

Diagnóstico micológico ambiental en depósitos de la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial

Environmental mycological diagnosis in repositories of the Cuban Office of Industrial Property

A. MOLINA¹, O. VALDÉS¹, S. BORREGO¹, D. PÉREZ² y M. CASTRO³

¹ Laboratorio de Conservación Preventiva. Archivo Nacional de la República de Cuba. Compostela n° 906 esquina a San Isidro. Habana Vieja. La Habana. Cuba.

² Laboratorio de Microbiología. Laboratorio Farmacéutico "Eduardo Reyes Canto" Calle 39 a n° 4602 e/46 y 48. Rpto. Almendares. Playa. La Habana. Cuba.

³ Departamento de conservación. Oficina Cubana de la Propiedad Industrial Picota n° 15 e/Luz y Acosta. Habana Vieja. La Habana. Cuba.

*: Corresponding author

* alian@arnac.cu; odette2005@arnac.cu; sofia@arnac.cu; daylenis@mail.com; mercedes@ocpi.cu

(Recibido: 06/10/2014; Aceptado: 25/11/2014; Publicado on-line: 05/12/2014)

Resumen

Los hongos que se desarrollan en archivos y bibliotecas pueden constituir un serio problema para la conservación documental y la salud. Dicho fenómeno se potencia en zonas de clima tropical y en edificios con sistemas de ventilación o climatización poco eficaces. Por ello, con el fin de caracterizar la micobiota aérea de la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial se ha realizado su estudio y evaluación *in vitro* de las capacidades biodeteriorantes y patogénicas de las cepas aisladas. Las muestras se tomaron empleando un biocolector SAS Súper 100. A 25 cepas (64% del total) se les determinaron cualitativamente la actividad celulolítica, amilolítica y proteolítica así como la excreción de pigmentos y de ácidos orgánicos, además se evaluó la capacidad de crecer a 37°C y producir hemolisinas. Se aislaron un total de seis géneros de hongos con predominancia de *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp. y *Penicillium* spp y dos micelios no esporulados. El 76% de las cepas mostraron alta capacidad para degradar los compuestos orgánicos evaluados, excretar ácidos y pigmentos, lo cual evidenció su amplio potencial biodeteriorante, mientras que el 40% de ellas fueron capaces de crecer a 37°C y producir hemolisinas, por lo que pueden considerarse patógenos humanos oportunistas.

Palabras clave: hongos anemófilos, ambiente interior, salud, *Aspergillus*, factor de virulencia, patógeno oportunista.

Abstract

The fungi that develop in archives and libraries can be a serious problem for document preservation and health. This phenomenon is enhanced in tropical climates and in buildings with ineffective ventilation or climatization. Therefore, in order to characterize the air mycobiota of the Cuban Office of Industrial Property has made it study and evaluation *in vitro* of biodeteriogenic and pathogenic capabilities of isolates. The samples were taken using a biocolector SAS Super 100. In 25 strains (64% of total) cellulolytic, amylolytic, proteolytic activity and excretion of pigments and organic acids were determined qualitatively, as well the ability to grow at 37°C and hemolysins

excretion. Six genera and two fungal mycelia were detected with *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp. and *Penicillium* spp., predominantly. The 76% of isolates showed high ability to degrade the organic compounds evaluated, excreting acids and pigments, which showed its broad biodeteriogenic potential while 40% were able to grow at 37°C and excreted hemolysins, for that reason they can be classified as opportunistic human pathogens.

Keywords: anemophilous fungi, indoor environment, health, *Aspergillus*, virulence factor, opportunistic pathogen.

INTRODUCCIÓN

Los hongos presentes en archivos y bibliotecas constituyen un serio problema para la conservación de los fondos documentales al ser capaces de adherirse a una amplia variedad de sustratos. Se ha hecho énfasis en que el clima tropical puede favorecer su desarrollo, debido a la influencia de la temperatura y la humedad relativa (RIVIERA-MARIANI, 2011; ALMAGUER & ROJAS, 2013; LAVÍN *et al.*, 2014), lo cual se potencia en ambientes con sistemas de ventilación o climatización poco eficaces. Los hongos filamentosos tienen gran significación para el biodeterioro, primeramente por su efectiva forma de dispersión (propágulos aerotransportados) y luego por ser capaces de vivir en una amplia variedad de ambientes respaldados por una potente y versátil maquinaria metabólica (VALENTÍN, 2010; ROJAS *et al.*, 2012). Algunos efectos que los hongos provocan en los soportes documentales son la degradación enzimática de la celulosa y las proteínas y la excreción de ácidos y pigmentos, los cuales causan daños principalmente estéticos. Además mediante la presión que ejercen sus hifas sobre los materiales se producen alteraciones de tipo mecánico (VALENTÍN, 2010; STERFLINGER & PINZARI, 2011; LAVÍN *et al.*, 2014).

Otras propiedades importantes de los hongos están relacionadas con sus potencialidades patogénicas (NEVALAINEN & MORAWSKA, 2009; HALEEM & MOHAN, 2012). Numerosos estudios han establecido una estrecha relación entre las condiciones ambientales, la presencia de propágulos fúngicos y su incidencia en el desencadenamiento de afecciones respiratorias y alérgicas. Su presencia en ambientes interiores se asocia a patologías infectivas (micosis) mediadas por diversos factores de virulencia que varían en dependencia de grupos o taxones (CABRAL, 2010; BONIFAZ, 2012; GUARRO, 2012; ROCHA *et al.*, 2013).

