

Estudio de la concentración microbiana en el aire de depósitos del Archivo Nacional de Cuba

Study of the microbial concentration in the air in repositories of the National Archive of Cuba

Borrego Sofía ^{a*}, Perdomo Ivette ^a, Guiamet Patricia ^b,
Gómez de Saravia Sandra ^b.

Palabras clave:
ambientes interiores, biodeterioro, patrimonio documental, hongos, bacterias

Keywords: indoor environments, biodeterioration, documentary heritage, fungi, bacteria removal; biological processes

ABSTRACT

Nowadays, experts are interested in studying microbiota in indoor environments since microorganisms can produce human health disorders and biodeteriorate valuable collections. The aims of this paper were: to determine the microbial concentration of air in repositories of National Archive of Cuba, to carry out taxonomic identification of isolated fungi and to measure their potential risk for both the documentary heritage and staff's health.

The microbiological sampling was conducted in summer and winter in 6 repositories by means of a sedimentation method. Petri dishes with adequate culture media placed in triplicate at a height of 3 m were used to isolate fungi and bacteria. Cellulolytic activity and production of pigments and acids by the isolated fungi were qualitatively determined. The total viable microbiota was greater in winter than in summer. Bacterial concentration was significantly higher in winter (dry season) whereas fungal concentration was greater in summer. *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Curvularia* and *Alternaria* were the predominant fungal genera in winter while *Cladosporium* prevailed in summer together with genera such as *Fusarium*, *Mucor* and *Chrysonilia*, which in some repositories reached significant levels. On one hand, the isolated fungi degraded cellulose and produced pigments and acids. On the other hand, it was found that these fungi can provoke allergic states and respiratory diseases in humans. As to the bacteria present in the air, Gram positive ones prevailed: *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Streptococcus* and *Staphylococcus*. Moreover, we found that the identified bacteria can affect human health.

RESUMEN

Actualmente el estudio de la microbiota en ambientes interiores es de interés para los especialistas, pues los microorganismos pueden producir afecciones a la salud de las personas y causar el biodeterioro de colecciones valiosas. Los objetivos del trabajo fueron: determinar la concentración microbiana del aire en depósitos del Archivo Nacional de Cuba, realizar la identificación taxonómica de los hongos aislados y definir el riesgo potencial que ellos representan para el biodeterioro del patrimonio documental y la salud del personal. El muestreo microbiológico se realizó en verano e invierno y en 6 depósitos, empleando un método de sedimentación. Para aislar hongos y bacterias se emplearon placas de Petri con medios de cultivo adecuados que se colocaron por triplicado a 3m de altura. Se determinó cualitativamente la actividad celulolítica, la producción de pigmentos y de ácidos a los hongos aislados. La microbiota viable total fue mayor en invierno que en verano. La concentración bacteriana fue significativamente superior en el invierno (estación seca) en tanto que la fúngica es más elevada en verano. Los géneros fúngicos que predominaron en invierno fueron *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Curvularia* y *Alternaria*. En verano prevaleció *Cladosporium*, y los géneros *Fusarium*, *Mucor* y *Chrysonilia* llegaron a alcanzar niveles significativos en algunos depósitos. Los hongos aislados degradaron celulosa, produjeron pigmentos y ácidos. Asimismo, se evidenció que pueden provocar estados alérgicos y enfermedades respiratorias a las personas. Con relación a las bacterias en el aire, predominaron las Gram positivas. Se identificaron los géneros *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*. De igual manera, se detectó que las bacterias identificadas son capaces de afectar la salud del personal.

Recibido 03 de mayo de 2010. Aceptado el 13 de agosto de 2010.

^aLaboratorio de Conservación Preventiva. Archivo Nacional de la República de Cuba. Compostela 906 esquina a San Isidro, CP: 10100, La Habana Vieja, La Habana. Teléfonos: (537) 862-9436, 861-2513. Sofia@arnac.cu

^bDepartamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA)-CONICET. C.C. 16, Suc.4, (1900) La Plata, Buenos Aires, Argentina. Teléfono: 54-221-4257430. Pguiamet@inifta.unlp.edu.ar

* Autor para correspondencia: (537) 862-9436. Sofia@arnac.cu

INTRODUCCIÓN

En los ambientes exteriores e interiores se encuentra un gran número de partículas de diferente origen, forma y tamaño suspendidas en el aire, ellas constituyen el aerosol atmosférico. Se pueden clasificar de diferentes formas, teniendo en cuenta el origen (biológico, orgánico, inorgánico), la localización (marina, continental, rural, industrial, urbana) y el efecto que pueden causar sobre las superficies en que se depositan (químico, tóxico, patogénico, degradativo). Entre las partículas de origen biológico se encuentran bacterias, esporas fúngicas, algas, virus, protozoos, granos de polen, etc. (Mandrioli, 2002).

Dentro de los componentes de esas partículas, también se encuentra el polvo, el cual se deposita sobre documentos, libros y otros objetos; el mismo varía en cantidad y calidad en dependencia de la situación del edificio, de las actividades que ocurran en su interior, de la estación del año y del estado de conservación de libros, documentos y objetos (Maggi *et al*, 2000). El polvo sirve como fuente de nutrientes para algunos insectos y hongos, y crea un microambiente sobre las superficies de las colecciones impidiendo el flujo normal del aire sobre ellos, lo que facilita que las áreas superficiales absorban gran cantidad de humedad, favoreciendo la proliferación de plagas (Florian, 1997).

Por otro lado, los microorganismos pueden ser transportados por las partículas de polvo hacia el interior de locales a través de los sistemas de ventilación y los visitantes (Gallo *et al*, 1996; Vaillant & Valentín, 1996). La colonización y el crecimiento sobre la superficie de los objetos que se encuentran en el interior de los locales, también puede ser una importante fuente de contaminación del

aire de los mismos (Petushkova & Kandyba, 1999).

En condiciones ambientales apropiadas, la microbiota del aire puede coexistir con las colecciones de valor histórico y con las personas en un ecosistema específico sin causar grandes daños. Sin embargo, al producirse un incremento de la temperatura y la humedad relativa, los microorganismos pueden tener efectos negativos sobre las colecciones, acelerándose el biodeterioro (Nugari & Roccardi, 2001; Florian, 2002, 2003; Pinzari *et al*, 2004 y 2006), y afectando la salud de las personas (Toivola *et al*, 2002; Eagle Industrial Hygiene Associates, 2004). Por ello para que los especialistas puedan definir la calidad del aire en ambientes interiores, es necesario el conocimiento de la concentración microbiana en el interior de los locales. Este aspecto reviste una mayor significación en países de clima tropical (Teygeler *et al.*, 2001).

