periodo de estudio (CFU/m³)



La distribución de la concentración media diaria de *Aspergillus* durante el periodo estudiado se muestra en la Figura 3. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los medios de cultivos utilizados ($Z = -1,395$, $p = 0,163$), sin embargo se han encontrado diferencias teniendo en cuenta los tres captadores empleados ($\chi^2 = 28,491$, $p < 0,001$), en concreto entre Bc y Bt ($Z = -3,549$, $p < 0,001$). La Figura 4 muestra la concentración media mensual, utilizando los diferentes captadores, de las especies predominantes: *Aspergillus niger*, *A. candidus*, *A. fumigatus* y *A. niveus*.

Figura 3. Variación de la concentración media diaria de *Aspergillus* durante 2009-2010 (3a) y 2010-2011 (3b) (CFU/m³)

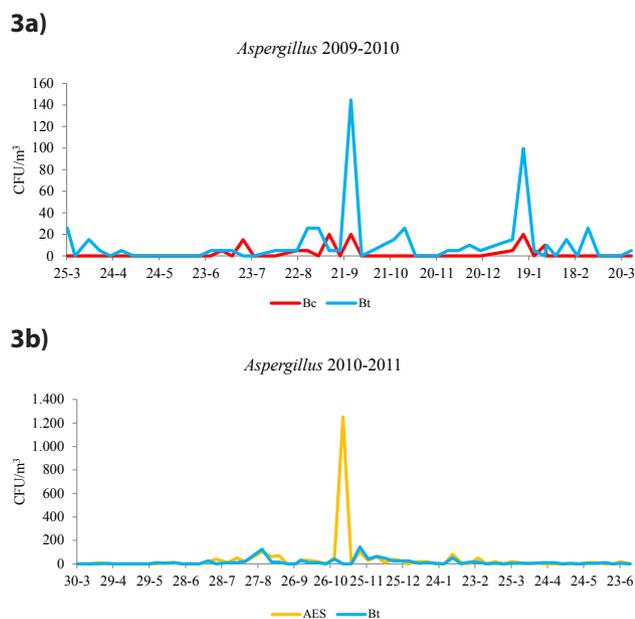
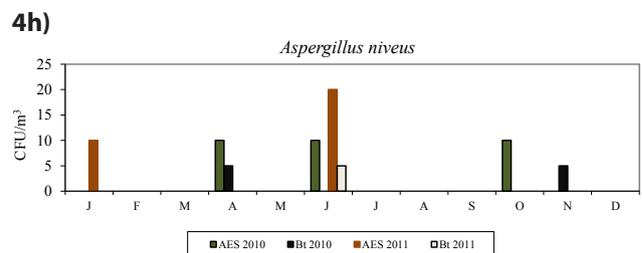
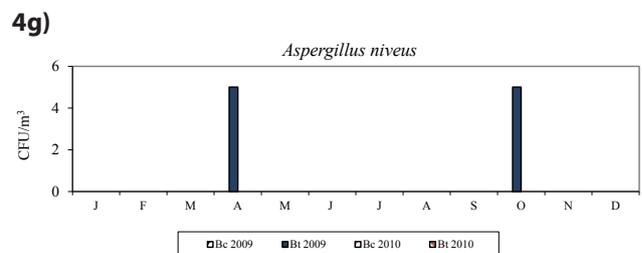
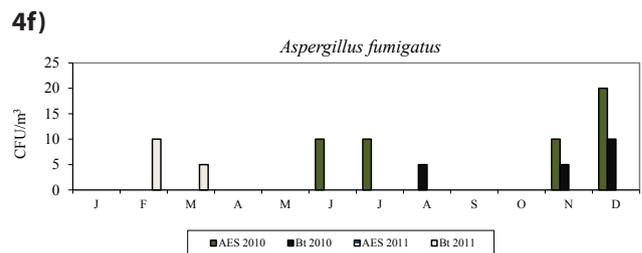
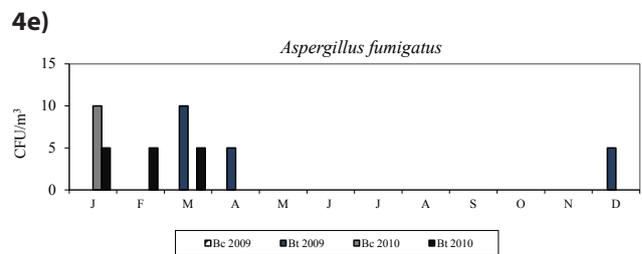
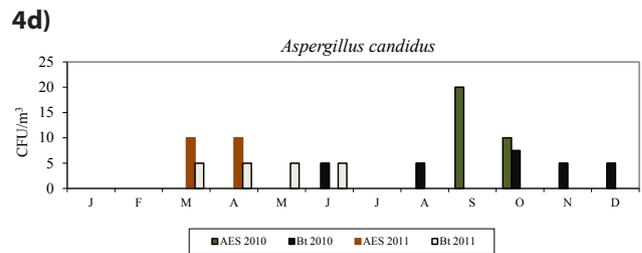
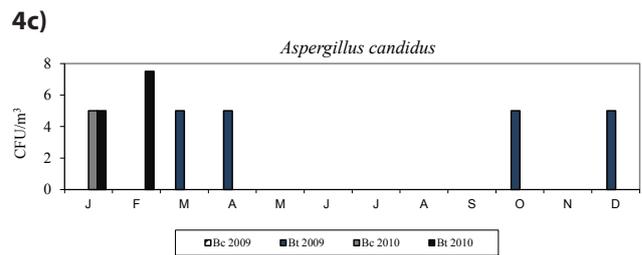
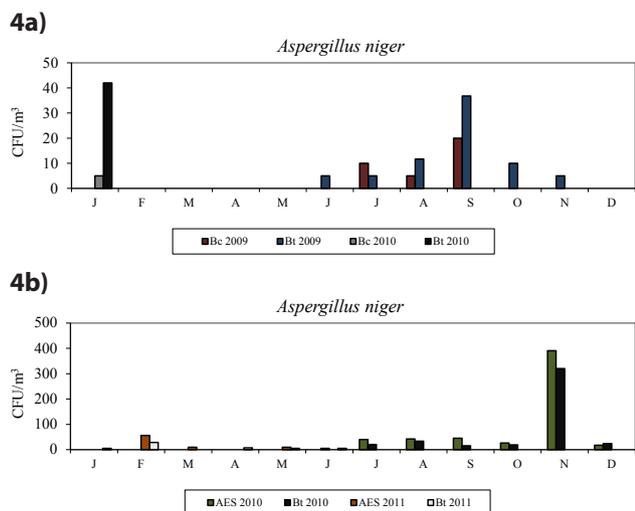