Por todo lo anterior se hace necesario realizar estudios de caracterización y seguimiento de la microbiota aérea en archivos y bibliotecas, con el fin de garantizar la conservación de las colecciones y prevenir posibles patologías en los trabajadores y el personal que frecuenta asiduamente estos lugares. El objetivo del presente estudio, por tanto, ha sido caracterizar la microbiota aérea de un depósito de la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial y evaluar *in vitro* las capacidades biodeteriorantes y patogénicas de las cepas aisladas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Características del depósito

El estudio se realizó en un depósito (locales A y B) de la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial ubicada en la ciudad de La Habana, que resguarda fondos documentales de gran valor (inventos, modelos industriales, descubrimientos científicos, marcas y otros signos distintivos). La colección comprende 1.265.136 ejemplares, en soporte papel principalmente, siendo los más antiguos del siglo XVIII.

Ambos locales (A, B) son contiguos, están situados en la primera planta del edificio, sus dimensiones son 17x8x5m (largoxanchoxaltura) y comparten un sistema de climatización con una temperatura media anual que oscila entre 22 y 24°C.

Muestreo y análisis micológico del aire

Se seleccionaron 11 puntos para el muestreo (6 en el local A y 5 en el local B). Además, a modo de control, se tomó una muestra de aire en el patio exterior situado en la zona central del edificio.

Todos los muestreos se realizaron entre las 11 y las 12 horas, considerando la posibilidad de una

mayor concentración de propágulos fúngicos en la atmósfera de la ciudad (ALMAGUER & ROJAS, 2013). En cada punto, las muestras se tomaron por triplicado empleando un biocolector SAS Súper 100 (Italia) a intervalos de 1 hora entre réplicas (SAS SUPER 100™, 2001). El medio de cultivo utilizado para el aislamiento fue Agar Malta (AM) suplementado con NaCl (7.5%) (ROJAS *et al.*, 2008; ROJAS, 2010). Una vez concluido el muestreo, las placas se incubaron a $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 7 días y se realizó el aislamiento de las diferentes colonias. Para la identificación taxonómica se tuvieron en cuenta las características culturales y morfológicas observadas en microcultivos, preparaciones en fresco y semipermanentes con lactofenol, según las técnicas de CASADESÚS & ROJAS (1981). Para la observación de estructuras hialinas se utilizó lactofenol-azul algodón (JOHNSTON & BOOTH, 1983) o lactofenol-fushina (KLICH & PITT, 1994). Las observaciones se realizaron en un microscopio de campo claro (Olympus, Japón) con cámara digital acoplada (Samsung, Corea).

La identificación taxonómica hasta nivel de género se realizó de acuerdo con los criterios de KENDRICK & CARMICHAEL (1973) y BARNETT & HUNTER (2003). Para la identificación de las especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (y sus teleomorfos) se siguieron los procedimientos sugeridos por KLICH & PITT (1994) y PITT (2000); para *Cladosporium* los criterios de CASTAÑEDA (1996) y BENSCH *et al.* (2010) y para *Nigrospora* spp. los propuestos por DOMSCH *et al.*, (1980). En todos los casos se realizaron al menos 20 observaciones distribuidas en varios campos de visión, en preparaciones realizadas tanto con la parte joven como con la zona madura de la colonia.

Análisis biométricos y estadísticos

Se determinó la densidad relativa (DR) de cada taxa (SMITH, 1980) donde: $DR = (\text{número de colonias de un taxa} / \text{número total de colonias}) \times 100$.

El análisis estadístico, realizado con el programa Statgraphics Centurion XV, incluyó una prueba de t-student para analizar la distribución de probabilidades, determinar su normalidad y realizar las comparaciones en las concentraciones entre los locales A y B así como entre el depósito y el exte-

rior. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).

Pruebas fisiológicas de las capacidades biodeteriorantes

1. Determinación de la actividad proteolítica

La actividad proteolítica cualitativa fue determinada a través de la hidrólisis de la gelatina en tubos de cultivo implementando una modificación al método de ABRUSCI *et al.* (2005) que fue referido por BORREGO *et al.* (2010). Los tubos inoculados fueron incubados durante 7 días a $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ y posteriormente fueron incubados a 4°C durante 1 hora. Se evidenció la reacción de hidrólisis por la licuefacción del medio al agitar los tubos.

2. Evaluación cualitativa de la actividad celulolítica

Con el objetivo de determinar el poder degradativo de tres tipos de celulosa las cepas fúngicas se cultivaron en tubos de medio agarizado de composición salina. Como fuente de carbono se empleó en un caso una tira de papel de filtro (Whatman n°1, Inglaterra), en los otros dos ensayos se emplearon al 1% carboximetil celulosa y celulosa cristalina respectivamente. Como control se empleó glucosa (1%). Los cultivos se incubaron a $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 21 días (BORREGO *et al.*, 2010; LAVÍN *et al.*, 2014).

3. Producción de pigmentos

Se determinó por observación en la misma tira de papel de filtro (Whatman n°1, Inglaterra), utilizada en la prueba descrita anteriormente.