Los hongos, a diferencia de las bacterias, están considerados los organismos de mayor importancia como agentes biodeteriorantes de la materia orgánica, pues además de producir enzimas extracelulares, presentan estructuras somáticas, llamadas hifas, que ejercen presión mecánica sobre el soporte produciéndole debilitamiento (Gallo *et al*, 1996). La mayoría de los hongos presentes en los ambientes interiores son saprofitos, pues obtienen los nutrientes para su metabolismo de materiales muertos, materia inorgánica u orgánica tales como madera, papel, pintura, suelo, polvo, piel, alimentos, etc. (Florian, 1997, 2002; Gallo *et al.*, 1996).

Teniendo en cuenta estos aspectos, nos propusimos en este trabajo determinar la concentración microbiana del aire en seis

depósitos del Archivo Nacional de la República de Cuba seleccionados al azar y distribuidos entre los tres pisos del edificio. Así como un depósito que conserva materiales especiales (mapas y planos). La evaluación se realizó en dos estaciones del año, a la par se hizo la identificación taxonómica de los hongos y de grupos bacterianos aislados y se definió el riesgo potencial que ellos representan para el biodeterioro del patrimonio documental y para la salud del personal que trabaja en la institución.

MATERIALES Y MÉTODOS

Características de los depósitos analizados

Se analizaron siete depósitos del Archivo Nacional de la República de Cuba que abarcaron los tres pisos así como la parte norte y sur del edificio. Seis de los locales almacenan documentos escritos en papel pertenecientes a diferentes fondos documentales de valor histórico. El otro conserva mapas y planos en diferentes soportes y con diferentes técnicas por lo que se clasifican entre los denominados materiales especiales y por tanto requieren temperatura y humedad relativa bajas y estables.

Los depósitos analizados fueron 3 y 8 (locales del sótano), 13 y 18 (locales del primer piso), 24 y 27 (locales del segundo piso), así como la Mapoteca (ubicada en el primer piso del edificio). Se caracterizan por su gran tamaño, siendo sus dimensiones (largo x ancho x altura, m) las siguientes: i- depósitos 3, 13, 23 y Mapoteca: 15.2 x 6.2 x 2.5m y, ii- depósitos 8, 18 y 28: 25.3 x 6.2 x 2.5m.

Muestreo microbiológico del aire

El muestreo microbiológico ambiental se realizó en dos estaciones diferentes del año 2006 (invierno o etapa de sequía y verano o etapa lluviosa) y se empleó el método de sedimentación o de placa expuesta propuesto por Omeliansky (Bogomolova & Kirtsideli, 2009). Se muestrearon cinco puntos por triplicado (método diagonal) y en cada punto, se midieron la temperatura y la humedad relativa con un termohigrómetro digital durante el muestreo.

Para el aislamiento de hongos se emplearon placas Petri de 90 mm con Agar Malta suplementado con cloruro de sodio (7%) (Rojas *et al.*, 2002) y para bacterias Agar Nutriente que se colocaron a 3m del piso y se mantuvieron abiertas por 5 min. Posteriormente las placas para bacterias se incubaron a 32°C durante 72h y las de hongos a 28°C por 7 días.

Determinación de las unidades formadoras de colonias por m³ de aire

Concluida la incubación, se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia para poder determinar la concentración microbiana expresada en unidades formadoras de colonias por m³ de aire (UFC.m⁻³) según la ecuación descrita por Omeliansky (Bogomolova & Kirtsideli, 2009):

$$N = 5a \cdot 10^4 (bt)^{-1}$$

Donde: N- concentración microbiana en UFC.m⁻³, a- número de colonias por placa Petri, b- superficie de la placa (cm²), t- tiempo de exposición, min.

Identificación de microorganismos aislados

Posteriormente se realizó el aislamiento y la depuración de las diferentes cepas de microorganismos que crecieron. En la identificación de los hongos se realizaron observaciones de las colonias para definir características culturales y morfológicas y se emplearon manuales de identificación taxonómica (Barnett & Hunter, 1987), así como la información que aparece en Image bank (2006) de la página The *Aspergillus* Website y la guía para identificar *Penicillium* que propone Pitt (2000). Para la identificación de bacterias, se realizó la tinción de Gram y se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes a cada cepa aislada, descritas en el Bergeys Manual of Systematic Bacteriology (Holt, 1984; Sneath et al., 1986).

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

Este análisis se realizó de acuerdo a Smith (1980) donde:

Distribución relativa (%) = (No. de colonias del género o especie/ No. total de colonias de todos los géneros o especies) x 100

Determinación cualitativa de la capacidad celulolítica y la producción de pigmentos de hongos

Para determinar la capacidad celulolítica y de producción de pigmentos de los hongos aislados, se procedió a sembrarlos en cuñas de un medio de cultivo cuya composición salina para 1L es: nitrato de sodio 2 g; fosfato de dipotasio 1g; sulfato de magnesio 0.5 g; cloruro de potasio 0.5 g; sulfato ferroso 0.01 g; agar 20 g; pH = 5.5. Como fuente de

carbono se emplearon: una tira de papel de filtro de 4.8 cm de largo por 1 cm de ancho (equivalente a 50 mg), celulosa cristalina (1 %) y como control se empleó glucosa (1%). Los cultivos se incubaron a 28°C durante 21 días (Borrego et al., 2008).

Determinación de la producción de ácidos de hongos

Suspensiones de esporas de las cepas de hongos aisladas, se sembraron en un caldo de cultivo de composición salina similar al empleado anteriormente, pero con Glucosa al 1%, el pH se ajustó a 7. Los cultivos se incubaron a 28°C por 3 días y posteriormente se midió el pH del medio de cultivo con la ayuda de un metropH (Borrego et al., 2008).

Análisis estadístico

Para comparar las concentraciones microbianas que se obtuvieron en verano e invierno se usó la prueba de Student. Para detectar diferencias significativas entre las concentraciones que se obtuvieron por pisos del edificio, se empleó un ANOVA-1 complementado con la prueba de Duncan. Resultados con $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Niveles de contaminación microbiana ambiental

Al analizar los valores promedios de la concentración microbiana del aire en invierno y verano (Tabla 1) se aprecia que la concentración fúngica fue significativamente menor que la bacteriana. Sin

embargo, en invierno (etapa de sequía) la concentración bacteriana fue superior a la que se obtuvo en verano (etapa lluviosa) posiblemente debido a un incremento del polvo exterior que penetró en los depósitos por los conductos de ventilación natural. Estos resultados se corroboran cuando se observa la tabla 2 que muestra además, un incremento de la concentración bacteriana, independientemente de la época del año, en la medida en que el piso del edificio es más alto, debido a que la altura facilita una mejor penetración del polvo desde el exterior.