Figura 4. Concentración media mensual, en los diferentes captadores empleados, de *Aspergillus niger* (4a, 4b), *Aspergillus candidus* (4c, 4d), *Aspergillus fumigatus* (4e, 4f), *Aspergillus niveus* (4g, 4h) (CFU/m³)



Aspergillus mostró correlaciones estadísticamente significativas en los captadores Bt y AES con la velocidad del viento ($r = -0,264$; $p = 0,033$; $r = -0,254$; $p = 0,041$, respectivamente) y la radiación solar ($r = -0,326$; $p = 0,008$;

$r = -0,265$; $p = 0,033$, respectivamente). Con los demás parámetros meteorológicos no se obtuvieron correlaciones estadísticamente significativas

DISCUSIÓN

Los rangos de concentraciones medias anuales encontrados en estudios previos fueron 8 - 204 CFU/m³ en Grecia¹⁸ y 17 - 248 CFU/m³ en Egipto²⁷. Con respecto a este trabajo se ha encontrado una concentración promedio diaria superior en los estudios de Pyrri & Kapsanaki-Gotsi de 2007 y 2012^{18,26} (36,52 CFU/m³; 50,56 CFU/m³, respectivamente). Debido a una concentración puntual el 5 de noviembre de 2010 de *Aspergillus niger*, el pico máximo registrado fue hasta seis veces mayor que los valores máximos encontrados por Pyrri & Kapsanaki-Gotsi¹⁸ y Abdel Hameed et ál.²⁷.