4. Determinación de la actividad amilolítica

La actividad amilolítica cualitativa fue determinada a través de la hidrólisis del almidón en placas (BORREGO *et al.*, 2010), utilizando un medio de composición salina similar al empleado en la prueba 2 y como fuente de carbono almidón (1%). Después de incubar durante 7 días a $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, se vertieron sobre cada placa de cultivo 5 ml de solución del reactivo Lugol. La presencia de una

zona incolora alrededor de las colonias fue tomada como indicador de hidrólisis positiva (GUIAMET *et al.*, 2011).

5. Determinación cuantitativa de la producción de ácidos orgánicos

Se realizaron suspensiones de esporas de las cepas aisladas y se sembraron en un caldo de cultivo de composición salina similar al medio empleado en la prueba 2 (BORREGO *et al.*, 2010). Los cultivos se incubaron a $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 3 días y posteriormente se midió el pH del medio de cultivo con la ayuda de un potenciómetro (Pacitronic MV 870, USA).

Determinación de atributos patogénicos

1. Crecimiento a 37°C

Las cepas fueron sembradas en placas que contenían como medio de cultivo Agar Malta (AM). Se incubaron durante 7 días a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, para observar si las cepas evaluadas crecían a esa temperatura (LLOP *et al.*, 2001).

2. Producción de hemolisinas

Las cepas fueron sembradas en placas Petri que contenían como medio de cultivo Agar Czapeck (ACZ), al cual se le agregó 5 ml de sangre de carnero desfibrinada por 95 ml de medio. Posteriormente se inocularon e incubaron a $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 7-10 días. La actividad hemolítica se evidenció por la aparición de un halo verdoso o transparente alrededor de la colonia en el medio rojo (BOGOMOLOVA & KIRTSIDELI, 2009).

En todos los casos los experimentos anteriores se realizaron por triplicado con controles positivos y negativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contaminación fúngica ambiental

Las concentraciones medias detectadas en cada uno de los locales (A, B) del depósito fueron 14 y 18 UFC m^{-3} respectivamente. Al compararlas

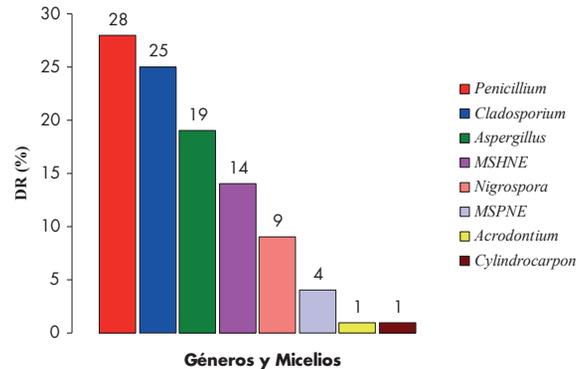


Figura 1. Densidad relativa de los géneros y micelios detectados en el depósito. MSHNE: micelio septado hialino no esporulado, MSPNE: Micelio septado pigmentado no esporulado.

Figure 1. Relative densities (DR) of genera and mycelium detected in the repository. MSHNE: hyaline septate mycelium not sporulated, MSPNE: pigmented septate mycelium not sporulated.

entre sí no existieron diferencias estadísticamente significativas ($p\leq 0.05$), sin embargo ambos casos difirieron del exterior del edificio donde la media fue de 90 UFC m^{-3} . Teniendo en cuenta lo establecido en cuanto a calidad microbiológica ambiental por varios autores para diferentes regiones del mundo (NEVALAINEN & MORAWSKA, 2009; CAPITELLI *et al.*, 2009) estos ambientes se pueden considerar como NO CONTAMINADOS.

A pesar de ello, en los ambientes de interior, se han detectado hongos de importancia relevante para el biodeterioro y la salud humana. Se aislaron un total de 39 cepas de hongos filamentosos, de ellas el 97% fueron anamorfos de ascomicetes evidenciando su predominio en la microbiota aérea interior (PORTNOY *et al.*, 2004; ROJAS *et al.*, 2008 y 2012; BORREGO & MOLINA, 2014). Este resultado es característico del método de muestreo empleado, pues la utilización de placas con medios de cultivo favorece el desarrollo de las fases anamórficas de los hongos (ROJAS, 2010). Los aislamientos se ubicaron en 6 géneros y 2 tipos miceliares con predominio de los representantes de *Penicillium* Link, *Cladosporium* Link ex Fr. y *Aspergillus* Nees ex Fr. (Fig. 1). En la bibliografía se ha reportado el predominio de estos géneros en ambientes interiores de todo el planeta (NEVALAINEN & MORAWSKA, 2009), ello es debido al predominio de *Cladosporium* spp. en el bioaerosol atmosférico externo, el cual

Tabla I. Resultados de las pruebas fisiológicas realizadas a las cepas seleccionadas. *Results of physiological tests on the selected strains.*