El hecho de que se detectara una baja concentración de esporas fúngicas (conidios) en invierno, puede deberse a que algunas de ellas son muy ligeras y por tanto su sedimentación es difícil. Se plantea que para que algunos tipos de conidios puedan sedimentar en condiciones de ventilación

natural, requieren una humedad relativa alta que les permita absorber una gran cantidad de agua y que por su peso puedan caer sobre las superficies que se encuentran a su paso (Reponen *et al.*, 2001) o exista un nivel muy bajo de ventilación (se precisa que esporas menores o iguales a 5 μm requieren vientos menores de 25 $\text{m}\cdot\text{seg}^{-1}$ para que puedan sedimentar) (Levetin, 2002). Sin embargo, las células bacterianas generalmente se encuentran adheridas al polvo que al sedimentar sobre las placas Petri, las arrastran.

Las concentraciones bacterianas en verano, donde las lluvias son frecuentes, son significativamente menores con respecto a las detectadas en invierno, como consecuencia de la limpieza que se produce en el aire ambiental por el arrastre de polvo y otros contaminantes que provoca la lluvia.

TIPO DE MICROORGANISMO	INVIERNO			VERANO		
	Concentración (UFC.m ⁻³)	T (°C)	HR (%)	Concentración (UFC.m ⁻³)	T (°C)	HR (%)
Hongos	210.5	26.1 ^b	66.6 ^b	536.0 ⁺	30.1 ^b	71.8 ^b
Bacterias	1 378.3 * ⁺			1 060.1 *		
Microorganismos Totales ^a	1 588.8			1 596.1		

^a Suma de la concentración media de hongos y de bacterias

^b Media de todas las mediciones realizadas en los 6 depósitos (n = 30)

* Diferencias significativas al comparar las concentraciones de hongos y bacterias, según prueba de Student para p 0.05

⁺ Diferencias significativas que se obtuvieron al comparar las concentraciones de hongos y bacterias en invierno y verano,

Tabla 1. Valores promedios de concentración microbiana en el aire, temperatura (T) y humedad relativa (HR) en seis depósitos durante las estaciones de invierno (sequía) y verano (húmeda).

Table 1: Mean air microbial concentration, temperature (T) and relative humidity (HR) in six repositories in winter (dry season) and summer (wet season).

.Con relación al sótano, los niveles de hongos en verano son significativamente mayores a los detectados en el resto de los pisos (Tabla 2) y eso esta muy relacionado con la elevada humedad que conserva esta zona del edificio, que propicia que los conidios absorban más agua y por tanto sedimenten con mayor facilidad sobre la superficie de las placas Petri.

Al analizar el ambiente de la Mapoteca (Tabla

3), se aprecia que las concentraciones microbianas no aumentaron significativamente en el verano, y eso esta dado porque este local esta debidamente climatizado durante todo el año manteniendo una temperatura y humedad relativa estable de 23.8 ± 1.9°C y 44 ± 3%, respectivamente, asimismo permanece cerrado y adecuadamente limpio.

NIVELES	TIPO DE MICROORGANISMO	INVIERNO			VERANO		
		Conc. (UFC.m ⁻³)	T (°C)	HR (%)	Conc. (UFC.m ⁻³)	T (°C)	HR (%)
SOTANO	Hongos	244 a	25.5 ²	70.0 ²	773 b	28.5 ²	75.2 ²
	Bacterias	511 A			369 A		
	Totales ¹	755			1 142		
PRIMER PISO	Hongos	163 a	26.4 ²	66.3 ²	388 a	31.1 ²	70.3 ²
	Bacterias	1 058 B *			540 B		
	Totales ¹	1 221			928		
SEGUNDO PISO	Hongos	307 a	26.5 ²	63.1 ²	448 a	32.0 ²	68.5 ²
	Bacterias	2 536 C *			1 056 C		
	Totales ¹	2 843			1 504		

¹ Suma de la concentración media de hongos y de bacterias

² Media de 10 determinaciones realizadas en los dos depósitos analizados en cada piso (5 por depósito)

a, b, c, A, B y C. Diferencias significativas al comparar las concentraciones de bacterias o de hongos entre los distintos niveles muestreados, según ANOVA-1 y Duncan (p 0.05)

* Diferencias significativas al comparar las concentraciones bacterianas en invierno y verano, según prueba de Student (p 0.05)

Tabla 2. Concentración microbiana en el aire (Conc.), temperatura (T) y humedad relativa (HR) en los depósitos del Archivo Nacional de Cuba ubicados en los tres pisos del edificio.

Table 2. Air microbial concentration (Conc.), temperature (T) and relative humidity (HR) in repositories located in the three floors of National Archive of Cuba.

Si bien no existe una norma internacional que indique cuando un ambiente está contaminado o no, algunas referencias sugieren que la concentración microbiana debe estar por debajo de 1000 UFC.m^{-3} para que el ambiente sea considerado como no contaminado (Wonder Makers Environmental, 2001; Eagle Industrial Hygiene Associates, 2004; Cassares, 2007). En esta investigación la concentración microbiana se determinó empleando un

método de sedimentación (Omeliansky), el cual resulta poco preciso en comparación con los métodos de compactación (biocolector), a pesar de ello, las concentraciones de hongo en las dos estaciones del año, resultaron bajas, por lo que se puede clasificar el ambiente como NO contaminado para hongos. Sin embargo, los valores de bacterias fueron superiores a 1000 UFC.m^{-3} por lo que se puede considerar que el aire interior de los locales es de mala calidad.

TIPO DE MICROORGANISMO	INVIERNO			VERANO		
	Conc. (UFC.m^{-3})	T ($^{\circ}\text{C}$)	HR (%)	Conc. (UFC.m^{-3})	T ($^{\circ}\text{C}$)	HR (%)
Hongos	78.0	22.8 ²	44.0 ²	82.2	23.4 ²	45.0 ²
Bacterias	638.6			650.3		
Microorganismos Totales ¹	716.6			732.5		

¹ Suma de la concentración media de hongos y de bacterias

² Media de 5 determinaciones

Tabla 3. Concentración microbiana en el aire, temperatura y humedad relativa medias en la Mapoteca durante las estaciones de invierno (sequía) y verano (húmeda).

