

METODO DI CAMPIONAMENTO E CONTEGGIO DEI GRANULI POLLINICI E DELLE SPORE FUNGINE AERODISPERSE

(Method for sampling and counting of airborne pollen grains and fungal spores)

Progetto di norma proposto alla Commissione Ambiente UNI dal Dr. Paolo Mandrioli
codice progetto ufficiale U53000810

Revisione a cura del GL12
7 novembre 2000

1 - SCOPO

Lo scopo del presente metodo è descrivere la procedura per la misura della concentrazione dei granuli pollinici e delle spore fungine disperse in atmosfera.

2 – CAMPO DI APPLICAZIONE

Il Metodo si applica per indagini sia in atmosfera libera che in ambienti confinati.

Il Metodo è applicabile nell'intervallo di concentrazione compreso fra 0 e 10^4 particelle per metro cubo di aria.

3 – PRINCIPIO DEL METODO

L'aria da analizzare viene prelevata da una pompa aspirante e, attraverso una fenditura, viene diretta su di una superficie di campionamento opportunamente trattata sulla quale le particelle contenute nel volume d'aria terminano la loro traiettoria depositandosi per impatto. La superficie di campionamento viene successivamente esaminata al microscopio ottico per l'identificazione ed il conteggio delle particelle catturate.

4 – STRUMENTI, ATTREZZATURE e MATERIALI

- Campionatore volumetrico tipo Hirst
- Microscopio ottico
- Conta-particelle
- Banda trasparente adesiva
- Flussimetro, pinzette, bisturi, vetrini da microscopio, vetrini coprioggetto, etichette.
- Soluzione di silicone, gelatina glicerinata

5 - CARATTERISTICHE DEL CAMPIONATORE.

L'apparecchio che applica il principio di campionamento sopra riportato è quello proposto da Hirst (1952) e raccomandato nel 1972 dall'International Biological Program (Benninghoff, 1972).

In commercio esistono alcuni modelli di campionatore denominati Spore Trap o Pollen Trap (Macher et al., 1995). Questi apparecchi sono costruiti in metallo leggero, trattato in modo da prevenire la corrosione da agenti atmosferici; entrambi i campionatori (Fig. 1) hanno identiche caratteristiche tecniche: portata, dimensioni dell'area di deposizione, velocità di avanzamento della superficie di deposizione ed efficienza di cattura (Grinshpun et al., 1994; Griffiths et al., 1994; Mullins et al., 1997).

6 – PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO DEL CAMPIONATORE

Il campionamento avviene per impatto.

Nella versione per l'esterno deve esserci una visiera (od ala) parapioggia e l'ala di direzionamento vento. Tutti i sistemi di monitoraggio devono possedere caratteristiche di resistenza agli agenti atmosferici.

SCHEMA COSTRUTTIVO

- Disegno schematico (in allegato)
- Sezione verticale in corrispondenza dell'orifizio
- Disegno quotato

L'apparecchio consta di quattro parti fondamentali:

- pompa aspirante
- fenditura di aspirazione
- superficie di deposizione
- dispositivo di avanzamento della superficie

Pompa aspirante

Una pompa deve garantire il flusso costante. La portata, corrispondente alla capacità respiratoria, deve essere garantita a 10 litri d'aria per minuto, pari a $14,4 \text{ m}^3$ in 24 ore, a tps e 50% di umidità relativa. Il controllo della portata deve essere garantito su tutto il periodo di misura e su periodi lunghi di campionamento. Va ricordato che il monitoraggio può essere effettuato in esterno e negli ambienti interni, con continuità giornaliera o settimanale.

E' prioritario che durante tutto il tempo di misura venga garantito il trascinarsi della superficie di campionamento.