Taxa	Degradación de celulosa				Pigmentos	Actividad amilolítica	Actividad proteolítica
	Crecimiento en:		Producción de:				
	Papel de filtro	Carboximetil celulosa	Celulosa cristalina	Ácidos (pH)			
<i>Aspergillus candidus</i> Link	+/-	+/-	+/-	6.07	-	+	+
<i>A. chevalieri</i> Mangin	+/-	-	-	4.46	-	+	+
<i>A. flavipes</i> (Bain & Sart) Thom & Church	++	+	+	3.72	+	+	+
<i>A. flavus</i> Link	+++	++	++	6.22	-	+	+
<i>A. niger</i> Tiegh.	+++	++	+	5.41	-	+	+
<i>A. niveus</i> Blochwitz	++	+++	+	5.30	+	+	-
<i>A. oryzae</i> (Ahlb.) Cohn	++	++	+	4.33	+	+	+
<i>A. unguis</i> (Emile-Wiel & Gaudin) Thom & Raper	++	+	+	5.82	+	+	+
<i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tirab	++	++	+	4.13	-	+	+
<i>Aspergillus wentii</i> Wehmer	+	++	+	4.82	-	+	+
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen) G.A. de Vries	+++	+++	++	3.34	+	+	+
<i>Cl. hillianum</i> Bensch, Crous & U. Braun	++	++	+	4.16	+	+	+
<i>Cylindrocarpon sp.</i> Wollenw.	-	-	-	3.65	-	-	+
<i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) E.W. Mason	+	-	-	5.21	-	-	-
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	+++	++	+	4.80	-	+	+
<i>P. citreonigrum</i> Dierckx. 1	++	++	+	4.45	-	+	+
<i>P. citreonigrum</i> Dierckx. 2	++	++	+	6.01	-	+	+
<i>P. citrinum</i> Thom. 1	+++	++	++	5.27	+	-	+
<i>P. citrinum</i> Thom. 2	+++	++	++	4.36	+	+	+
<i>P. griseofulvum</i> Dierckx	+++	++	+	5.15	-	+	+
<i>P. oxalicum</i> Currie & Thom. 1	++	++	+	3.21	-	+	+
<i>P. oxalicum</i> Currie & Thom. 2	++	+	+	5.05	-	+	-
<i>P. oxalicum</i> Currie & Thom. 3	+++	++	+	4.72	-	+	-
MSHNE	+++	++	+/-	5.35	+	+	+
MSPNE	++	++	+	5.19	+	+	+

MSHNE: micelio septado hialino no esporulado, **MSPNE**: micelio septado pigmentado no esporulado. +++: crecimiento abundante, ++: crecimiento moderado, +: crecimiento pobre, también es indicativo de la presencia de pigmento, degradación de almidón y degradación de gelatina. +/-: indica crecimiento muy pobre, -: indica no crecimiento, no producción de pigmento, no degradación de almidón y no degradación de gelatina.

MSHNE: *mycelium septate hyaline not sporulated*, **MSPNE**: *mycelium septate pigmented not sporulated*, +++: *Indicates abundant growth*, ++: *Indicates moderate growth*, +: *Indicates poor growth, it is also indicative of pigments production, proteolytic and amyolytic activities*, +/-: *Indicates very poor growth*, -: *Indicates no cellulolytic, proteolytic and amyolytic activities*.

incide en el ambiente interior (ROJAS *et al.*, 2007; GARCÍA & SÁNCHEZ, 2012; ALMAGUER & ROJAS, 2013), y al hecho de que, siendo hongos que actúan como colonizadores primarios de diversos materiales (especialmente *Penicillium* ssp. y *Aspergillus* ssp.), sus esporas pueden pasar al aire con relativa facilidad (AIRA *et al.*, 2007; ROJAS, 2010). Particularmente en ambientes de archivos y bibliotecas los géneros mencionados han sido detectados de forma predominante en aire, polvo y en la superficie de los materiales (BORREGO & PERDOMO, 2012; BORREGO & MOLINA, 2014). Algunos aislados con menor densidad, como *Cylindrocarpon* sp. Wollenw., resultan de interés clínico (DE HOOG *et al.*, 2000). Estos resultados ponen de manifiesto el interés de realizar estudios microbiológicos periódicos y la variabilidad que puede existir entre ambientes interiores aparentemente similares.

Capacidad biodeteriorante

Se estudió el potencial biodeteriorante de 25 cepas (Tabla I). La selección se realizó teniendo en cuenta las de mayor concentración ambiental o aquellos taxa que se reportan en la bibliografía como agentes peligrosos para la conservación documental (PINZARI *et al.*, 2006, 2010; ROJAS, 2010)

Los resultados mostraron que el 100% de los hongos excretaron ácidos orgánicos y el 88% crecieron a expensas del papel como única fuente de carbono (actividad celulosa total o FPasa). Estas dos actividades fueron las que más evidenciaron su relación con la degradación de su componente principal, la celulosa (STERFLINGER & PINZARI, 2011). Los ácidos orgánicos, además de provocar por sí mismos la hidrólisis ácida del enlace β -1,4-glicosídico, pueden facilitar la colonización por otros hongos generalmente acidófilos, además de aumentar la eficiencia de las celulasas para degradar el sustrato (VILLALBA *et al.* 2004; LAVÍN *et al.*, 2014). Fue notable además el crecimiento de las cepas testadas en carboximetilcelulosa y celulosa cristalina (80%), esta última de más compleja asimilación que el resto de los polímeros celulósicos empleados en este estudio. El buen crecimiento que mostraron las cepas de *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. a expensas de

este polímero, es muestra del eficiente complejo enzimático celulolítico. La excreción de pigmentos es una de las alteraciones más comunes de los hongos filamentosos en los soportes documentales que también se evidencia como resultado del foxing (LAVÍN *et al.*, 2014). El daño estético provocado es generalmente irreversible siendo uno de los problemas más graves que origina la contaminación microbiológica (BORREGO & GARCÍA, 2011). En este estudio el 40% de las cepas evaluadas excretaron pigmentos sobre el papel de filtro o el medio de cultivo, abarcando tonalidades desde el amarillo hasta el pardo intenso, destacando los géneros *Aspergillus* y *Cladosporium*, reportados ampliamente en la bibliografía (DE HOOG *et al.* 2000; PIONTELLI, 2012; ROJAS & AIRA, 2012). El almidón y la gelatina, dos de los componentes comunes del papel y las encuadernaciones, fueron asimilados por la mayoría de los aislados coincidiendo con los resultados de otros estudios realizados en archivos y bibliotecas (BORREGO *et al.* 2010; ROJAS 2010; BORREGO & MOLINA, 2014; RODRÍGUEZ, 2014).