Table 3. Air microbial concentration (Conc.), temperature (T) and relative humidity (HR) in the Map repository during winter (dry season) and summer (wet season).

Similares concentraciones fúngicas ambientales fueron detectadas en Cuba en ambientes interiores de viviendas, archivos, bibliotecas y museos que se analizaron con biocoletores (Aira *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2002; Borrego, 2004; Hidalgo & Borrego, 2006; Borrego *et al.*, 2008). Sin embargo, en estudios previos en depósitos del Archivo Nacional utilizando un aeroscopio se encontraron concentraciones microbianas

significativamente menores a los reportados en este estudio (Vaillant *et al.*, 1989). Esto demuestra dos cuestiones: primero, la necesidad de realizar muestreos sistemáticos para conocer la variabilidad de la microbiota, y segundo, que el aumento de la contaminación microbiana del aire de los depósitos puede deberse a un aumento de la contaminación del ambiente exterior que rodea al Archivo Nacional que se introduce

en los depósitos a través de los conductos de ventilación natural, por lo que realizar adecuaciones apropiadas a este sistema de ventilación podría contribuir a una mejoría en la calidad del ambiente interior de los mismos.

Géneros fúngicos aislados del aire de los locales

En general, los géneros fúngicos que predominaron en el invierno fueron *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Penicillium* y en menor medida también se detectaron *Curvularia*, *Alternaria* y *Fusarium* (Tabla 4). En verano, aunque también se aislaron los géneros *Aspergillus* y *Cladosporium*, se detectaron también en algunos depósitos los géneros *Mucor* y *Chrysonillia*, llegando este último a estar en mayoría en algunos de ellos. El hecho de que en invierno las concentraciones de *Aspergillus* y *Penicillium* fueran mayores que en verano es un comportamiento esperado, pues se considera por otros autores que esta es una típica condición de las esporas de los hongos de la sequedad (Levetin, 1995, 2002). En tanto *Cladosporium*, mostró un incremento marcado en verano lo que se corresponde con resultados obtenidos por otros autores (Levetin, 2002).

Con relación a la Mapoteca (Tabla 5) se puede apreciar que tanto en invierno como en verano, predominó el género *Penicillium*.

Como en la mayoría de los depósitos se detectaron altos porcentajes de cepas pertenecientes al género *Aspergillus*, el cual posee especies de interés clínico (Latgé, 1999; Gost *et al.*, 2003; Gallup, 2006; Nevalainen & Morawska, 2009), se realizó la identificación hasta especies para definir el predominio de las mismas. En la tabla 6 se

aprecia que *Aspergillus niger* fue la que predominó en todos los depósitos aunque *A. flavus* y *A. versicolor* se detectaron en todos ellos en mayor o menor porcentaje.

Género fúngico	Depósito 3		Depósito 8		Depósito 13		Depósito 18		Depósito 23		Depósito 28	
	INVIERNO	VERANO	INVIERNO	VERANO	INVIERNO	VERANO	INVIERNO	VERANO	INVIERNO	VERANO	INVIERNO	VERANO
<i>Aspergillus</i>	46.9	6.6	15.0	-	54.1	3.9	20.4	22.3	31.8	27.5	57.1	13.8
<i>Cladosporium</i>	26.5	83.5	25.0	44.4	18.9	71.4	52.3	29.5	18.2	37.5	14.3	31.1
<i>Penicillium</i>	18.4	-	35.0	-	13.5	-	9.1	-	9.1	-	14.3	3.4
<i>Curvularia</i>	4.1	-	15.0	-	2.7	2.4	2.3	-	18.2	-	-	-
<i>Alternaria</i>	4.1	3.3	-	3.7	5.4	6.5	6.8	-	9.1	-	-	-
<i>Fusarium</i>	-	3.3	10.0	3.7	5.4	6.5	9.1	5.3	13.6	12.5	9.1	5.3
<i>Mucor</i>	-	2.5	-	22.3	-	5.4	-	8.5	-	5.0	-	-
<i>Chrysonilia</i>	-	0.8	-	25.9	-	3.9	-	34.4	-	17.5	-	34.4

Tabla 4. Densidad relativa (%) de los géneros fúngicos aislados del aire de seis depósitos en el Archivo Nacional de Cuba.

Table 4. Relative density (%) of fungi genera isolated from the air at six repositories in the National Archive of Cuba.

Géneros fúngicos	INVIERNO	VERANO
	Densidad relativa (%)	
<i>Aspergillus</i>	22.0	20.0
<i>Cladosporium</i>	-	-
<i>Penicillium</i>	44.0	40.0
<i>Curvularia</i>	19.0	20.0
<i>Alternaria</i>	-	-
<i>Fusarium</i>	-	-
<i>Syncephalastrum</i>	15.0	20.0

Tabla 5. Densidad relativa de los géneros fúngicos aislados del aire de la Mapoteca.

Table 5. Relative density of fungal genera isolated from air in the Map repository.

DEPÓSITOS	3	8	13	18	23	28	Mapoteca
Especies	Densidad relativa (%)						
<i>A. niger</i> *	25.9	6.1	15.8	10.8	12.5	16.2	20.0
<i>A. clavatus</i>	-	-	10.2	-	1.6	6.1	-
<i>A. flavus</i> *	5.0	2.4	9.3	4.1	9.8	15.5	-
<i>A. flavipes</i>	-	-	8.4	2.0	3.2	9.4	-
<i>A. terreus</i>	10.8	4.0	2.1	2.0	3.1	4.0	-
<i>A. versicolor</i>	12.6	2.5	8.3	1.5	1.6	5.9	-
TOTAL	46.9	15.0	54.1	20.4	31.8	57.1	20.0

* Especies de mayor interés clínico dentro de las aisladas (Lalgé, 1999; Gost *et al*, 2003; Gallup, 2006; Nevalainen & Morawska, 2009)

Tabla 6. Densidad relativa (%) de las especies de *Aspergillus* en depósitos del Archivo Nacional de Cuba.

Table 6. Relative density (%) of *Aspergillus* species in repositories at the National Archive of Cuba.

Caracterización fisiológica de los géneros fúngicos aislados del aire

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 7). Así mismo, el 80 % de estos hongos excretaron diferentes pigmentos sobre el papel, abarcando colores desde el amarillo hasta el carmelita intenso pasando por el naranja y tonos rojizos. También se evidenció que todas las cepas produjeron ácidos, pues propiciaron una disminución significativa del pH del medio de cultivo.