Fenditura di aspirazione

Il corpo deve essere provvisto di una fenditura di aspirazione con dimensioni $2 \times 14 \text{ mm}$. La lunghezza del condotto di aspirazione non deve superare i 15 mm . La fenditura deve essere controllata ad ogni sostituzione della superficie di deposizione in modo da verificarne l'efficienza e la pulizia (un nastro di tessuto di dimensioni opportune imbevuto di solvente, come alcool o acetone, va fatto passare periodicamente attraverso la fenditura per l'asportazione dell'eventuale deposito di polvere).

Superficie di deposizione

La superficie di deposizione deve essere di lunghezza adeguata al montaggio su vetrini portaoggetto con dimensioni $26 \times 76 \text{ mm}$.

La distanza fra la superficie d'impatto delle particelle ed il lato interno della fenditura deve essere di $0,7 \pm 0,05 \text{ mm}$ e deve risultare costante durante tutto il periodo di campionamento; è importante verificare di tanto in tanto questa distanza che determina, a parità di altre condizioni, l'efficienza di raccolta del campionatore, detta efficienza di cattura.

Dispositivo di avanzamento della superficie

Il dispositivo deve garantire una velocità di avanzamento deve essere di $2 \pm 0,02 \text{ mm per ora}$.

Raccomandazioni di installazione

Per una corretta installazione dell'apparecchio di campionamento il corpo deve poter essere saldamente ancorato al terreno, in modo tale che la fenditura si trovi ad almeno 1 m di altezza.

7 - INSTALLAZIONE DEL CAMPIONATORE

Il campionatore deve essere collocato in un punto in cui la circolazione atmosferica locale non risenta della presenza di ostacoli vicini.

L'apparecchio dovrà essere installato preferibilmente al centro di terrazzi posti alla sommità di edifici con altezza compresa fra i 15 e i 20 m dal suolo e lontano da muri e protezioni.

Nel caso di misure in ambienti confinati, l'apparecchio dovrà essere posizionato a seconda dell'obiettivo che ci si pone nella misura da effettuare.

L'orifizio del campionatore dovrà trovarsi al di sopra della linea del parapetto del terrazzo in modo da consentire una raccolta influenzata nel minore dei modi dalle strutture vicine. Sarà buona norma annotare l'ubicazione ed il tipo di vegetazione presente nelle immediate vicinanze dell'edificio sul quale viene collocato il campionatore, allo scopo di interpretare la provenienza del polline trovato sul vetrino.

Nella scelta del punto di campionamento all'esterno, vanno privilegiate zone lontane da parchi pubblici e da forti emissioni atmosferiche industriali.

8 - PROCEDIMENTO

Preparazione della superficie di campionamento

Il supporto di campionamento, vetrino o film plastico, trasparente non idrofilo, deve essere preparato apponendo un sottile film di fluido al silicone che conferisce alla superficie proprietà adesive, trattenendo le particelle depositate ed evitando la perdita delle medesime per rimbalzo o ritrascinamento da parte del flusso d'aria.

A questo scopo viene impiegata una soluzione al 3% di fluido al silicone (polydimethylsiloxanes) (viscosità 2.500.000 centistokes) in tetracloruro di carbonio (Mandrioli et al., 1978).

Il fluido siliconico ad alta viscosità mantiene inalterate le sue proprietà fisiche e chimiche entro un intervallo di temperatura compresa fra - 20 e +125 °C (Comtois et al., 1997).

La soluzione va distesa uniformemente con un pennello abbondantemente intriso, passando sul nastro una sola volta lentamente, ma con decisione. La rapida evaporazione del solvente rende omogenea la distribuzione del fluido siliconico anche in eccesso di soluzione. La scarsa quantità di soluzione applicata può compromettere il risultato di campionamento. E' consigliabile effettuare questa operazione sotto cappa aspirante o in un ambiente ventilato e privo di polvere.

Il pennello deve essere morbido e piatto, di 15 mm di larghezza per pittura (tipo pelo di martora). L'impiego di pennelli di maggiori dimensioni e con setole dure (es. comuni pennelli da verniciatura) producono strati di spessore non omogeneo. I supporti di campionamento (vetrino o nastro) così preparati, debbono essere conservati al riparo della polvere fino al momento dell'impiego (non hanno scadenza).