Según BORREGO & GARCÍA (2011), un microorganismo puede considerarse un riesgo para la conservación documental, si presenta al menos un atributo biodeteriorante que bajo las condiciones adecuadas, comprometa la colección. Por tanto, el número de atributos que reúna una misma cepa, constituye un indicativo de su potencial biodeteriorante.

En este estudio, el 76% de las cepas evaluadas fueron positivas a 4 ó 5 de las pruebas fisiológicas que se realizaron, lo que las sitúa como agentes de alto riesgo para la colección documental (Fig. 2). Es de resaltar que las cepas de las especies: *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus unguis*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium hillianum* y *Penicillium citrinum*-2 además de los micelios no esporulados, evidenciaron las cinco actividades de forma considerable.

Patogenicidad

El análisis se realizó en las mismas cepas seleccionadas para el estudio de capacidad biodeteriorante, teniendo en cuenta su incidencia como potenciales patógenos (DE HOOG *et al.*

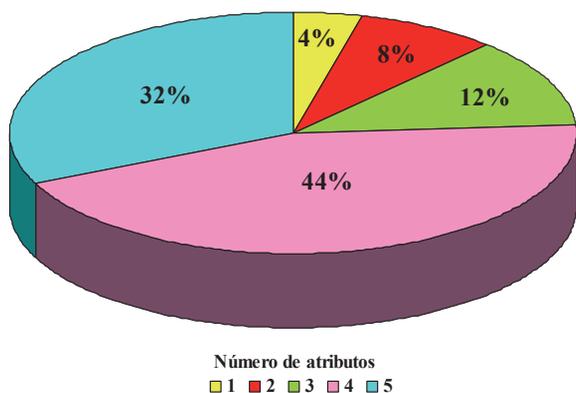


Figura 2. Relación porcentual entre cepas según el número de atributos biodeteriorantes.

Figure 2. Percentage ratio among strains according to the numbers of the biodeteriogenic attributes.

2000). La capacidad individual de un microorganismo para causar enfermedades depende de una serie de mecanismos conocidos como factores de virulencia o atributos patogénicos (LLOP *et al.*, 2001). En los hongos filamentosos son diversos y varían según el grupo, el género o la especie (VALENCIA-GUERRERO, 2011), siendo su capacidad de crecimiento a 37°C una de las características imprescindibles para considerarla como tal (MCCORMICK *et al.*, 2010).

Un 64% de los aislados testados en este trabajo fueron capaces de crecer a dicha temperatura, a la cual se inhibe el desarrollo de muchos hongos saprófitos (LLOP *et al.*, 2001), destacando las cepas de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* por su crecimiento exuberante (Tabla II). Dichas especies se han citado como causantes de micosis humanas, especialmente *Aspergillus flavus*, que también es uno de los principales causantes de aspergilosis bronquial humana e infecciones pulmonares en personas inmunocomprometidas, patología que puede agravarse por su capacidad de producir micotoxinas (DE HOOG *et al.* 2000).

Las hemolisinas son exotoxinas formadoras de poros que reconocen sitios estructurales específicos en la superficie de los glóbulos rojos (NAYAK *et al.* 2013). Estas son excretadas al medio extracelular donde pueden producir la ruptura de eritrocitos y provocar anemia y anoxia en el organismo hospedante (BOGOMOLOVA & KIRTSIDELI, 2009). Algunos investigadores reportaron que pueden jugar un rol importante en afectaciones a la salud,

producto del llamado Síndrome del Edificio Enfermo (VESPER & VESPER, 2004).

En este estudio se ha demostrado que un 44% de las cepas evaluadas resultaron positivas a la lisis de los eritrocitos, lo cual resulta especialmente importante teniendo en cuenta su procedencia ambiental. En estudios realizados por NAYAK *et al.* (2013), con cepas del género *Aspergillus* también se ha detectado actividad hemolítica para *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus versicolor*, cuya importancia clínica se encuentran ampliamente citada (DE HOOG *et al.* 2000; BONIFAZ, 2012; OLIVEIRA & CARAMALHO, 2014). La detección de actividad hemolítica en solo una de las tres cepas evaluadas de *Penicillium oxalicum*, conjuntamente con la ausencia de la misma en *Penicillium chrysogenum* donde ha sido ampliamente estudiada (NAYAK *et al.* 2013), evidencia la variabilidad que puede existir entre cepas de un mismo grupo o especie y justifica la necesidad de realizar muestreos ambientales y caracterizaciones fisiológicas periódicas. Por otra parte, a diferencia del resultado de este estudio, en la bibliografía consultada no se encontró información sobre la excreción de hemolisinas por *Cladosporium cladosporioides*.

