

Aeromicobiota de un depósito de alimentos en La Habana, Cuba

Airborne fungi of food depot in Havana, Cuba

Matilde Anaya ^a, Sofía Borrego ^{b*}, Hilda Cobo ^a, Oderlaise Valdés ^b, Alian Molina ^b

Palabras claves:

actividad enzimática, biodeterioro de materia orgánica, ambiente interior, Análisis de Peligros, Puntos Críticos, APPCC

Keywords:

biodeterioration of organic material, enzymatic activity, indoor environment, Hazard Analysis, Critical Control Points, HACCP

ABSTRACT

This paper was aimed at studying airborne fungi in a food depot in the west of Havana in Cuba and its relationship with temperature and relative humidity. Two samplings were taken in the rainy season. A passive settling method was applied and colonies were counted and expressed in units per meter cubic of air (CFU.m⁻³). The results showed that the food depot was not contaminated -144 and 760 CFU.m⁻³ air- on the basis of Omeliansky's criterion. Inside depot no lineal correlation was found between the temperature and relative air humidity with microbial concentration. The highest fungal concentration was registered in an area with organic material such as sugar, starch, wood and cardboard and the greatest values of relative humidity. The genera of fungi appearing with the greatest relative frequency (RF) were: **Trichoderma** (58.3%) and **Aspergillus** (41.7%). **Neurospora** (RF = 33.3%) was classified as an occasional genus while *Penicillium* (FR = 8.2%) was classified as a rare genus. These are biodeterioration agents of organic material since they have enzymes to degrade cellulose, starch and protein and excrete acids.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar la aeromicobiota de un depósito de alimentos, ubicado al oeste de La Habana, Cuba, y su relación con la temperatura y la humedad relativa del local. Se realizaron dos muestreos durante el periodo de lluvia aplicando un método de sedimentación pasiva y el conteo de las colonias fue expresado en unidades formadoras de colonias por metro cúbico de aire (UFC.m⁻³). Se determinó que dicho depósito de alimentos está poco contaminado (entre 144 y 760 UFC.m⁻³ de aire) según el criterio de Omeliansky. En el local, no se encontró correlación lineal entre la temperatura y la humedad relativa del aire con la concentración microbiológica. La zona de mayor concentración fúngica correspondió a los lugares con los materiales orgánicos (azúcar, almidón, madera y cartón) y los mayores valores de humedad relativa del aire. Los géneros de mayor frecuencia relativa (FR) de aparición fueron: **Trichoderma** (58.3 %) y **Aspergillus** (41.7 %). **Neurospora** (FR = 33.3 %) fue un género ocasional en tanto *Penicillium* (FR = 8.25 %) se comportó como un género raro. Ellos son agentes biodeteriorantes de la materia orgánica ya que poseen enzimas que degradan celulosa, proteínas y almidón, así como capacidad para excretar ácidos.

^aInstituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria (IIIA), Carretera al Guatao km 3 ½, La Habana, CP 19200, Cuba. E-mail: mavillal@iiaa.edu.cu, matildea@quimica.cujae.edu.cu

^bLaboratorio de Conservación Preventiva. Archivo Nacional de la República de Cuba. Compostela 906 esquina a San Isidro, CP: 10100, La Habana Vieja, La Habana. E-mail: sofia@arnac.cu, sborrego62@aol.com, sofia.borrego@rediffmail.com

* Autor para la correspondencia

INTRODUCCIÓN

Se ha encontrado que el aire en los hogares y edificios puede estar tan contaminado como el aire exterior, aún en las ciudades más desarrolladas (Codina *et al.*, 2008). Las causas de la contaminación en interiores pueden ser biológicas, químicas y físicas, o un efecto combinado, algo que ocurre con mayor frecuencia. Es por ello que se han realizado estudios para encontrar relaciones entre los diferentes factores y sus posibles interacciones.

Los estudios aerobiológicos más comunes han relacionado la concentración microbiana con las variables climáticas como temperatura (T) y humedad relativa (HR) del aire (Lignell *et al.*, 2007; Codina *et al.*, 2008) y, en ocasiones, con la velocidad del viento (Liao & Luo, 2005) habiéndose encontrado una correlación alta entre los factores biológicos y físicos.