Il nastro deve aderire perfettamente al sistema di trascinamento per evitare variazioni di efficienza di campionamento causate dalla non uniformità della distanza fra il nastro e la fenditura che provocherebbe quindi variazioni del flusso d'aria.

Preparazione dei campioni

Su normali vetrini da microscopio si stendono alcune gocce di gelatina glicerinata (10 gr di gelatina + 60 ml di acqua + 55 ml di glicerina + 2 gr circa di fenolo + alcune gocce di fucsina basica in soluzione acquosa satura) (Ogden et al., 1974) preventivamente fusa in bagnomaria, sulle quali vi si adagia il segmento di nastro (con lo strato siliconato rivolto verso l'alto), quindi si prende un coprioggetto, vi si applicano alcune gocce di gelatina, lo si capovolge rapidamente e lo si depone sul nastro sottostante. Le lenti del microscopio, i vetrini copri- e portaoggetto, la gelatina glicerinata ed il nastro campionato hanno lo stesso indice di rifrazione per ridurre la dispersione della luce ed ottenere così una buona visione.

E' consigliabile effettuare questa operazione mantenendo il vetrino a temperatura sufficientemente elevata (40-50 °C) per favorire la fluidità della gelatina e la eliminazione delle bolle d'aria. Una piastra

termostata o un coperchio metallico piano posto su di un recipiente contenente acqua bollente, faciliteranno questa fase della preparazione.

Infine viene apposta una piccola etichetta di identificazione sul lato sinistro del vetrino che viene lasciato asciugare in posizione orizzontale per qualche ora prima di effettuare i conteggi al microscopio. In questo modo il nastro rimane inglobato fra due strati di gelatina e due vetrini (Fig. 5).

9 - ESAME DEI CAMPIONI

I campioni così preparati vengono esaminati al microscopio ottico a ingrandimento variabile. Nei conteggi di routine viene consigliato il 250X, tuttavia il 400X viene utilizzato correntemente da molti operatori soprattutto nella fase di apprendimento del riconoscimento delle particelle.

Il conteggio dei granuli pollinici non viene generalmente effettuato sull'intera superficie di campionamento di 14x48 mm, ma viene effettuato su una frazione dell'intero deposito di particelle (conteggio statistico).

A questo scopo, il vetrino viene esaminato su linee orizzontali parallele (lato maggiore del vetrino) con la tecnica dei campi di microscopio tangenti fra di loro o del campo di microscopio continuo (Fig.6).

Il conteggio per campi di microscopio tangenti si realizza seguendo tale procedura:

- effettuare la conta in tutto il campo osservato
- traslare da destra verso sinistra il vetrino mediante rotazione della vite micrometrica con un unico step; lo spostamento viene effettuato in modo tale che un punto di riferimento sull'equatore del campo visivo passi da destra a sinistra. Il punto va scelto esclusivamente sull'equatore in quanto tale zona risulta essere l'unica sempre visibile nel campo.
- leggere successivamente il "nuovo" campo visibile.

Il conteggio per strisciata continua si realizza seguendo tale procedura:

- effettuare la conta in tutto il campo osservato
- traslare da destra verso sinistra il vetrino mediante rotazione continua della vite micrometrica.
- leggere progressivamente senza fermarsi.

Il primo metodo permette di esaminare un certo numero di aree circolari tangenti fra di loro e disposte su tutta la lunghezza della strisciata. Il secondo metodo permette di esaminare l'intera striscia poiché l'area esaminata corrisponde ad un rettangolo con lato maggiore pari alla lunghezza della strisciata ed il lato minore pari al diametro del campo di microscopio.