Cepa	Crecimiento en papel de filtro	Crecimiento en celulosa cristalina	Producción de pigmentos ^a	pH
<i>Aspergillus niger</i> 1	+++	++	+	4.5
<i>A. niger</i> 2	+++	++	+	5.8
<i>A. clavatus</i>	++	+	+	4.9
<i>A. fumigatus</i>	++	+	+	6.1
<i>A. flavus</i>	+++	++	+	5.0
<i>A. nidulans</i>	++	+	-	4.8
<i>A. flavipes</i>	++	+	-	5.2
<i>A. terreus</i>	+++	++	+	6.2
<i>A. versicolor</i>	+++	++	+	5.1
<i>Cladosporium</i> sp. 1	+++	++	+	3.6
<i>Cladosporium</i> sp. 2	+	±	+	4.7
<i>Cladosporium</i> sp. 3	++	++	+	5.0
<i>Penicillium implicatum</i>	+++	++	-	4.4
<i>P. chrysogenum</i>	++	+	+	5.6
<i>P. commune</i>	+++	++	+	4.5
<i>P. aurantiogrosum</i>	+++	+	+	5.2
<i>P. citrinum</i>	++	+	+	6.0
<i>P. decumbens</i>	++	+	+	5.8
<i>Curvularia</i> sp. 1	+	+	+	5.5
<i>Curvularia</i> sp. 2	+	+	+	6.0
<i>Curvularia</i> sp. 3	+	±	+	4.5
<i>Alternaria</i> sp. 1	-	-	±	4.8
<i>Alternaria</i> sp. 2	+	±	+	5.4
<i>Fusarium</i> sp.	++	+	+	5.7
<i>Syncephalastrum</i> sp.	++	+	-	6.1
<i>Mucor</i> sp.	+++	+	+	5.3
<i>Chrysonilia</i> sp.	+++	+	-	6.1

+++ : crecimiento abundante, ++ : crecimiento moderado, + : crecimiento pobre, o presencia de pigmento, : crecimiento o producción de pigmento muy pobre, - : falta de crecimiento y falta de producción de pigmento, ^a: producción de pigmentos evidente sobre la tira de papel de filtro

Tabla 7. Actividad celulolítica cualitativa, producción de pigmentos y de ácidos de los hongos aislados del aire de depósitos del Archivo Nacional de Cuba.

Table 7. Qualitative cellulolytic activity, acid and pigment production by fungi isolated from fungi isolated from air at repositories in the National Archive of Cuba.

Los hongos provocan alteraciones cromáticas debido a manchas de diferentes colores, tonalidades y texturas producto de la excreción de pigmentos y al crecimiento micelial. Cuando crecen sobre el papel, degradan todos sus componentes y principalmente su fuente carbonada, la celulosa, y excretan ácidos orgánicos tales como ácido oxálico, fumarico, succínico y acético, los que se depositan sobre el soporte acidificándolo. En particular, los altamente celulolíticos llegan a atacar las fibras celulósicas y la debilitan. Es decir, que además de las afectaciones cromáticas producen daños químicos y estructurales (Florian, 2003; Martínez, 2003; Hidalgo & Borrego, 2006; Pinzari *et al.*, 2006; Borrego *et al.*, 2008)

Por otro lado, es conocido que un gran número de especies fúngicas pueden causar un amplio espectro de enfermedades en humanos. Los hongos poseen diferentes estructuras y mecanismos patogénicos causantes de afectaciones específicas como rinitis, asma bronquial y alveolitis o neumonitis generalizada. Dentro de ellos, componentes moleculares de la pared tales como el ergosterol y el 1-3, -D-glucano, han sido asociados a afectaciones respiratorias, aun cuando los hongos no estén viables (Rylander, 1998; Gorny *et al.*, 2002). Asimismo, la mayoría producen compuestos orgánicos volátiles (COV) y micotoxinas que resultan dañinas al hombre (Levetin, 2003; Gallup, 2006; Nevalainen & Morawska, 2009). Los COV son los causantes de los olores a humedad y a material (papel o tela) viejo, por lo que resultan altamente irritantes para el sistema respiratorio y los ojos provocando reacciones no específicas (Nevalainen & Morawska, 2009). Asimismo, dan lugar a un ambiente enrarecido de

diferentes tipos de compuestos químicos que pueden reaccionar con los diferentes soportes documentales acelerando su deterioro.

Las micotoxinas de muchos hongos pueden ser inhaladas y penetrar por esta vía en el cuerpo pudiendo producir afectaciones neurotóxicas (Baxter *et al.*, 1981). También pueden ser absorbidas por la piel provocando dermatosis severa (Eagle Industrial Hygiene Associates, 2004).

Si se tiene en cuenta el potencial patógeno de la mayoría de los géneros fúngicos aislados, se pudiera pensar que el ambiente puede resultar riesgoso para la salud humana. Si bien este análisis es cierto, es importante señalar que no sólo la concentración fúngica juega un papel principal, sino también el tiempo de exposición al ambiente y las características inmunológicas de los individuos son otros aspectos que intervienen en el desencadenamiento de cualquier afectación a la salud (Nevalainen & Morawska, 2009). Por ello, se plantea que en los depósitos de archivo no se debe trabajar permanentemente y cuando se requiere entrar, se debe hacer debidamente protegidos (Florian, 2002 y 2003).

Géneros bacterianos aislados del aire en ambos locales

En relación a las bacterias aisladas, después de agruparlas por sus características culturales y de tinción (Gram), se pudo apreciar que la morfología de las colonias así como su comportamiento frente a la tinción de Gram fue muy variada (Tabla 8). Se evidenció un predominio marcado de las bacterias Gram positivas (entre cocos y bacilos) en todos los depósitos estudiados independientemente de la etapa del año

analizada. Es de señalar, que en casi todos los depósitos se detectó el género *Streptomyces* en porcentajes variables, pero la tendencia fue a incrementarse en el verano. Asimismo, se identificaron cepas de otros géneros Gram positivos tales como *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Bacillus polimixa* y *Corynebacterium* sp.

En cuanto a las bacterias Gram negativas, los niveles detectados fueron menor en la mayoría de los depósitos, a excepción de la Mapoteca, que en invierno presentó un 77% de este tipo de bacterias. Entre ellas se identificaron *Serratia marcenscens*, *Serratia* sp., *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter hafniae* y *Hafnia alvei*.