La reunión en un mismo organismo de varios factores de virulencia es condición necesaria para clasificarlo como potencialmente patógeno. En este estudio un 40% de los aislados testados fueron capaces de crecer a 37°C y excretar hemolisinas al medio (Fig. 3). A pesar de que en el proceso

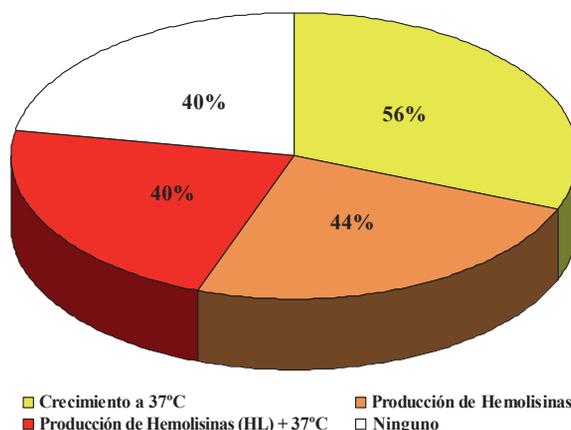


Figura 3. Relación porcentual entre cepas según el número de atributos patogénicos.

Figure 3. Percentage ratio among strains according to the number of pathogenic attributes.

Tabla II. Resultados de las pruebas de patogenicidad. *Results of pathogenicity tests*

Cepa	Producción de hemolisinas	Crecimiento a 37°C
<i>Aspergillus candidus</i>	-	+
<i>Aspergillus chevalieri</i>	+	+
<i>Aspergillus flavipes</i>	-	+
<i>Aspergillus flavus</i>	+	+ ^a
<i>Aspergillus niger</i>	+	+ ^a
<i>Aspergillus niveus</i>	+	+ ^a
<i>Aspergillus oryzae</i>	+	+
<i>Aspergillus unguis</i>	-	-
<i>Aspergillus versicolor</i>	+	+
<i>Aspergillus wentii</i>	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	+	-
<i>Cladosporium hillianum</i>	-	-
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	+	+
<i>Nigrospora sphaerica</i>	-	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	+
<i>Penicillium citreonigrum</i> 1	-	+
<i>Penicillium citreonigrum</i> 2	-	+
<i>Penicillium citrinum</i> 1	+	+
<i>Penicillium citrinum</i> 2	+	+
<i>Penicillium griseofulvum</i>	-	-
<i>Penicillium oxalicum</i> 1	-	-
<i>Penicillium oxalicum</i> 2	-	+
<i>Penicillium oxalicum</i> 3	+	+
MSHNE	-	-
MSPNE	-	-

^a: Indica crecimiento exuberante a 37°C. ^a: *Indicates exuberant growth at 37°C*

Tabla III. Géneros fúngicos de mayor impacto patogénico. *Fungal genera of more pathogenic impact.*

Nº de cepas de <i>Aspergillus</i>	10
Nº de cepas con 2 atributos patogénicos	6
Por ciento	60%
Por ciento del total	24%
Nº de cepas de <i>Penicillium</i>	9
Nº de cepas con 2 atributos patogénicos	3
Por ciento	34%
Por ciento del total	12%
Nº de cepas de otros géneros	6
Nº de cepas de otros géneros con 2 atributos patogénicos	1
Por ciento	17%
Por ciento del total	4%

infectivo pueden desplegarse otros atributos patogénicos que determinan el potencial y magnitud de la infección, los analizados en este estudio resultan de vital importancia en hongos con capacidad multihospedante (VALENCIA-GUERRERO, 2011).

Las cepas de *Aspergillus* analizadas han resultado las de mayor impacto patogénico (Tabla III), ya que un 60% crecieron a 37°C y excretaron hemolisinas, lo que además representó un 24% del total de las cepas evaluadas. Así además de las ya referidas, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus versicolor*, se pueden considerar potencialmente patógenas, las cepas de *Aspergillus niveus* y el teleomorfo de *Aspergillus chevalieri*.

Las especies patógenas de *Aspergillus* pueden causar un amplio espectro de infecciones en el ser humano que van desde las formas superficiales (otitis externas fúngicas, onicomiosis, infecciones de heridas entre otras) a la aspergilosis profunda invasiva que plantea los mayores retos de diagnóstico al microbiólogo clínico (PALACIO *et al.*, 2003). Lo anterior se encuentra sustentado en que presentan por lo general otros factores de virulencia que conjuntamente con los que hemos discutido facilitan su invasibilidad a hospedante humanos desde el ambiente. El pequeño tamaño de sus conidios es uno de ellos, permite que sean aspirados y que puedan causar infección en el pulmón y en los senos paranasales, atributo que es válido además para *Penicillium citrinum* y *Penicillium oxalicum*. Por otra parte, su capacidad de adherencia a superficies epiteliales y posiblemente endoteliales además de su gran tendencia a invadir los vasos sanguíneos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración del personal del Departamento de Microbiología del Laboratorio Farmacéutico “Eduardo Reyes Cantó” y del Departamento de fondos de la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial.