Si è stabilito di scegliere linee di lettura orizzontali in quanto la variazione di concentrazione durante il giorno avviene lungo questo asse (senso di scorrimento del nastro nel campionatore); viceversa, le letture effettuate solo per linee verticali (parallele al lato minore del vetrino) sono fortemente influenzate dalla scelta della posizione delle linee stesse (es.: una linea verticale di lettura può trovarsi casualmente in corrispondenza di un punto di alta concentrazione di particelle) e di conseguenza influenzano il risultato finale espresso come concentrazione media giornaliera. Si assume che i conteggi effettuati in campi di microscopio che si trovano sulla stessa linea verticale, indichino statisticamente lo stesso numero di particelle; ciò è vero se il film di silicone è stato applicato uniformemente.

La posizione delle linee orizzontali deve essere distribuita uniformemente e non deve coincidere con i bordi superiore ed inferiore della superficie di deposizione delle particelle.

Il numero minimo di linee orizzontali di lettura deve corrispondere ad una superficie pari a non meno del 20% della superficie campionata (Fig. 6).

L'accuratezza della misura sarà proporzionale al numero di linee di lettura ed alla concentrazione delle particelle; ovvero: la differenza fra valore vero e valore calcolato sarà maggiore in condizioni di bassa concentrazione (poche particelle per campo) e di basso numero di linee esaminate.

I totali delle conte, suddivisi per specie polliniche, vengono riportati su modulo di conteggio. Normalmente, lo scopo finale del conteggio è il calcolo del valore medio giornaliero di un certo tipo di polline, ma è possibile, con lo stesso schema di lettura, ricavare valori di concentrazione media oraria predisponendo opportunamente il sistema di annotazione dei risultati di ciascuna lettura.



La conversione dei dati da conte a concentrazione (numero di pollini per m³ d'aria) può essere fatta automaticamente attraverso l'uso di semplici programmi di calcolo, oppure manualmente con la procedura qui di seguito descritta.

10 - CALCOLO DELLA CONCENTRAZIONE POLLINICA ATMOSFERICA

I dati sono espressi come concentrazione media giornaliera considerando il giorno dalle 0 alle 24 (n/m³). I valori di conta pollinica, relativi alla superficie esplorata, vengono estrapolati per l'intera superficie di campionamento.

Per eseguire questo calcolo occorre conoscere il diametro del campo di microscopio utilizzato per tutte le letture eseguite sul campione. La misura del diametro del campo di microscopio può essere fatta correttamente solo mediante l'uso del micrometro oggetto che consiste in una scala micrometrica fotoincisa e montata su vetrino da microscopio (generalmente 2 mm divisi in 200 parti, pari a 10 micrometri per divisione). Il valore del diametro dipende dall'ingrandimento utilizzato.

Dati necessari per il calcolo:

- diametro del campo di visione al microscopio espresso in mm (es. 0.6 mm);
- numero di linee orizzontali di lettura;
- numero dei granuli, per tipo di polline, identificati sull'intera area esaminata (es. 250 pollini di graminacee);
- metodo di lettura (per campi tangenti o per strisciata continua); - area di campionamento (14x48 mm²);
- volume d'aria campionata (14,4 m³ per giorno).

Esempio di calcolo

Letture per campi tangenti:

- area del campo di microscopio (es. diametro 0,6 mm):
 $r^2(\text{in mm}) \times 3,14$ es. $0,3 \times 0,3 \times 3,14 = 0,28 \text{ mm}^2$

- numero di campi tangenti esaminati sul vetrino (es. 4 strisciate):

lunghezza linea di lettura (in mm), diviso per il diametro del campo di lettura (in mm), moltiplicato per il numero di strisciate

es. $48 / 0,6 \times 4 = 320$

- area esaminata totale:

n. campi di lettura moltiplicato l'area del campo

es. $320 \times 0,28 = 89,6 \text{ mm}^2$

Letture per strisciata continua:

- area totale esaminata:

di diametro campo (in mm) x 48 x n.strisciate

es.: $0,6 \times 48 \times 4 = 115,2 \text{ mm}^2$

Rapporto area campionata/area esaminata

es. $(14 \times 48) / 89,6 = 7,5$ (metodo tangente)
 $(14 \times 48) / 115,2 = 5,8$ (metodo continuo)

In questo esempio l'area esaminata è $1/7,5$ oppure $1/5,8$ dell'area di campionamento.