Los resultados que se obtuvieron para las bacterias Gram positivas se corresponden con lo reportado en la literatura para este tipo de

ambientes, pues independientemente del aporte de microorganismos que provoca la penetración del polvo en los ambientes de interiores, se plantea que este grupo de bacterias también pueden ingresar al interior de los locales, como consecuencia de la actividad del hombre, ya que muchas de ellas pueden formar parte de la piel y las mucosas del organismo (Zhu *et al.*, 2003; Tsai & Macher, 2005) y pueden ser transportadas por los zapatos de la personas y por el polvo que se encuentra suspendido en el piso y que se remueve cuando las personas caminan sobre él (Goh *et al.*, 2000). En cuanto a las Gram negativas, resultados similares han sido reportados en ambientes de archivos (Valentín *et al.*, 1997; Valentín *et al.*, 2001) y en particular en depósitos del Archivo Nacional de la República de Cuba (Vaillant, 1996; Vaillant *et al.*, 1997; Borrego *et al.*, 2008).

Depósito	Grupos bacterianos	Densidad relativa (%)	
		Invierno	Verano
3	Cocos Gram negativos	32.1	32.0
	Bacilos Gram negativos	15.8	16.5
	Cocos Gram positivos	29.5	34.0
	Bacilos Gram positivos no esporulados	22.6 ^a	-
	Bacilos Gram positivos esporulados	-	17.5 ^b
8	Cocos Gram negativos	20.8	7.5
	Bacilos Gram negativos	19.5	22.3
	Bacilos Gram positivos esporulados	59.7 ^b	70.2 ^b
13	Cocos Gram negativos	10.1	18.0
	Cocos Gram positivos	40.2	42.7
	Bacilos Gram positivos no esporulados	26.1 ^a	20.5 ^a
	Bacilos Gram positivos esporulados	23.6 ^b	18.8 ^b
18	Bacilos Gram negativos	-	10.8
	Cocos Gram positivos	45.4	16.2
	Bacilos Gram positivos no esporulados	38.2	52.6 ^a
	Bacilos Gram positivos esporulados	16.4 ^b	20.4 ^b
23	Bacilos Gram negativos	25.4	27.8
	Cocos Gram positivos	45.5	37.7
	Bacilos Gram positivos no esporulados	29.1 ^a	34.5 ^a
28	Bacilos Gram negativos	2.0	29.5
	Cocos Gram positivos	47.3	41.8
	Bacilos Gram positivos no esporulados	50.7 ^a	28.7 ^a
Mapoteca	Cocos Gram negativos	55.0	11.5
	Bacilos Gram negativos	22.0	2.4
	Cocos Gram positivos	12.0	34.6
	Bacilos Gram positivos no esporulados	11.0 ^a	35.6 ^a
	Bacilos Gram positivos esporulados	-	15.9 ^b

^a Incluye un porcentaje de cepas de *Streptomyces* sp

^b Este porcentaje pertenece al género *Bacillus*

Tabla 8. Densidad relativa de los distintos grupos bacterianos aislados del aire de depósitos del Archivo Nacional de Cuba.

Table 8. Relative density of different bacterial groups isolated from air at repositories in the National Archive of Cuba.

Como es conocido, especies de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* pueden provocar enfermedades cuando penetran al organismo humano mediante lesiones en la piel, en las membranas de las mucosas o en las vías respiratorias (Isenberg et al., 1991).

El género *Corynebacterium* posee especies que forman parte de la microbiota normal de la piel de las personas y en caso de inmunosupresión pueden convertirse en patógenos oportunistas provocando enfermedades tales como artritis, osteomielitis, bronquitis, etc. (Clarridge & Spiegel, 1995).

Por su parte, el género *Streptomyces* está vinculado con afectaciones alérgicas de los alvéolos por hipersensibilidad (neumonitis) (Spsychalski et al., 1981) y desde 1988 se considera uno de los grupos bacterianos más importantes con relación a los riesgos laborales (Dutkiewicz et al., 1988). Sin embargo, no fue hasta 1997 que Hirvönen et al. confirmaron experimentalmente la afectación que produce al sistema respiratorio, provocándole asma a las personas que la respiran. En 2003 se demostró que *Streptomyces* es más potente que las esporas fúngicas en la inducción y producción de mediadores proinflamatorios en las células (Huttunen et al., 2003).

Las bacterias Gram negativas producen endotoxinas que están compuestas por lipopolisacáridos relacionados con la membrana bacteriana, al inhalarse desencadenan irritación de las mucosas del sistema respiratorio causando fiebre, escalofríos, malestares, dolores de cabeza. Esto ocurre cuando se activan los macrófagos de los pulmones y de otras células respiratorias provocando inflamación del sistema

respiratorio. Como consecuencia de una exposición continuada a este tipo de bacterias puede producirse bronquitis y asma (Nevalainen & Morawska, 2009). También se ha visto que estas bacterias pueden exportar informaciones genéticas relacionadas con la resistencia a antibióticos y a la excreción de endotoxinas a través del aire en forma de compuestos volátiles, aún después de muertas, lo cual las hace en extremo peligrosas (Heal & Parsons, 2002). Dentro de este grupo de bacterias se reporta que *Serratia marcescens* y *Enterobacter* sp. están relacionadas con enfermedades respiratorias (America's Most Wanted Biological Agents, 2003) y precisamente estas especies se aislaron en los locales estudiados.

Se ha publicado que concentraciones altas de especies de *Bacillus* en el aire de interiores es generalmente indicativo de daños provocados por agua o por la necesidad de realizar un mantenimiento constructivo en el edificio (Baxter et al., 1981). La causa de la existencia de este género bacteriano en los depósitos se corresponde precisamente con la necesidad de realizar una reparación capital al inmueble y al sistema de ventilación natural al que se le deben colocar filtros apropiados que impidan la entrada del polvo fundamentalmente. Con relación a la capacidad de biodeteriorar papel, se conoce desde hace muchos años que los géneros *Bacillus* y *Streptomyces* tienen una marcada actividad celulolítica (Ramírez & Coha, 2003; Villalba et al., 2004) es decir, pueden atacar el papel y degradarlo a una humedad relativa de 90 % en 24 horas lo cual pudiera llevarse a cabo si la humedad relativa de los depósitos aumentara bruscamente por cualquier motivo.