Respecto al número de especies identificadas Adhikari et ál.¹⁷ incluyeron nueve (*Aspergillus candidus*, *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. sydowii*, *A. terreus*, *A. wentii*) y Pyrri & Kapsanaki-Gotsi (2012)²⁶ identificaron 22 taxones (*A. aculeatus*, *A. auricomus*, *A. carbonarius*, *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. foetidus*, *A. fumigatus*, *A. melleus*, *A. niger*, *A. niveus*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. ostianus*, *A. parasiticus*, *A. puniceus*, *A. sulphureus*, *A. sydowii*, *A. terreus*, *A. tubingensis*, *A. ustus*, *A. versicolor*, *A. wentii*). El elevado número de taxones identificados en este último trabajo puede deberse a un mayor periodo de muestreo, cuatro años.

Pyrri & Kapsanaki-Gotsi^{18,26} encontraron las máximas concentraciones desde septiembre hasta noviembre, estando estos resultados en consonancia con los encontrados en el presente estudio. Abdel Hameed et ál.²⁷ encontraron un rango estacional similar de concentraciones máximas.

Respecto a los medios de cultivo, MEA y SDA, no se han encontrado diferencias significativas. Guinea et ál.³⁰ tampoco las encontraron entre SDA y Czapek. No existen trabajos previos que hagan la comparación de captadores aerobiológicos portátiles volumétricos que se ha realizado en el presente trabajo. Las diferencias encontradas entre las dos maneras de utilizar el captador portátil Burkard evidencian que la presencia de una placa perforada o tamiz por encima de la placa de Petri incrementa de forma significativa la eficiencia del muestreo; este incremento alcanza un relación (Bt/Bc) de 5,5.

Respecto a la influencia de los parámetros meteorológicos, Sen and Asan²⁸ y Reanprayoon and Yoonaiwong²⁹ encontraron correlaciones negativas estadísticamente significativas con la humedad relativa.

Sen and Asan²⁸ encontraron correlaciones positivas estadísticamente significativas con la temperatura. En el presente estudio se han encontrado correlaciones estadísticamente significativas con la velocidad del viento y la radiación solar; por el contrario no se han encontrado correlaciones ni con la humedad relativa ni con la temperatura. Se estima que al incrementarse la velocidad del viento se reduce la captura de propágulos de *Aspergillus* y que un incremento de la radiación redundaría en una disminución de su presencia.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a los proyectos de investigación PRI06A190 y PRI BS10008 financiados por el Gobierno Regional de Extremadura (España) y la Fundación Social de Europa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anderson K, Morris G, Kennedy H, et ál. Aspergillosis in immunocompromised paediatric patients: associations with building hygiene, design, and indoor air. *Thorax*. 1989;51:256-61.
2. Sherertz RJ, Belani A, Kramer BS, et ál. Impact of air filtration on nosocomial *Aspergillus* infections. Unique risk of bone marrow transplant recipients. *Amer. J. Med.* 1987;83:709-18.
3. Bodey G, Buelmann B, Duguid W et ál. Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. *Eur. J. Clin. Microbiol Infect Dis.* 1992;11:99-109.
4. Tormo R, Gonzalo MA, Muñoz AF, Silva I. Pollen and spores in the air of a hospital out-patient ward. *Allergol et Immunopathol.* 2002;30:232-8.
5. Falvey DG, Streifel AJ. Ten-year air sample analysis of *Aspergillus* prevalence in a university hospital. *Journal of Hospital Infection.* 2007;67:35-41.
6. Fournel I, Sautour M, Lafon I, et ál. Airborne *Aspergillus* contamination during hospital construction works: Efficacy of protective measures. *American Journal of Infection Control.* 2010;189-94.
7. Dasonville C, Demattei C, Detaint B, et ál. Assessment and predictors determination of indoor airborne fungal concentrations in Paris newborn babies' homes. *Environmental Research.* 2008;108:80-5.
8. Fernández-Rodríguez S, Maya-Manzano JM, Ortega-Garrido A, et ál. Evaluating fungi indoor presence in homes through viable and non-viable sampling. *Boletín Micológico.* 2011;26:2-9.
9. Sautour M, Sixt N, Dalle F, et ál. Profiles and seasonal distribution of airborne fungi in indoor and outdoor environments at a French hospital. *Science of the Total Environment.* 2009;407:3766-71.
10. Lee T, Grinshpun SA, Martuzevicius D, et ál. Culturability and concentration of indoor and outdoor airborne fungi in six single-