Se sono stati contati 250 pollini di Graminacee su tutta l'area esaminata, statisticamente, col metodo tangente, saranno presenti nell'intero campione $250 \times 7,5 = 1875$ pollini di Graminacee (pollini letti \times rapporto campionato/esaminato) contenuti in $14,4 \text{ m}^3$, pari a $1875 / 14,4 = 130,2$ pollini per m^3 per giorno; analogamente si procede per il metodo di lettura continua.

Il campionatore di tipo Hirst campiona 600 litri/ora, pari a 14.400 litri al giorno o $14,4 \text{ m}^3/\text{giorno}$.

In pratica, definito il diametro di campo di microscopio, tutti gli altri valori ad eccezione dei conteggi rimangono costanti; utilizzeremo quindi lo stesso fattore di conversione per calcolare tutte le concentrazioni medie giornaliere.

Calcolo del fattore di conversione:

rapporto area campionata/area esaminata diviso il volume giornaliero

es. $7,5 : 14,4 = 0,52$

Nel nostro esempio per le Betulacee sono stati contati 100 grani sulle quattro strisciate di un vetrino giornaliero ($100 \times 0,52 = 52$ pollini/ m^3); analogamente eseguiremo il calcolo per le Urticacee risultate 200 grani ($200 \times 0,52 = 104$ pollini/ m^3).

Nelle procedure di calcolo sopra esposte viene consigliata l'approssimazione del primo decimale e non l'arrotondamento all'intero, in quanto il valore finale, che esprime la concentrazione pollinica atmosferica, può assumere un significato completamente differente quando i valori sono inferiori a 1; in questo caso infatti la conservazione della prima cifra decimale ci consente di rivelare la presenza di un tipo di polline che altrimenti scomparirebbe dai risultati. Questa procedura è molto importante, sia nell'uso del calcolo manuale che in quello con calcolo automatico, soprattutto all'inizio della fase di dispersione atmosferica del polline.

11 – PRECISIONE ED ACCURATEZZA DELLA MISURA

La misura della concentrazione atmosferica di pollini e spore, espressa in particelle per metro cubo d'aria, è sottoposta ad errori introdotti nelle seguenti fasi operative:

- conteggio al microscopio delle particelle
- calcolo della concentrazione atmosferica

Nella fase di conteggio, l'errore è determinato dall'accuratezza del conteggio stesso e dall'incertezza nell'identificazione ed è inversamente proporzionale al numero delle particelle contate. La precisione relativa a questa fase viene stimata nell'ordine del 10%.

Nella fase di calcolo della concentrazione, nel passaggio cioè dai valori di conteggio ottenuti per ciascuna particella a quelli stimati, attraverso il calcolo, per tutta la superficie di campionamento, viene individuato un errore che dipende sia dal numero di particelle contate che dal numero di campi esaminati o, più correttamente, dal rapporto superficie esaminata/superficie campionata.

La relazione per determinare l'errore sul valore stimato di concentrazione è stata ricavata sperimentalmente modificando la relazione proposta da Comtois et al., (1999) e che risulta essere di tipo esponenziale negativa:

$$E\% = 128 - 34,2 (\ln \text{CONTEGGIO}) + 2,3 (\ln \text{CONTEGGIO})^2$$

Esempio:

CONTEGGIO = 10 pollini (~5 p/m ³)	E% = 62%
CONTEGGIO = 100 pollini (~50 p/m ³)	E% = 20%
CONTEGGIO = 1000 pollini (~500 p/m ³)	E% = 2%

L'errore dovuto alla fase di conteggio (10%) risulta influire trascurabilmente (< 0,1%) per concentrazioni superiori a 500 particelle per metro cubo, mentre è del 5% per concentrazioni attorno al 5-10%.