Yu *et al.* (2002) proponen un modelo matemático obtenido en un túnel experimental para estudiar la efectividad de una abertura sobre la ventilación natural por inducción del viento. Estos autores refieren que el mismo es válido para velocidades de aire menor que $10 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, T menor que 50°C y HR entre 10 y 95 %, pero que tendría dificultades para usarse en edificaciones a menos que se conozcan las condiciones higrotérmicas de todo el año. Posteriormente, Liao & Luo (2005) probaron dicho modelo tomando la información necesaria para el cálculo de una investigación de calidad microbiológica del aire realizada en Taipei en 1996 durante siete días consecutivos en invierno y en verano. Con sus resultados demostraron que el modelo proporciona información práctica para mejorar el control de la calidad de microambientes interiores con viento inducido por ventilación natural.

También existen otras investigaciones que intentan explicar la posible influencia de otros parámetros en la proliferación de la aeromicota. Ejemplo de estas es la que realizaron Raisi *et al.* (2010) donde estudiaron la relación entre las concentraciones de propágulos fúngicos

viables y de bacterias con el material particulado de diámetro aerodinámico de $1 \mu\text{m}$ (PM_{10}), $2.5 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$) y $10 \mu\text{m}$ (PM_{10}). Se observó que la concentración de bacterias se incrementó cuando aumentó la concentración de hongos y que ambos disminuyeron con el aumento de la concentración másica de PM_{10} , $\text{PM}_{2.5}$ ó PM_{10} . La contaminación física y biológica no tuvieron correlación con los parámetros meteorológicos temperatura, humedad relativa, velocidad del viento y la radiación ultravioleta (Raisi *et al.*, 2010). La diferencia que se encontró en cuanto a la correlación de los factores físicos con la contaminación microbiológica para estas investigaciones sugiere la falta de una metodología común para realizar los muestreos, ya que en todos se utilizó la técnica volumétrica (biocolector Andersen).

Se plantea que los valores de las concentraciones fúngicas que se obtienen por los métodos volumétricos (biocoletores de tipo SAS, Andersen, Burkard, etc.) no son similares a los que se logran mediante un método gravimétrico como el propuesto por Omeliansky (Rojas *et al.*, 2008; Pasquarella *et al.*, 2011). Un estudio realizado recientemente por Asefa *et al.* (2009) en una planta de alimentos donde usaron un biocolector SAS y la sedimentación sobre placas Petri, indicó que ambos métodos presentaron similitud en cuanto a la información cualitativa de los géneros fúngicos predominantes. Sin embargo, con el SAS detectaron once géneros que no se aislaron con la técnica gravimétrica mientras que con ésta se encontraron *Fusarium* sp. y *Penicillium jensenii* que no se aislaron con el biocolector SAS.

En el estudio de Rojas *et al.* (2008) se utilizó un biocolector SAS y el método de sedimentación propuesto por Omeliansky y determinaron que los horarios más adecuados para el muestreo fueron entre las 11.00 y las 12.00 am, o temprano en la mañana (7.00 am), similar a lo reportado por Liao & Luo (2005) que encontraron concentraciones fúngicas máximas a las 2.00 am. Además, Rojas *et al.* (2008) concluyeron que para obtener información

cuantitativa el medio de cultivo más adecuado era Agar Extracto de Malta con 7.5 % cloruro de sodio mientras que para la información cualitativa era Agar Glucosa de Sabouraud.

Se plantea que los hongos filamentosos son el grupo microbiano de mayor interés entre los componentes de la aerobiota debido a que provocan numerosas enfermedades alergénicas en humanos y animales y causan pérdidas por biodeterioro de la materia orgánica de materiales de interés económico y patrimonial como alimentos, textiles, obras de arte y documentos de valor patrimonial. Esto se debe a su potente maquinaria metabólica que les permite excretar enzimas, pigmentos y ácidos (Borrego & Perdomo, 2012). Entre ellos existen varios géneros con fuerte actividad celulolítica (*Trichoderma*, *Chaetomium*, *Aspergillus* y *Neurospora*), proteolítica (*Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium*) y lipolítica (*Paecilomyces*) y otros como el *Aspergillus* pueden producir micotoxinas (Górny, 2004).

Las micotoxinas provocan un amplio espectro de efectos tóxicos y pueden ocasionar enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (Wijnand, 2009; García & Sánchez, 2012). Por tal motivo, el control microbiológico del aire en almacenes y plantas elaboradoras de alimentos se integra como parte del proceso de aseguramiento

de la calidad a través del sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP, siglas en inglés). Dicho sistema solo es efectivo si se identifican los peligros microbiológicos asociados con las diferentes etapas del proceso de elaboración de alimentos (Wong, 2008).