BIBLIOGRAFÍA

ABRUSCI, C., MARTÍN-GONZÁLEZ, A., DEL AMO, A., CATALINA, F., COLLADO, J. &

- PLATAS, G. (2005). Isolation and identification of bacteria and fungi from cinematographic films. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 56(1): 58-68.
- AIRA, M.J., JATO, V., STCHIGEL, A.M., RODRÍGUEZ-RAJO, F.J. & PIONTELLI, E. (2007). Aeromycological study in the Cathedral of Santiago de Compostela (Spain). *International Biodeterioration and Biodegradation*, 60: 231-237.
- ALMAGUER, M. & ROJAS, T.I. (2013). Aeromicota viable de la atmósfera de La Habana, Cuba. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 20: 35-45.
- BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. (2003). *Illustrated genera of Imperfect fungi*. 4th (ed.) Burgués. Publishing Company Minneapolis 15, Minn, 217 pp.
- BOGOMOLOVA, E.V. & KIRTSIDELI, I. (2009). Airborne fungi in four stations of the St. Petersburg underground railway system. *Internacional Biodeterioration and Biodegradation*. 63: 156-160.
- BONIFAZ, A. (2012). *Micología Médica Básica*. McGRAW-Hill Education, México, 583 pp.
- BORREGO, S. & GARCÍA, M. (2011). Comportamiento de la concentración microbiana aérea en la Fototeca del Archivo Nacional de Cuba. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 42: 61-67.
- BORREGO, S. & MOLINA, A. (2014). Comportamiento de la aeromicota en dos depósitos del Archivo Nacional de Cuba durante 7 años de estudio. *Augmdomus*, 6:1-24.
- BORREGO, S. & PERDOMO, I. (2012). Aerobiological investigations inside repositories of the National Archive of the Republic of Cuba. *Aerobiología*, 28(3):303-316.
- BORREGO, S., GUIAMET, P., GÓMEZ DE SARAVIA, S., BATTISTONI, P., GARCÍA, M., LAVÍN, P. & PERDOMO, I. (2010). The quality of air at archives and the biodeterioration of photographs. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64:139-145.
- BENSCH, K., GROENEWALD, J.Z., DIJKSTERHUIS, J., STARINK-WILLEMSE, M., ANDERSEN, B., SUMMERELL, B.A., SHIN, H.D., DUGAN, F.M., SCHROERS, H.J., BRAUN, U. & CROUS, P.W. (2010) Species

- and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Studies in Mycology*, 67:1-94.
- CABRAL, J.P.S. (2010). Can we use indoor fungi as bioindicators of indoor air quality? Historical perspectives and open questions. Review. *Science of the Total Environment*, 408: 4285–4295.
- CAPPITELLI, F., FERMO, P., VECCHI, R., PIAZZALUNGA, A., VALLI, G., ZANARDINI, E. & SORLINI, C. (2009). Chemical-physical and microbiological measurements for indoor air quality assessment at the Ca'Granada Historical Archive, Milan (Italy). *Water Air Soil Pollution*, 201: 109-120.
- CASADESÚS, L. & ROJAS, T.I. (1981). *Micología. Manual Práctico*. Editorial MES, La Habana, Cuba, 125 pp.
- CASTAÑEDA, R.F., FABRÉ, D.E., PARRA, M.P.P., PÉREZ, M., GUARRO, J. & CANO, J. (1996). Some airborne conidial fungi from Cuba. *Mycotaxon*, 60: 283- 290.
- DE HOOG, G.S., GUARRO, G., GENE, J. & FIGUERAS, M.J. (2000). *Atlas of clinical fungi*. 2nd ed. Universidad Rovira I Virgili Reus, España, 1126 pp.
- DOMSCH K.H., GAMS W. & ANDERS, T.H. (eds.) (1980). *Compendium of Soil Fungi*. vol. 1. Institute of Soil Biology Federal Agricultural Research Centre Braunschweig. Germany, 859 pp.
- GARCÍA, M. & SÁNCHEZ, R. (2012). Estudio de la concentración fúngica aérea de los depósitos del Archivo Municipal de Cárdenas, Cuba. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32:37-43.
- GUARRO, J. (2012). Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(1): 33-39
- GUIAMET, P., BORREGO, S., LAVIN, P., PERDOMO, I. & GÓMEZ DE SARAIVIA, S. (2011). Biofouling and biodeterioration in materials stored at the Historical Archive of the Museum of La Plata, Argentine and at the National Archive of the Republic of Cuba. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85: 229-234.
- HALEEM, A. & MOHAN, S. (2012). Fungal pollution of indoor environment and its management. *Saudi Journal of Biological Science*, 19: 405-426.
- JOHNSTON, A. & BOOTH, C. (1983). *Plant Pathologist's Pocketbook*. 2nd Ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 439 pp.
- KENDRICK, B.W. & CARMICHAEL, J.W. (1973). *Hyphomycetes*. Chapter 10. The Fungi. An advanced Treatise. Volume IVA. (Ed). G.C. Ainsworth. Institute Kew, Surrey, England, 309-509.
- KLICH, M.A. & PITT, J.I. (1994). *A Laboratory guide to the common Aspergillus species and their teleomorphs*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 116 pp.
- LAVIN, P., GÓMEZ DE SARAIVIA, S. & GUIAMET, P.S. (2014). An environmental assessment of biodeterioration in document repositories. *Biofouling*, 30 (5): 561-569.
- LLOP, A., VÁLDEZ-DAPENA, M. & ZUAZO, J. (2001). *Microbiología y Parasitología médica*. Editorial Ciencias Médicas, La Habana, 550 pp.
- MCCORMICK, A., LOEFFLER, J. & EBEL, F. (2010). *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cellular Microbiology* 12(11):1535-1543.
- MOLINA, A. & BORREGO, S.F. (2014). Análisis de la microbiota existente en el ambiente interior de la mapoteca del Archivo Nacional de la República de Cuba. *Boletín Micológico*, 29(1): 2-17.
- NAYAK, A.P., BLACHERE, M., HETTICK, J.M., LUKOMSKI, J.M.S., SCHMECHEL, S. & BEEZHOLD, D.H. (2011). Characterization of recombinant Terrelysin, a hemolysin of *Aspergillus terreus*. *Mycopathologia* 171:23-34.
- NEVALAINEN, A. & MORAWSKA, L. (eds). (2009). *Biological Agents in Indoor Environments. Assessment of Health Risks*. Work conducted by a WHO Expert Group between 2000-2003. http://www.ilaqh.qut.edu.au/Misc/BIOLOGICAL_AGENTS_2009.pdf 06/09/2010.
- OLIVEIRA, M. & CARAMALHO, R. (2014). *Aspergillus fumigatus*: a mere airborne particle or a powerful biohazard? *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 21: 20-34.
- PALACIO, A., CUÉTARA, M.S. & PONTÓN, J. (2003). El diagnóstico de laboratorio de la aspergilosis invasora. *Revista Iberoamericana de Micología*, 20: 90-98.