Da quanto sopra esposto, ne derivano le seguenti caratteristiche della misura:

Precisione

Essa è determinata nella fase di conteggio ed è valutata attorno al 10% del valore di conteggio relativo ad ogni tipo di particella.

Specificità

Essa dipende dalla capacità dell'operatore a riconoscere correttamente un certo tipo di granulo pollinico presente nel campione.

Assumendo che l'operatore sia perfettamente addestrato, si considera specificità 100%.

Limite di rilevabilità

Esso dipende dal sistema di campionamento che nel nostro caso lavora correttamente fino ad una concentrazione di 10⁴ particelle per metro cubo d'aria.

Il metodo permette di rivelare particelle nell'intervallo da 1 a 10⁴ particelle per metro cubo d'aria.

Sensibilità

Parametro non adeguato a questo metodo in quanto i valori relativi alla misura non sono letti da uno strumento.

Accuratezza

Dipende dalle dimensioni del campione che in questo caso è rappresentato, sia dalla percentuale di superficie esaminata che dalla densità di particelle dello stesso tipo (pollini o spore) presenti nella stessa superficie.

Essa è rappresentata dalla relazione:

$$E\% = 128 - 34,2 (\ln \text{CONTEGGIO}) + 2,3 (\ln \text{CONTEGGIO})^2$$

dove ln è il logaritmo naturale e CONTEGGIO è il numero di particelle di un certo tipo contate nella superficie esaminata.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

E' consigliabile non effettuare campionamenti non presidiati per tempi superiori alla settimana.

E' necessario che lo strumento sia dotato a corredo di un flussimetro specifico che lavora in depressione per controllare la corretta portata di campionamento. Il flussimetro non deve avere perdite di carico tali da perturbare la misura stessa.



E' estremamente importante impiegare fluido siliconico della viscosità indicata poiché soluzioni di altri tipi di silicone, come olii e grassi, danno risultati completamente differenti.



REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

- Benninghoff, W.S. and Edmonds R.L. (1972). Ecological Systems Approaches to Aerobiology. I. Identification of Component Elements and their Functional Relationships. *International Biological Program. Aerobiology Program*. US/IBP Aerobiology Program Handbook N.2, Univ. of Michigan, Ann Arbor.
- Comtois, P. and Mandrioli, P. (1997). Pollen capture media: a comparative study. *Aerobiologia*, vol.13, 3:149-154.
- Comtois P., Alcazar P. and Neron D. (1999). Pollen counts statistics and its relevance to precision. *Aerobiologia*, vol. 15,1 (in stampa).
- Griffiths W.D. and De Cosemo G.A.L. (1994). The Assessment of Bioaerosols: a critical review. *J. Aerosol Sci.*, Vol. 25, No. 8, pp. 1425-1458.
- Grinshpun S.A., Chang C-W, Nevalainen A. and Willeke K. (1994). Inlet Characteristic of Bioaerosol Samplers. *J. Aerosol Sci.*, Vol. 25, No. 8, pp. 1503-1522.
- Hirst, J.M. (1952). An automatic volumetric spore trap. *Ann. Appl. Biol.* 39:257-265.
- Macher J.M., Chatigny M.A. and Burge H.A. (1995). Sampling Airborne Microorganisms and Aeroallergens. In *Air Sampling Instruments for evaluation of atmospheric contaminants*, cap. 23. 8th Edition ACGIH, Cincinnati, Ohio.
- Mandrioli, P. e Puppi, G. (1978). Pollini allergenici in Emilia-Romagna. *Collana Studi e Documentazione n.13*, Dip. Ambiente e territorio R.E.R., Bologna, 79 pp.
- Mandrioli, P. (1994). Metodica di campionamento dei granuli pollinici e delle spore fungine aerodisperse. In Monitoraggio aerobiologico in Emilia-Romagna, cap.1,9-19. *Collana "Contributi" n.30*, Regione Emilia-Romagna.
- Mullins J. and Emberlin J. (1997). Sampling Pollens. *J. Aerosol Sci.*, Vol. 28, No. 3, pp. 365-370.
- Ogden, E.C., Raynor,G.S., Hayes, G.V., Lewis, D.M., Haines, J.H. (1974). *Manual for sampling airborne pollen*. Hafner Press, N.Y., 182 pp.

