

CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL AIRE EN LA XILOTECA DE MADERAS CUBANAS JULIÁN ACUÑA DEL INAF

MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION IN THE AIR AT THE XYLOTECAL CUBAN WOODS OF JULIÁN ACUÑA INAF

LIC. CLAUDIA M. TORRES-FERNÁNDEZ¹, LIC. IRENE DE LA ROSA-SÁNCHEZ¹ Y TÉC. NATIVIDAD TRIGUERO-ISSASI¹

Instituto de Investigaciones Agro-Forestales. UCTB Investigación e Innovación Tecnológica,
Grupo Medio Ambiente. Calle 174 no. 1723 e/ 17B y 17C, Siboney, Playa, La Habana, Cuba,
claudiam@forestales.co.cu

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue determinar el nivel de contaminación microbiológica del aire presente en el ambiente de la Xiloteca de Maderas Cubanas Julián Acuña perteneciente al Instituto de Investigaciones Agro-Forestales. Para ello se empleó el método de colecta Omeliansky. Se obtuvo un total de 430 colonias bacterianas, 58 colonias fúngicas y cinco levaduras para 112, 15,9 y 1,04 unidades formadoras de colonias por metro cúbico de aire (ufc/m³), respectivamente, con una frecuencia de aparición del 46,2 % para bacterias, 26,16 % para hongos y 10,8 % para levaduras, clasificándose la xiloteca según Omeliansky en no contaminada para ninguno de los microorganismos aislados.

Palabras claves: Xiloteca, hongos, bacterias, Omeliansky, contaminación microbiológica.

ABSTRACT

The objective of the work was to determine the level of microbiological contamination of the air present in the environment of the Julián Acuña Cuban Wood Xiloteca belonging to the Institute of Agro-Forestry Research. For this, the Omeliansky collection method was used. A total of 430 bacterial colonies, 58 fungal colonies and 5 yeasts were obtained for 112, 15.9 and 1.04 colony forming units per cubic meter of air (cfu / m³) respectively with an appearance frequency of 46.2% for bacteria, 26.16% for fungi and 10.8% for yeasts, the xylotheal according to Omeliansky being classified as not contaminated for any of the isolated microorganisms.

Key words: xylocium, fungi, bacteria, Omeliansky, microbiological contamination

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la contaminación microbiana en el aire interior de los locales es de gran interés por la importancia que tienen los microorganismos para la salud de las personas (Toivola *et al.*, 2002 y Eagle Industrial Hygiene Associates, 2004) y en el deterioro de diferentes materiales (Florian, 2003). Dadas las características del clima, los países tropicales poseen un elevado nivel de esporas fúngicas en el aire. Esta condición, unida a los elevados contenidos de humedad en él, favorecen la deposición de las mismas sobre los sustratos, y por tanto

su desarrollo, propiciándose así el biodeterioro de los soportes tanto de origen orgánico como inorgánico (Vaillant, 1996 y Florian, 2003).

Por otro lado, aunque las bacterias desempeñan un papel más limitado en el biodeterioro de los soportes comparado con los hongos, pues requieren condiciones de humedad más elevada, se encuentran ampliamente difundidas en ambientes de interiores y pueden resultar muy dañinas por las afectaciones que pueden causar a la salud (Vaillant y Valentín, 1996) (Valentín *et al.*, 1997).

La Xiloteca Julián Acuña Galé posee 21,45 m² de muestras maderables que incluyen especies forestales, frutales y medicinales. Se encuentra ubicada en la Unidad de Ciencia y Tecnología de Base de Investigación e Innovación Tecnológica (UCTB IIT) del Instituto de Investigaciones Agro-Forestales (INAF). Fue creada en 1970 y está constituida por ejemplares de especies maderables que crecen en Cuba. En ella se ha conservado durante mucho tiempo determinados prototipos de la biodiversidad arbórea cubana. Por todo lo anteriormente expuesto se hace apremiante conocer el estado de conservación de las muestras circundantes que allí se almacenan desde el año de su creación, así como la calidad microbiana del aire.