Por tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar la aeromicota de un depósito de alimentos y su relación con la temperatura y la humedad relativa del local.

MATERIALES Y MÉTODOS

Características del depósito de alimentos estudiado

El estudio se realizó en un depósito de alimentos al oeste de La Habana, Cuba. Su ubicación geográfica es 23° 0' N – 82° 5' W, municipio La Lisa, cuya temperatura media anual oscila entre 24 y 26 °C. El local no está climatizado, y en él se almacena gran variedad de alimentos crudos e insumos que se emplean como materia prima y materiales en diferentes procesos de elaboración de productos alimenticios. En su interior existe una nevera de refrigeración. El depósito tiene 70 m de largo por 24 m de ancho y 7 m de alto (Figura 1).

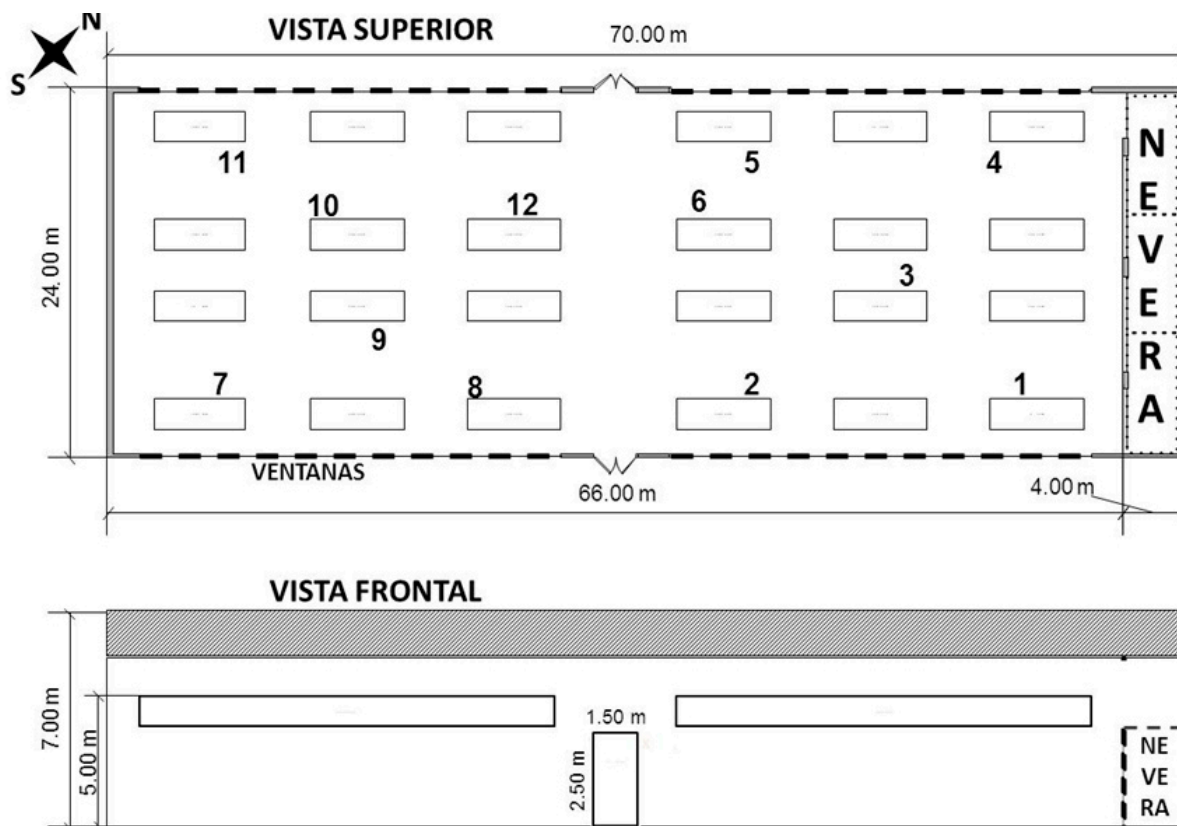


Figura 1. Esquema del depósito de alimentos analizado. Los números representan los puntos de muestreo del aire. Los cuadrados de líneas continuas representan los envases de alimentos.