CONCLUSIONES

- En verano, la concentración fúngica promedio aumentó considerablemente en el aire de los locales como consecuencia de un aumento marcado de la humedad relativa en los mismos, en tanto, la concentración bacteriana promedio disminuyó.
- En invierno predominaron hongos de los géneros *Cladosporium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, en tanto que en verano, aunque continuó predominando el género *Cladosporium*, en la mayoría de los depósitos se notó una aparición significativa de hongos pertenecientes a los géneros *Mucor* y *Chrysonilia*.
- Independientemente a la gran variabilidad de hongos aislados, se evidenció actividad celulolítica, producción de pigmentos y de ácidos en la mayoría de las cepas fúngicas aisladas. Esto demuestra que existe un riesgo elevado de que los documentos se biodeterioreen aceleradamente si la temperatura y la humedad relativa aumentaran y se mantuvieran altas por varios días o semanas.
- Dentro de las bacterias del aire, el predominio correspondió a las Gram positivas.
- Las cepas bacterianas identificadas fueron *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Bacillus polymyxa*, *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Serratia marcenscens*, *Serratia* sp., *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter hafniae* y *Hafnia alvei*.
- Se detectaron los géneros *Bacillus* y *Streptomyces* en porcentajes que variaron de bajos a altos. Por poseer actividad celulolítica pueden constituir un riesgo de biodeterioro.
- Se evidenció que la presencia de elevados niveles de bacterias y hongos con potencialidades patogénicas, pueden constituir un riesgo para la salud del personal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los proyectos ADAI (090E/2005 y 087E/2005), al Proyecto de Colaboración Científica SECyT/CITMA (Argentina-Cuba) Cu/Pa-Ex/025 y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) PIP 6075/05, el financiamiento del trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aira MJ, Rojas TI & Jato V. 2002. Fungi associated with three houses in Havana (Cuba). *Grana*, 41: 114-118
- America`s Most Wanted Biological Agents. 2003. *Bacteria Associated with Respiratory Illnesses*.
<http://www.aerias.org/jtf-mostwanted.htm>.
- Barnett HL & Hunter BB. 1987. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3rd Edition, Burgess Publishing Co. Minneapolis: 241 p
- Baxter CS, Wey HE & Burg WE. 1981. A prospective analysis of the potential risk associated with inhalation of aflatoxin-contaminated grain dusts. *Food Cosmet Toxicology*, 19: 763-769
- Bogomolova EV & Kirtsideli I. 2009. Airborne fungi in four stations of the St. Petersburg underground railway system. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63: 156-160
- Borrego S. 2004. Método para contabilizar microorganismos del aire en ambientes de archivos y bibliotecas. *Boletín Patrimonio y Desarrollo* (Cuba), 11: 8-9
- Borrego S, Pons V & Perdomo I. 2008. La contaminación microbiana del aire en dos depósitos del Archivo Nacional de la República de Cuba. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 39: 63-69
- Cassares NC. 2007. Calidad del aire interior. En: *Taller de Preparación para desastres. Recuperación de los daños biológicos en colecciones afectadas por desastres*. Instituto de Historia de Cuba. Editora Historia, Cuba: 7 - 9
- Clarridge JE & Spiegel CA. 1995. *Corynebacterium* and miscellaneous irregular gram-positive rods, *Erysipelothrix*, and *Gardnerella*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC & Tenover FC (ed) *Manual of Clinical Microbiology*. 6th edition, American Society of Microbiology, Washington: 357-378
- Dutkiewicz J, Jablonski L & Olenchok SA. 1988. Occupational biohazards: a review. *American Journal of Industrial Medicine*, 14: 605-623
- Eagle Industrial Hygiene Associates. 2004. *Microbial Sampling and Analysis: molds and bacteria*.
<http://www.eagleih.com/micro.html>.
- Florian M-LE. 1997. *Heritage Eaters. Insects and fungi in heritage collections*. James and James Science Publishers Ltd., London: 12 p
- Florian M-LE. 2000. Aseptic technique: A goal to strive for in collection recovery of moldy archival materials and artifacts. *JSTOR: Journal of the American Institute for Conservation*, 39: 107-115

- Florian M-LE. 2002. *Fungal Facts. Solving fungal problems in heritage collections*. Archetype Publications Ltd., London: 146 p
- Florian M-LE. 2003. Water, heritage photographic materials and fungi. *Topics in Photographic Preservation*, 10: 60-73
- Gallo F, Valenti P, Colaizzi P, Sclocchi MC, Pasquariello G, Scorrano M, Maggi O & Persiana AM. 1996. Research on the viability of fungal spores in relation to different microclimates and materials. *International Conference on Conservation and Restoration of Archive and Library Materials*. Erice, Roma, Italy, 1: 177-193
- Gallup D. (Chairman). 2006. Fungal Library. *The Environmental Reporter EMLab. A Technical Newsletter for IAQ Professionals*. <http://www.emlab.com/app/fungi/Fungi.po>.
- Goh I, Obbard JP, Viswanathan S & Huang Y. 2000. Airborne bacteria and fungal spores in the indoor environment. A case study in Singapore. *Acta Biotechnologica*, 20: 67-73
- Gorny RL, Reponen T, Willeke K, Schmechel D, Robine E, Boissier M & Grinshpun SA. 2002. Fungal fragments as indoor air biocontaminants. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 3522-3531
- Gost J, Bermejo B, Rivero M, Espatolero MJ, Polo I & Sínz de la Murieta J. 2003. Vigilancia y control de las infecciones originadas por gérmenes oportunistas: aspergilosis. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 23: 185-192
- Heal RD & Parsons AT. 2002. Novel intercellular communication system in *Escherichia coli* that confers antibiotic resistance between physical separation populations. *Journal Applied Microbiology*, 92: 1116-1122
- Hidalgo Y & Borrego S. 2006. Aislamiento y caracterización de hongos en documentos de la Biblioteca Nacional "José Martí". *Bibliotecas*. http://www.bnjm.cu/rev_biblioteca/bibliotecas_2006/pages/articulo6.htm.
- Hirvönen MR, Nevalainen A, Makkonen M, Mönkkönen J & Savolainen K. 1997. *Streptomyces* spores from moldy houses induce nitric oxide, TNF and IL secretion from RAW264.7 macrophage cell line without causing subsequent cell death. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 3: 57-63
- Holt JG (ed). 1984. *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*. Edit. Williams & Wilkins, Baltimore, London. 1: 2648 p
- Huttunen K, Hyvärinen A, Nevalainen A, Komulainen H, Hirvönen MR. 2003. More intense production of proinflammatory mediators by indoor air bacteria than fungal spores in mouse and human cell lines. *Environmental Health Perspectives*, 111: 85-92