Por ello, el objetivo del trabajo es determinar el nivel de contaminación microbiológica del aire presente en el ambiente de la Xiloteca de Maderas Cubanas Julián Acuña del INAF.

MATERIALES Y MÉTODOS

• Descripción del local

El estudio se realizó en el horario comprendido de 10:00 a.m. a 12:00 p.m. en el mes de octubre de 2016. La xiloteca posee un área de 21,45 m², y en ella se almacenan alrededor de 600 muestras maderables de especies frutales, forestales, medicinales, entre otras.



Figura 1. Vista general de la Xiloteca.

• Muestreo microbiológico ambiental

El muestreo microbiológico ambiental se llevó a cabo siguiendo el método de sedimentación descrito por Omeliansky (modificado por Bogomolova, 2009). Para ello, placas Petri que contenían los medios Agar Extracto de Malta (AEM) para el aislamiento de hongos y Agar Tryptona Soya (TSA) para bacterias, se colocaron expuestos a una altura de un metro sobre el nivel del suelo durante 15 minutos. Se muestrearon cinco puntos por triplicado (las placas fueron colocadas en forma de estrella, teniendo en cuenta las dimensiones del local). Posteriormente, las

placas con AEM se incubaron durante 72 h a 28 °C, y las que contenían TSA a 30 °C durante 24 horas.

• Medición de la temperatura y la humedad relativa en el momento del muestreo microbiológico

Se realizaron las mediciones de ambos parámetros en cada uno de los puntos muestreados empleando un termohigrómetro convencional determinando posteriormente la media.

• Determinación de las unidades formadoras de colonias por metro cúbico de aire

Concluida la incubación de los microorganismos, se realizó el conteo de las colonias fúngicas y bacterianas emergentes en los medios de cultivo y se determinaron las uni-

dades formadoras de colonia por metro cúbico de aire (UFC/m³), teniendo en cuenta la ecuación descrita por Omeliansky (Bogomolova, 2009).

$$\text{Número de UFC/m}^3 \text{ de aire} = \text{Número de colonias} \times \text{factor K}$$

donde:

Número de colonias equivale a la media total de las colonias que se contabilizaron en la xiloteca.

Factor K, en este caso, es igual a 80, pues según Bogomolova (2009), este es el factor que se emplea para placas Petri de 90 mm de diámetro que fueron las usadas en el experimento.

Tabla 1. Categorías de contaminación (Bogolova y Kertadelli, 2009)

Categoría de contaminación	ufc/m ³		Hongos como ufc/g de polvo
	Bacterias	Hongos	
Muy baja	< 50	< 25	< 10 000
Baja	< 100	< 100	< 20 000
Intermedia	< 500	< 500	< 50 000
Alta	< 2000	< 2000	< 120 000
Muy Alta	> 2000	> 2000	< 120 000

Tabla 2. Grados de contaminación (Bogolova y Kertadelli, 2009)

> 1500 ufc/m ³	Altamente contaminado
= 1000-1500 ufc/m ³	Contaminado
= 750-1000 ufc/m ³	Ligeramente contaminado
= 500-750 ufc/m ³	Poco contaminado
= 100-500 ufc/m ³	No contaminado

- Identificación de los microorganismos aislados

Se realizó según los manuales especializados de identificación taxonómicas (Barnet y Hunter, 1987 y Raper y Fennell, 1965). Para la identificación bacterias se realizaron las pruebas bioquímicas descritas en el Manual de Bergeys (Manual de Bergeys, 1996, 1997).

- Determinación de la distribución relativa (frecuencia de aparición) de las colonias

Este análisis se realizó de acuerdo con Smith (1987).

donde:

DR es la densidad relativa

- Determinación cualitativa de la capacidad lignolítica, celulolítica y la producción de pigmentos excretados por los hongos

Para determinar el poder degradativo de las cepas sobre la lignina y la producción de pigmentos de las cepas fúngicas aisladas, se procedió a sembrarlas en un medio de cultivo cuya composición salina para 1 L fue nitrato de sodio fosfato de dipotasio 1 g, sulfato de magnesio 0,5 g, cloruro de potasio 0,5 g, sulfato ferroso 0,01 g, agar 20 g, pH = 6.