Figure 1. Scheme of the food depot analyzed. Numbers represent the air sampled points. Squares with continuous lines represent the food containers. Above (top) and lateral (bottom) view

Metodología para el muestreo microbiológico del aire

Se realizaron muestreos del aire dos lunes (27 de mayo y 10 de junio de 2013) ya que el depósito permanece cerrado durante el fin de semana y en el período de lluvia, cuando los valores de humedad relativa y temperatura favorecen la contaminación aerobiológica. El tiempo de muestreo fue de 1 hora (10.00 a 11.00 am) y se seleccionó este horario de acuerdo con las recomendaciones de Rojas *et al.* (2008) y Raisi *et al.* (2010). La cantidad de puntos a muestrear, se ubicaron al azar y se calcularon a partir de la ecuación propuesta por la norma de FEDECAI-01 (2007) que también fue usada por Rojas *et al.* (2008):

$$P = 0.1 S^{0.56}$$

Donde, P es el número de puntos a muestrear y S es la superficie del local.

Debido a la presencia de las dos puertas en dicho local, los 12 puntos de muestreo que se obtuvieron se distribuyeron 6 a la derecha y 6 a la izquierda de las mismas (Figura 1) y se colocaron las placas Petri sobre los envases cerrados que contenían diferentes sustratos (Tabla 1). De esta forma se procuró tener un resultado representativo ya que alrededor de muchos envases había restos de su contenido. En general el local se encontraba limpio y sin presencia de humedad en sus paredes.

Ubicación en el depósito	Punto del muestreo	Coordenadas (m)		Sustrato sobre el que se colocaron las placas Petri
		X	Y	
Derecha	1	61	20	Proteína de soya en saco de papel
	2	42	19	Azúcar blanco en saco de nylon
	3	53	11	Nylon para cubrir sacos de azúcar
	4	59	4	Envases plásticos vacíos
	5	43	4	Almidón de maíz en saco de papel
	6	39	9	Pallets de madera
Izquierda	7	7	20	Malta tostada en saco de nylon
	8	23	19	Envases de cartón
	9	16	13	Grasa vegetal en envase plástico
	10	11	7	Glutamato monosódico en papel
	11	6	4	Envases de vidrio
	12	24	8	Envases de cartón

Nota: las placas Petri se colocaron en el mismo lugar en los dos muestreos.

Tabla 1. Distribución de los puntos de muestreo en el interior del depósito de alimentos.

Table 1. Distribution of sampling points inside the food depot

Determinación de los factores físicos

Se monitorearon los factores físicos temperatura (T) y humedad relativa (HR) del aire del depósito con un termohigrómetro digital (Hygro-Thermometer DHT-1, China) con escala de T de 5 a 50 °C (0.1°C precisión) y HR de 10 a 100 % (1 % precisión). La medición se realizó durante tres días consecutivos (lunes, martes y miércoles) a partir del día (lunes) que se realizó el muestreo de la aeromicobiota en los 12 puntos analizados a una distancia de 1 m de la pared y del suelo (a la derecha y a la izquierda) y en dos horarios del día (10.00 am y 2.00 pm). Se midió también por la tarde para determinar la variación de las condiciones climáticas del depósito en el momento más cálido del día después de permanecer cerrado en el horario de almuerzo de los trabajadores (de 12.00 a 1.00 pm).

Para valorar el efecto del viento y la reposición del volumen de aire sobre la concentración

fúngica del depósito, se realizaron cálculos aproximados a partir de valores estimados según las condiciones reales del local. Para esto solo se tuvo en cuenta el aire próximo a las puertas y se consideró que en estas zonas es donde debían existir los mayores valores de velocidad del aire, ya que las ventanas se encuentran a 5 m de altura. Para ello se utilizaron las ecuaciones propuestas por Yu *et al.* (2002) y Liao & Luo (2005):

$$\lambda_n = Q_n/V$$

Donde,

λ_n : velocidad de intercambio del aire por la ventilación natural (h^{-1}),

Q_n : razón de ventilación natural ($m^3 \cdot h^{-1}$)

V : volumen del local (largo x ancho x altura) (m^3).

$$Q_n = EAV_w$$

Donde A : área de la abertura de entrada del aire (m^2),

V_w : velocidad del viento ($m \cdot h^{-1}$) y E: abertura efectiva (adimensional), la cual se calcula:

$$E = 7.44 (0.2 Re)^{-0.35} (4 h_o/l_o)^{0.10} (\sin \varphi)^{0.75} (\sin h)^{-0.15}$$