- Image Bank. Species images of *Aspergillus*. 2006. *The Aspergillus Website*. <http://www.aspergillus.man.ac.uk/indexhome.htm>.
- Isenberg HD & DAmato RF. 1991. Indigenous and pathogenic microorganisms of humans. En: Balows A, Hausler JrWJ, Herrman KL, Isenberg HD & Shadomy HJ (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. 5th Edition. Chapter 2. American Society for Microbiology, Washington, D.C: 2-14
- Kolwzan B, Adamiak W, Grabas K & Pawełczyk A. 2006. Microbiology of air. En: *Introduction to Environmental Microbiology*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław: 86-109
- Latgé JP. 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergilosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 310-350
- Levetin E. 1995. Fungi. En: Burge H (ed) *Bioaerosols*. Lewis Publishers/ CRC Press, Boca Ratón, Florida: 87-120
- Levetin E. 2002. Bioaerosols in agricultural and out door setting. En: Bitton G (Ed.) *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. John Wiley and Sons, NY: 404-416
- Mandrioli P. 2002. Bioaerosol and Biodeterioration. *EC Advance Study Course 8-19 April. Science and Technology for Sustainable Protection of Cultural Heritage. Technical Notes for Session 7-8*. UCL Center for Sustainable Heritage London, UK: 15 p
http://www.ucl.ac.uk/sustainableheritage/Archive_0906/.../TechNotes-PM.pdf
- Maggi O, Persiani AM, Gallo F, Valenti P & Pasquariello G. 2000. Airborne fungal spores in dust present in archives: proposal for a detection method, new for archival materials *Aerobiologia*, 16: 429-434
- Martínez P. 2003. Determinación de la acidez producida por hongos contaminantes en bienes culturales. *Boletín Patrimonio y Desarrollo* (Cuba), 9: 3-4.
- Nevalainen A & Morawska L (ed). 2009. Biological agents in indoor environments. Assessment of health risks. Work conducted by a WHO Expert Group between 2000-2003, QUT, April.
http://www.ilqah.qut.edu.au/Misc/BIOLOGICAL_AGENTS_2009.pdf
- Nugari MP & Roccardi A. 2001. Aerobiological investigations applied to the conservation of cultural heritage. *Aerobiologia*, 17: 215-223
- Petushkova J & Kandyba P. 1999. Aeromicrobiological studies in the Moscow cathedrals. *Aerobiología*, 15: 193-201

- Pinzari F, Fanelli C, Canhoto O & Magan N. 2004. Electronic nose for the early detection of moulds in libraries and archives. *Indoor Built Environment*, 13: 387-395
- Pinzari F, Pasquariello G & De Mico A. 2006. Biodeterioration of paper: A SEM study of fungal spoilage reproduced under controlled conditions. *Macromolecular Symposia*, 238: 57-66
- Pitt JI. 2000. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Color Appendix. Third edition published by Food Science, Australia.
<http://www.dehs.umn.edu/iaq/fungus/penicillium/penicillium.html>.
- Radler de Aquino F & de Góes LF. 2000. Guidelines for indoor air quality in offices in Brazil. *Proceedings of Healthy Buildings*, 4: 549-553
- Ramírez P & Cocha JM. 2003. *Enzymatic degradation of cellulose for thermophilic actinomycete: isolation, characterization and cellulolytic activity determination*. *Revista Peruana de Biología*, 10: 67-77
- Rautela GS & Cowling EB. 1986. Simple culture test for relative cellulolytic activity of fungi. *Applied Microbiology*, 14: 892-898
- Reponen T, Grinshpun SA, Conwell KL, Wiest J & Anderson M. 2001. Aerodynamic versus physical size of spores: measurement and implication for respiratory deposition. *Grana*, 40: 119-125
- Rojas TI, Martínez E, Gómez Y & Alvarado Y. 2002. Airborne spores of *Aspergillus* species in cultural institutions at Havana University. *Grana*, 41: 190-193
- Rylander R. 1998. Microbial cell wall constituents in indoor air and their relation to disease. *Indoor Air*, 4: 59-65
- Smith G. 1980. *Ecology and Field Biology*. 2nd Ed. Harper & Row, New York: 835 p
- Sneath PH, Mair NS, Sharpe ME & Holt JG (eds). 1986. *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*. Edit. Williams & Wilkins, Vol.2, Baltimore, London: 616 p
- Szychalski L, Dutkiewicz J, Uminski J, Smerdel-Skórska C, Chmielewska-Badora J, Dutkiewicz E, Flecha I & Kuce L. 1981. Cases of mass diseases of young people caused by work with grain. II. Clinical and immunological investigation. *Medyczny Wiejska*, 16: 205-216
- Teygeler R, de Bruin G, Wassink B & van Zanen B. 2001. *Preservation of archives in tropical climates. An annotated bibliography*. Paris, Jakarta, International Council on Archives, National Archives of the Netherlands, National Archives of the Republic of Indonesia: 249 p
- Tsai FC & Macher JM. 2005. Concentrations of airborne culturable bacteria in 100 large US office buildings from the BASE study. *Indoor Air*, 15: 71-81

- Toivola M, Alm S, Reponen T, Kolari S & Nevalainen A. 2002. Personal exposure and microenvironmental concentration of particles and bioaerosols. *Journal of Environmental Monitoring*, 4: 166-174
- Vaillant M, Chi L & Sánchez AI. 1989. Sobre la contaminación microbiológica existente en depósitos del Archivo Nacional. *Documentos*, 2: 44-65
- Vaillant M & Valentín N. 1996. *Principios básicos de la conservación documental y causas de su deterioro*. Ministerio de Educación y Cultura. Instituto del Patrimonio Histórico Español, Madrid: 158 p
- Valentín N, Vaillant M & Guerrero H. 1997. Programa de control integrado de plagas en bienes culturales de países de clima mediterráneo y tropical. *Apoyo*, 7: 13-14
- Valentín N, García R, Ibáñez JL & Maekawa S. 2001. Tratamientos con ventilación controlada para detener el crecimiento microbiano en materiales de archivo. *Revista Archivamos*, 39: 40-44
- Villalba LS, Mikán JF & Sánchez J. 2004. Actividades hidrolíticas y caracterización isoenzimática de poblaciones microbianas aisladas del patrimonio documental del Archivo General de Colombia. *NOVA*, 2: 50-58
- Wonder Makers Environmental Inc. 2001. Post-remediation guideline. Information Series 147.
http://www.wondermakers.com/public_html/Articles/Remediation%20Guidelines.pdf
- Zhu H, Phelan PE, Duan T, Raupp GB, Fernando HJS & Che F. 2003. Experimental study of indoor and outdoor airborne bacterial concentrations in Tempe, Arizona, USA. *Aerobiologia*, 19: 201-211