Se emplearon fuentes de carbono diferentes empleando, en un caso, papel de filtro de 4,8 cm de largo por 1 cm de ancho (equivalente a 50 mg de

papel de filtro), en otro, celulosa cristalina (1 %) y por último lignina. Como control se empleó una placa con glucosa (1 %) sin inocular. Los cultivos se incubaron a 28 °C durante 21 días.

- Determinación de la producción de ácidos por los hongos

Una suspensión de esporas de las cepas de hongos aisladas se sembró en el caldo de cultivo de composición salina similar al empleado anteriormente, pero con glucosa 1 % y pH ajustado a 7. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente durante tres días, y posteriormente se midió el pH del medio de cultivo con la ayuda de un potenciómetro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Grado de contaminación microbiana ambiental

Al analizar la concentración fúngica (*Tabla 3*) se comprobó que los valores máximos alcanzados fueron de 112,84 ufc/m³ de aire para bacterias, 15,19 ufc/m³ de aire para hongos y 1,04 ufc/m³ de aire para levaduras.

Al comparar estos valores con la escala que propone Bogomolova *et al.* (2009) para evaluar grado de contaminación del aire, se apreció que para el caso de los hongos la concentración fue de 3,79 ufc/m³, por lo que el ambiente se clasificó como No Contaminado, mientras que para las bacterias resultó de 28,56 ufc/m³; por el ambiente se clasificó como No Contaminado de igual manera.

Tabla 3. Concentración microbiana en el aire de la Xiloteca de la sede del INAF

Puntos muestreados	Concentración	Hongos bacterias (UFC/ m ³ de aire)		T (°C)	Hr (%)
Xiloteca	Máxima	58,0	430,0	30	76
	Mínima	15,2	112,0	28	74
	Media	35,0	365,0	29 ^a	75 ^a
Total	Microorganismos ¹	400,0			

¹ Indica la suma de la concentración media de hongos y bacteria.

^a Representa la media de cinco mediciones que se corresponden con los puntos de muestreo microbiológico (método diagonal).

Nota: El ANOVA de clasificación simple realizado para los diferentes puntos de muestreo en cada local resultó no significativo ($p \leq 0,05$) para las UFC/m³, tanto para hongos como para bacterias, de ahí que en el momento del muestreo las concentraciones de ambos grupos microbianos fueron homogéneas.

Estas consideraciones coincidieron con reportes recientes, que plantean que un local con un nivel menor que 1000 ufc/m³ se considera no contaminado (Rojas y Martínez, 2000).

El hecho de que se haya detectado una baja concentración de esporas fúngicas puede deberse a que existen algunas de ellas que son muy ligeras, y por tanto su sedimentación es difícil; incluso se plantea que esporas ≤ 5 micras requieren vientos mayores de 25 m/s para que puedan sedimentar (Rojas *et al.*, 2000).

Sin embargo, las células bacterianas generalmente se encuentran depositadas sobre el polvo que, al sedimentar sobre las placas Petri, las

arrastra consigo. Concentraciones microbianas similares han sido detectadas en Cuba en ambientes interiores de viviendas. Esto demuestra la necesidad de realizar muestreos sistemáticos para caracterizar la variabilidad de la microbiota (Rojas *et al.*, 2000).

Por otro lado, al observar el comportamiento de la temperatura y la humedad relativa en la xiloteca se obtuvieron valores de Hr = 75 %; T = 29 °C.

La humedad relativa del aire tiene gran importancia para la contaminación microbiana ambiental, sobre todo en el caso de los hongos, por lo que incide en el nivel de esporulación y en el diámetro aerodinámico de las esporas,

así como en la deposición de estas sobre las superficies e incluso en el sistema respiratorio de las personas (Latgé, 1999). Por ello se puede afirmar que pese a las condiciones ambientales de este local, la presencia de microorganismos fue en concentraciones mínimas (destacando que para un valor de 500 ufc/m³ se considera como poco contaminado, y el máximo encontrado en este muestreo fue de 430 ufc/m³ para bacterias), destacándose la presencia de bacterias, lo cual puede resultar riesgoso para el buen estado de conservación de las muestras de las especies maderables que allí se conservan desde 1970 y para la salud del personal que habitualmente labora en dicho local.