Donde,

h_o/l_o : relación alto/largo de la abertura de entrada del aire,

h: ángulo de la pendiente del techo; ϕ : ángulo de incidencia principal del viento,

Re: número de Reynolds (adimensional) que se calcula por la siguiente ecuación:

$$Re = \rho V_w l / \mu$$

Donde,

ρ : densidad del aire ($kg \cdot m^{-3}$),

V_w : velocidad del aire ($m \cdot s^{-1}$),

l: longitud de la abertura (m),

μ : viscosidad del aire ($kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}$)

Se realizó la medición de la velocidad del aire (V_w) en $m \cdot s^{-1}$ en las zonas de los puntos 2, 5, 6, 8 y 12 alejados de los bordes de las puertas por donde circula el viento que crea turbulencias (régimen de flujo de transición), con un anemómetro de confección artesanal siguiendo las instrucciones de Orio (2008) que se calibró con uno industrial (marca PKT-5060, PCE Instruments, España) y empleando la siguiente ecuación:

$$V_w = (\pi D N) / 60$$

Donde,

D: diámetro medido entre los extremos de dos brazos opuestos (m) del anemómetro,

N: número de vueltas que da un brazo del anemómetro en un minuto (min^{-1})

Para los cálculos de Re se tomaron las propiedades del aire a $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$. El techo del depósito tiene una ligera inclinación ($h = 30^\circ$) y se asumió que el viento incide perpendicularmente al local ($\phi = 90^\circ$).

Determinación de la concentración fúngica en el aire

Se aplicó el método de sedimentación propuesto por Omeliansky (Bogomolova & Kirtsidely, 2009; Awad & Mawla, 2012; Borrego *et al.*, 2012). Para ello, placas Petri de 90 mm de diámetro con Agar Extracto de Malta (BIOCEN, Cuba) se expusieron abiertas durante 1 h. Luego de la incubación por 5 días a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ se realizó el conteo de las colonias convirtiéndolas a unidades formadoras de colonias por metro cúbico de aire

(UFC. m^{-3}) según la ecuación:

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

Donde,

N: concentración microbiana (UFC. m^{-3}),

a: número de colonias por placa Petri,

b: superficie de la placa (cm^2),

t: tiempo de exposición (min)

En este estudio se decidió mantener abiertas las placas Petri durante 1h para poder seguir la metodología propuesta por Pasquarella *et al.* (2000) que permite determinar el índice microbiológico ambiental (IMA), y que ha sido estandarizada y evaluada en numerosos estudios ambientales (Pasquarella *et al.*, 2012). La misma propone muestrear por 1 hora, colocando las placas a 1 m de altura del piso y a 1 m de las paredes (1:1:1). Se clasificó el grado de contaminación del local según la escala que propone Omeliansky a partir de las UFC. m^{-3} : altamente contaminado (mayor o igual que 1500), contaminado (1000 a 1500); ligeramente contaminado (750 a 1000), poco contaminado (500 a 750) y no contaminado (menor que 500) (Borrego, 2004).

Distribución de la concentración fúngica en el depósito

Se utilizó el software Surfer 8 (Rodríguez *et al.*, 2005) para obtener un mapa de contornos que muestra la distribución

espacial de la concentración fúngica en el depósito. Para ello se emplearon las coordenadas de cada punto de muestreo (Tabla 1).

Identificación de géneros fúngicos aislados

Se realizó el aislamiento y la purificación de las diferentes cepas de hongos que crecieron en las placas Petri utilizadas en los diferentes muestreos. Se realizó la observación de las características culturales y morfológicas de cada colonia tanto en el anverso como en el reverso, así como de las estructuras microscópicas a través de preparaciones en lactofenol, lactofenol-azul algodón (Booth, 1971) y microcultivos (Casadesús & Rojas, 1981). La ubicación en género se realizó de acuerdo con los criterios de Barnett & Hunter (2003).

Determinación de la frecuencia relativa de aparición de los géneros fúngicos

Los géneros identificados se clasificaron ecológicamente mediante la frecuencia relativa (FR) que se expresa en porcentaje de aparición en los muestreos, aplicando la siguiente ecuación (Esquivel *et al.*, 2003):

$$FR = \left[\frac{\text{Cantidad de muestreos en que aparece un género}}{\text{Total de muestreos}} \right] \times 100$$

A partir de los valores de FR a dichos géneros fúngicos se les otorgó una de las categorías ecológicas siguientes que fueron propuestas por Esquivel *et al.* (2003): muy común (81 a 100 %); común (61 a 80 %); frecuente o moderado (42 a 60 %); ocasional (21 a 40 %) o raro (0.1 a 20 %).