- PINZARIF., PASQUARIELLO, G. & DE MICO, A. (2006). Biodeterioration of paper. A SEM study of fungal spoilage reproduced under controlled conditions. *Macromolecular Symposia*, 238: 57-66.
- PINZARI, F., MONTANARI, M., MICHAELSEN, A. & PIÑAR, G. (2010). Analytical protocols for the assessment of biological damage in historical documents. *Coalition*, 19:6-13.
- PIONTELLI, E. (2012). Morfología de los hongos comunes en ambientes internos y externos. Ed. Univ Valparaiso, 608 pp.
- PITT, J.I. (2000). *A laboratory guide to common Penicillium species*. Food Science Australia. Third edition, 196 pp.
- PORTNOY, J. M., BARNES, C. S. & KENNEDY, K. (2004). Sampling for indoor fungi. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113: 189-198.
- RIVERA-MARIANI, F.E., NAZARIO-JIMÉNEZ, S., LÓPEZ-MALPICA, F. & BOLAÑOS-ROSETO, B. (2011). Sensitization to airborne ascospores, basidiospores, and fungal fragments in allergic rhinitis and asthmatic subjects in San Juan, Puerto Rico. *International Archives of Allergy Immunology*, 155(4): 322-34.
- ROCHA, A., ALVARADO, M.A., GUTIÉRREZ, R., SALCEDO, R. & MORENO, S. (2013). Variación temporal de esporas de *Alternaria*, *Cladosporium*, *Coprinus*, *Curvularia* y *Venturia* en el aire del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(2): 155-165.
- RODRÍGUEZ, J.C. (2014). *Caracterización de la microbiota del ambiente del depósito del museo nacional de la música en época de lluvia*. Tesis en opción al grado de Master en Ciencias. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Cuba.
- ROJAS, T.I. (2010). *Diversidad fúngica en ambientes exteriores de áreas urbanas de ciudad de La Habana y sus potencialidades en el biodeterioro*. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de la Habana. Facultad de Biología.
- ROJAS, T.I. & AIRA, M.J. (2012). Fungal biodiversity in indoor environments in Havana, Cuba. *Aerobiología*, 28: 367-374
- ROJAS, T.I., AIRA, M.J., BATISTA, A., CRUZ, I.L. & GONZÁLES, S. (2012). Fungal biodeterioration in historic buildings of Havana, Cuba. *Grana*, 51(1): 44-51.
- ROJAS, T.I., LLANES, N., BENITEZ, M., AIRA, M.J. & MALAGÓN, H. (2007). El género *Aspergillus* en la atmósfera de La Habana (Cuba). *Boletín Micológico*, 22:41-46.
- ROJAS, T.I., MARTÍNEZ, E., AIRA, M.J. & ALMAGUER, M. (2008). Aeromicota de ambientes internos: Comparación de métodos de muestreo. *Boletín Micológico*, 23: 67-73.
- SAS SUPER 100™ (2001). Microbiological monitoring of the environment. Instruction manual. Milan, Italy: International Pbi Spa. www.massetrecovery.com/pictures12/sasmanual.pdf
- SMITH, G. (1980). *Ecology and Field Biology*. Harper & Row, New York, 835 pp.
- STERFLINGER, K. & PINZARI, F. (2011). The revenge of time: fungal deterioration of Cultural Heritage with particular reference to books, paper and parchment. *Environmental Microbiology*, 14(3): 559-566.
- VALENCIA-GUERRERO, M.F. (2011). Evaluación de actividades enzimáticas de *Fusarium* spp., aislados de lesiones en humanos, animales y plantas. *Universitas Scientiarum*, 16(2): 147-159.
- VALENTÍN, N. (2010). Microorganisms in museum collections. *Coalition*, 19:2-5.
- VESPER, S.J. & VESPER, M.J. (2004). Possible roles of fungal hemolysins sick building syndrome. *Advances in Applied Microbiology*, 55:191-213.
- VILLALBA, L.S., MIKÁN, J.F. & SÁNCHEZ, J. (2004). Actividades hidrolíticas y caracterización isoenzimáticas de poblaciones microbianas aisladas del patrimonio documental en el Archivo General de Colombia. *Nova Publicación Científica*, 2(2): 50-57.