- Caracterización microbiana. Géneros fúngicos aislados del aire de la xiloteca

Del aire de la xiloteca se aislaron 58 colonias de hongos diferentes, las que fueron identificadas totalmente. La densidad relativa de los géneros aislados mostró que *Aspergillus* resultó el de mayor frecuencia con el 41 %, seguido de *Cladosporium* con el 40 % (Tabla 4). El género *Aspergillus* fue el de mayor predominio, por tanto, se realizó la identificación hasta especie para definir cuál era la de mayor frecuencia de aparición. *A. niger* resultó la especie predominante, con gran interés desde el punto de vista clínico (Gost *et al.*, 2003 y Zumbado, 2004) (Tabla 5).

Tabla 4. Distribución relativa o frecuencia de aparición de los géneros fúngicos aislados en los puntos estudiados en la xiloteca

Géneros fúngicos	Puntos muestreados Frecuencia de aparición %
<i>Aspergillus</i>	41
<i>Cladosporium</i>	40
<i>Alternaria</i>	10
<i>Fusarium</i>	7
<i>Curvularia</i>	2

Tabla 5. Frecuencia de aparición de las especies de *Aspergillus* aisladas en los puntos estudiados en la xiloteca

Género <i>Aspergillus</i>	Puntos muestreados Frecuencia de aparición %
<i>A. niger</i>	60
<i>A. clavatus</i>	13
<i>A. fumigatus</i> ¹	10
<i>A. flavus</i> ¹	6
<i>A. nidulans</i>	6
<i>A. versicolor</i>	5

¹ Especies de mayor interés clínico (Gost *et al.*, 2003 y Zumbado, 2004).

Al caracterizar fisiológicamente las cepas fúngicas aisladas se obtuvo que la mayoría de los hongos analizados fueron capaces de crecer a expensas del papel de filtro como única fuente de carbono (celulosa amorfa, de más fácil asimilación) y de la celulosa cristalina (de difícil asimilación), lo que indica que presentan actividad celulolítica (Tabla 6). De igual manera ocurrió con las cepas crecidas en las placas que contenían como fuente de carbono la lignina, mostrando crecimiento radial en toda la placa y evidenciando su consumo. Asimismo, un grupo elevado de estos hongos excretaron diferentes pigmentos sobre el papel, abarcando colores desde el amarillo hasta el pardo oscuro y tonos rojizos. También se evidenció que estas cepas produjeron ácidos, pues propiciaron una disminución significativa del pH del medio de cultivo. Resultados similares han sido publicados por otros autores (Corny *et al.*, 2002).

Es conocido que la pared de las esporas fúngicas está compuesta por sustancias (ej. β [1-3]-D-glucanos) que desencadenan reacciones tóxicas en el organismo de los seres humanos (Baxter *et al.*, 2001), aun cuando estas no son viables, provocando reacciones no específicas como fatiga, dolor de cabeza, irritación de ojos, nariz y garganta. Por otro lado, se conoce que tanto los géneros antes mencionados como

Alternaria, *Curvularia* y *Fusarium* también hallados en este muestreo son capaces de producir compuestos orgánicos volátiles (COV) y micotoxinas. Los COV están asociados a olores fuertes tales como a humedad y a material (papel o tela) viejo, los cuales resultan muy irritantes para el sistema respiratorio y los ojos,

provocando reacciones no específicas (Gorny *et al.*, 2002).

Asimismo, dan lugar a un ambiente enrarecido de compuestos químicos de diferentes tipos que pudieran reaccionar con la madera y otros soportes de archivo y acelerar su deterioro (Caneva *et al.*, 2000).