DIDASCALIA FIGURE

Fig. 1 Preparazione del campione giornaliero: il nastro di campionamento (N), rimane inglobato fra due sottili strati di gelatina glicerinata (G) posti sul vetrino portaoggetto (V) e sotto il vetrino coprioggetto (C).

Fig. 2 - Il conteggio dei granuli pollinici viene effettuato sul vetrino in modo statistico: la lettura avviene infatti su un certo numero di linee trasversali (L) lunghe 48 mm, su campi di microscopio tangenti (T) o su strisciata continua (C) come mostrato in figura.

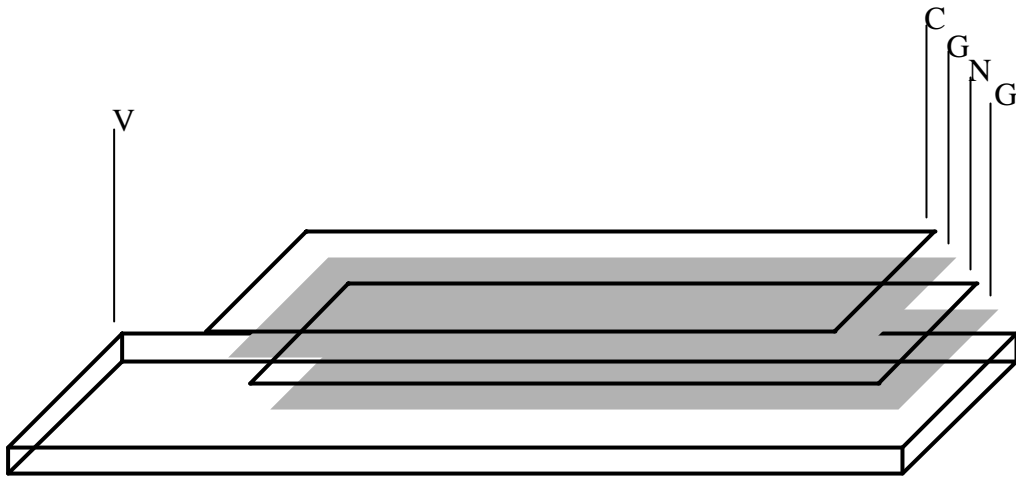


Fig. 1

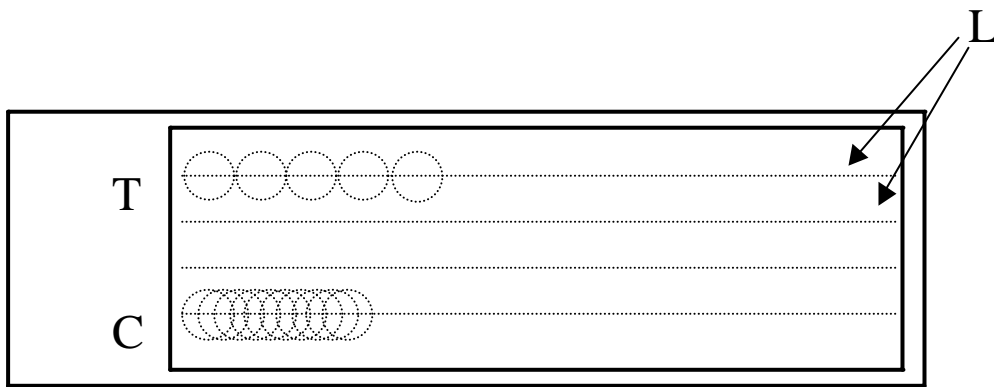


Fig. 2