- family homes. *Atmospheric Environment*. 2006;40:2902-10.
11. Moradi MG, Hokmabadi H, Mirabolfathy M. Density Fluctuations of Two Major *Aspergillus* Species Airborne Spores in Pistachio Growing Regions of Iran. *Int. J. Nuts Related Sci*. 2010;1:54-64.
12. Dhanze H, Patil RD, Khurana SK, Mane BG. Prevalence *Aspergillus* spp. On shell eggs. *J. Vet. Pub. Hlth*. 2011;9(2):119-21.
13. Sharma K, Agarwal M. Prevalence of airborne *Aspergillus* in the air of monuments: Impact on biodeterioration and human health. *Curr. Bot*. 2011;2(1):25-6.
14. Ramgudwar V. Heavy Metal Tolerance of Fungal Isolates from Steel Industry Effluent Site. *Research in Plant Biology*. 2013;3(4):14-7.
15. Mullins J, Harvey R, Seaton A. Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus* (Fres). *Clin. Allergy*. 1976;6:209-17.
16. Chakraborty S, Kumar Sen S, Bhattacharya K. Indoor and outdoor aeromycological survey in Burdwan, West Bengal, India. *Aerobiologia*. 2000;16:211-9.
17. Adhikari A, Kumar Sen S, Gupta-Bhattacharya S, Chanda S. Airborne viable non-viable and allergenic fungi in a rural agricultural area of India: a 2-year study at five outdoor sampling stations. *Science of the Total Environment*. 2004;326:123-41.
18. Pyrrri I, Kapsanaki-Gotsi E. A comparative study on the airborne fungi in Athens, Greece, by viable and non-viable sampling methods. *Aerobiologia*. 2007;23:3-15.
19. Stępańska D, Wołek J. Intradivisional periodicity of fungal spore concentrations (*Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Didymella*, *Ganoderma*) in Cracow, Poland. *Aerobiologia*. 2009;25:333-40.
20. Mallo, A., Nitiu, D., Gardella, M. Airborne fungal spore content in the atmosphere of the city of La Plata, Argentina. *Aerobiologia*. 2011;27:77-84.
21. Grinn-Gofroń A. Airborne *Aspergillus* and *Penicillium* in the atmosphere of Szczecin, (Poland) (2004–2009). *Aerobiologia*. 2011;1:67-76.
22. Sabariego S, Díaz de la Guardia C, Alba F. The effect of meteorological factors on the daily variation of airborne fungal spores in Granada (southern Spain). *International Journal of Biometeorology*. 2000;44:1-5.
23. Stępańska D, Wołek J. Variation in fungal spore concentrations of selected taxa associated to weather conditions in Cracow, Poland, in 1997, *Aerobiologia*. 2005;21:43-65.
24. Fang Z, Ouyang Z, Hu L, et al. Culturable airborne fungi in outdoor environments in Beijing, China *Science of the Total Environment*. 2005;350:47-58.
25. O'Gorman CM, Fuller HT. Prevalence of culturable airborne spores of selected allergenic and pathogenic fungi in outdoor air. *Atmospheric Environment*. 2008;42:4355-68.
26. Pyrrri I, Kapsanaki-Gotsi E. Diversity and annual fluctuations of culturable airborne fungi in Athens, Greece: a 4-year study. *Aerobiologia*. 2012;28:249-62.
27. Abdel Hameed AA, Khoder MI, Ibrahima YH, et al. Study on some factors affecting survivability of airborne fungi. *Science of the Total Environment*. 2012;414:696-700.
28. Sen B, Asan A. Fungal flora in indoor and outdoor air of different residential houses in Tekirdag City (Turkey): Seasonal distribution and relationship with climatic factors. *Environ Monit Assess*. 2009;151:209-19.
29. Reanprayoon P, Yoonaiwong W. Airborne concentrations of bacteria and fungi in Thailand border market *Aerobiologia*. 2012;28:49-60.
30. Guinea J, Peláez T, Alcalá L, Bouza E. Evaluation of Czapeck agar and Sabouraud dextrose agar for the culture of airborne *Aspergillus conidia* *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2005;52:333-334.