Tabla 6. Actividad celulolítica y lignolítica cualitativa, producción de pigmentos y de ácidos por parte de los hongos aislados del aire de la xiloteca

<i>Cepas</i>	<i>Crecimiento</i> <i>Papel de filtro celulosa cristalina lignina</i>			<i>Producción de pigmentos¹</i>	<i>pH</i>
<i>Aspergillus</i>	+++	++	+++	++	2.5
<i>Cladosporium</i>	+++	++	++	++	4.7
<i>Alternaria</i>	++	+++	+++	++	6.9
<i>Fusarium</i>	++	++	+++	+++	6.7
<i>Curvularia</i>	+++	++	++	+++	6.9

¹ La excreción de pigmentos se evidenció en la tira de papel de filtro

+++; Abundante crecimiento

++; Crecimiento moderado

+: Crecimiento pobre. También es indicativo de la presencia de pigmentos,

±: Crecimiento o producción de pigmentos muy pobre, -NO crecimiento y NO producción de pigmentos

Las micotoxinas de muchos hongos pueden ingresar al cuerpo por las vías respiratorias. Se ha registrado por lo menos un caso de síntomas neurotóxicos posiblemente relacionados con la exposición a micotoxinas transportadas por el aire en un ambiente muy concentrado debería hacerse mínima la exposición a los hongos que las producen. Por lo anterior, se sabe que los hongos son agentes que pueden afectar la salud de las personas provocándoles reacciones que generalmente se agrupan en tres categorías: reacciones alérgicas (asma, rinitis alérgica, neumonía por hipersensibilidad), infecciones en la piel (aspergilosis, micosis cutánea) y respuestas por toxicidad a determinadas sustancias (Zhuh *et al.*, 2003).

- Géneros bacterianos aislados del aire de la xiloteca

En cuanto a las bacterias aisladas, después de agruparlas por sus características culturales y de tinción (Gram), se pudo apreciar que las características morfológicas de las colonias

fueron muy variadas, por lo que para su posterior identificación taxonómica se seleccionaron aquellas colonias de mayor predominio (Manual de Bergeys, 1986). Predominaron los bacilos Gram+ esporulados (33,3 %), seguidos por cocos Gram+ (30,6 %), cocos Gram- (20,2 %) y por último bacilos Gram- (15,9 %).

El predominio de bacterias Gram positivas de estos grupos de bacterias se debe a su ingreso al interior de los locales como consecuencia de la actividad del hombre fundamentalmente, ya que muchas de ellas pueden formar parte de la piel y las mucosas del organismo (Vaillant, 1996 y Valentin *et al.*, 1997).

Entre las bacterias Gram positivas se aislaron cepas de *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Bacillus* sp. y *Streptomyces* sp. y entre las Gram negativas se identificaron *Serratia* sp. y *Enterobacter*. Los géneros *Bacillus*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* y *Streptomyces* han sido aislados por otros autores en ambientes de archivos (Vaillant, 1996 y Valentin *et al.*, 1997).

Tabla. 7 Clasificación de las bacterias aisladas según características morfológicas y tintoriales

Género bacteriano	Tinción de Gram
<i>Staphylococcus</i> sp.	Gram+
<i>Streptococcus</i> sp.	Gram+
<i>Corynebacterium</i> sp.	Gram+
<i>Bacillus</i> sp.	Gram+
<i>Streptomyces</i> sp.	Gram+
<i>Serratia</i> sp.	Gram-
<i>Enterobacter</i> sp.	Gram-

CONCLUSIONES

- Se determinó que el ambiente de la Xiloteca de Maderas Cubanas Julián Acuña del INAF no está contaminado por hongos ni por bacterias con 1 519 112,84 unidades formadoras de colonia por metro cúbico de aire de aire, respectivamente.
- *Aspergillus* fue el género fúngico que predominó en el ambiente de la xiloteca seguido de *Cladosporium*.
- Más del 95 % de las cepas fúngicas aisladas mostraron actividad celulolítica, lignolítica y produjeron ácidos y pigmentos.
- Predominaron las bacterias Gram positivas y dentro de ellas los cocos.

BIBLIOGRAFÍA

- Toivola, M. *et al.* 2002. Personal exposure and microenvironmental concentration of particles and bioaerosols. *Journal Environmental Monit* (IT) 166-174.
- Eagle Industrial Hygiene Associates. 2004. Microbial Samp2. and Analysis: molds and bacteria. Disponible en: <http://www.eagleih.cmicro.html>. Consulta: diciembre 2016).
- Florian, M.L. 2003. Water, heritage photographic materials and fungi. *Topics in Photographic Preservation* (US) 10: 60-73.
- Vaillant, M. 1996. A work aimed to protect the health of the environmental heritage conservators. *International Conferency Conservation and Restoration of Archive and Library Materials*. Pre-prints. Erice April 22nd- 29th, 137-142.
- Vaillant, M.; Valentín, N. 1996. Principios básicos de la conservación documental y causas de su deterioro, Ministerio de educación. Instituto del Patrimonio Histórico Español. p. 1095-1100.
- Valentín N.; Vaillant, M.; Guerrero, H. 1997. Programa de conservación integrado de plagas en bienes culturales de países del mediterráneo y tropical. *Apoyo* (ES) 7: 13-15.
- NRP-201. Análisis Ambiental. Método de Omeliansky. Análisis higiénico sanitario y ambiental. Métodos de ensayos microbiológicos. Vig. Marzo 1987.
- Barnett, H. L.; Hunter, B. B. 1987. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3rd Edition. Minneapolis. Burgess Publishing Co. 580 p.
- Raper, K. B.; Fennell, D. I. 1965. The genus *Aspergillus*. USA. Edit. Williams & Wilkins Company. p. 85-90
- Bergey's. 1986. *Manual of Systematic Bacteriology*, Holt (editor-in-chief). USA. Edit. Williams & Wilkins. p. 45-55.
- Bergey's. 1987. *Manual of Systematic Bacteriology*. Sneath P Mair N.S., Sharpe M.E and Holt, J. G. (eds.). London. Edit. Willi & Wilkins, Baltimore. p. 45-55.
- Smith, G. 1980. *Ecology and Field Biology*. 2nd18. Edition. New York. Harp Row. 24 p.
- Rautela, G .S. Cowling E.B. 2000. Simple culture test relative cellulolytic activity of fungi. *Applied Microbiol. Revista CENIC Ciencias Biológicas* (CU) 39: 1-2.
- Levetin, E. 2002. Bioaerosols in agricultural and out doorsetting. In: Bitton G. (Ed.) *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. New York. John Wiley and Sons. p.1-56
- Vaillant, M.; Chi, L.; Sánchez, A. I. 1989. Sobre la contaminación microbiológica existente en depósitos del Archivo Nacional. 2: 44-65.
- Gost. J. *et al.* 2003. Vigilancia y control de las infecciones originadas por gérmenes oportunistas: aspergilosis. *ANALES* (CU) 23: 185-192.
- Martínez, P. 2003. Determinación de la acidez producida por hongos contaminantes en bienes culturales. *Boletín Patrimonio y Desarrollo* (CU) 9: 3-4.
- Zumbado, H. 2004. Epidemiología y control microbiológico de infecciones. En: *Manual de Procedimientos en Microbiología Clínica*. (Isenberg H.D., Ed). Disponible en: <http://www.cariari.vcr.ac.cr/gacetapc/Epidem-Control.html>. (Consulta: marzo 2016)
- Gorny, R. L. *et al.* 2002. Fungal fragments as Indoor air bio-contaminants. *Applied Environmental Microbiology* (CA) 68: 3522-3531.
- Zhu, H. *et al.* 2003. Experimental study of indoor and outdoor airborne bacterial concentrations in Tempe. *Aerobiologia* (US) 19: 201-211.

RESEÑA CURRICULAR

Autor principal: Claudia M. Torres Fernández

Licenciada en Microbiología, Especialista IV para la Investigación y el Desarrollo, su labor investigativa ha estado dirigida en las temáticas de Fitopatología, Cambio Climático, Calidad del Aire, Plagas Forestales, Preservación de la Madera y Gestión Ambiental. Ha participado activamente en eventos nacionales e internacionales con resultados relevantes.

XILOTECA DE MADERAS CUBANAS JULIAN ACUÑA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRO-FORESTALES



La Xiloteca del Instituto de Investigaciones Agro-Forestales (INAF) fue fundada en 1970 por el ingeniero Alberto Ibáñez Drake. Está adscrita desde 1977 al Index Xylariorum Institutional Wood Collection of the World.