Determinación de la fisiología de los hongos aislados por técnicas cualitativas de actividad enzimática

Actividad celulolítica y producción de pigmentos

Las colonias se sembraron en cuñas de

cultivo sólido de composición salina para 1 L: 2 g de nitrato de sodio; 1 g de fosfato dipotásico; 0.5 g de sulfato de magnesio; 0.5 g de cloruro de potasio; 0.01 g de sulfato ferroso; 20 g de agar; pH = 5.5. Como fuente de carbono se emplearon tiras de papel de filtro de 4.8 cm de largo por 1 cm de ancho (equivalente a 50 mg), celulosa cristalina (1 %) y se empleó glucosa (1 %) como control. Los cultivos se incubaron a 28 °C durante 21 días. La producción de pigmentos se debe observar sobre la tira de papel de filtro (Borrego *et al.*, 2012).

Actividad proteolítica

La actividad proteolítica fue determinada a través de la hidrólisis de la gelatina en tubos de cultivo (Borrego *et al.*, 2010). Cada aislado fue inoculado por punción en el medio cuya composición salina fue similar al anterior solo que el medio no contenía agar y se le adicionó gelatina a razón de 120 g.L⁻¹. Los tubos inoculados se incubaron por 7 días a 30 °C. Posteriormente se incubaron a 4 °C por 1 h evidenciándose la reacción de hidrólisis por la liquefacción del medio al mover los tubos.

Actividad amilolítica

La actividad amilolítica se determinó a través de la hidrólisis del almidón en placas Petri (Borrego *et al.*, 2012). Cada aislado se inoculó por punción en un medio de composición salina similar al empleado anteriormente; agar 20 g y utilizando como fuente de carbono almidón (5 g.L⁻¹). Después de incubar por 7 días a 30 °C, se vertieron sobre cada placa de cultivo 5 mL de una solución del reactivo Lugol. La presencia de una zona incolora alrededor de las colonias fue tomada como indicador de una hidrólisis positiva.

Producción de ácidos

Suspensiones de esporas de cada cepa se sembraron en el caldo de cultivo de composición similar al antes descrito pero con glucosa al 1 % como fuente de carbono, rojo fenol al 0.001 % como indicador para el cambio de coloración; el pH se ajusta a 7. Los cultivos se incubaron por 3 días a 28 °C y posteriormente se midió el pH mediante

técnica potenciométrica (Meter mod. PHM 61, Dinamarca).

Análisis Estadístico

Se analizó la distribución de probabilidad mediante prueba de t-Student para un 95 % de confianza ($p < 0.05$). Los datos obtenidos de factores físicos y concentración fúngica se analizaron mediante el empleo del coeficiente de correlación de Spearman (r_s). Para determinar la significación del efecto de las condiciones del muestreo se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación doble (ubicación en el depósito y fecha de muestreo) con el método de Rangos Múltiple por diferencias mínimas cuadradas (LSD) de Fisher.

Se observó que la temperatura de los lunes fue significativamente superior a la de los restantes días, lo que podría deberse a que el local permaneció cerrado los fines de semana. No obstante, los datos de los factores físicos presentaron una distribución normal ($p < 0.05$), cuyo resumen se muestra en la Tabla 2. En dicha tabla puede observarse que la humedad relativa osciló entre 73 y 92 %, rango que coincide con los encontrados en escuelas (Lignell et al., 2007), viviendas (Codina et al., 2008) y depósitos de documentos (Borrego & Perdomo, 2012). Es 70 % el valor que se

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comportamiento de los factores físicos en el depósito de alimentos

Valores	Temperatura (°C)		Humedad Relativa (%)	
	10.00 am	2.00 pm	10.00 am	2.00 pm
Promedio	30.7 ± 0.8	32.4 ± 0.7	86.0 ± 6.0	78.0 ± 5.0
Mínimo	29.3	31.7	80.0	73.0
Máximo	31.5	33.6	92.0	83.0

Tabla 2. Resumen de los factores físicos analizados durante tres días consecutivos en el depósito de alimentos que está ubicado al oeste de La Habana, Cuba.

Table 2. Summary of the physical factors analyzed during three serial days in a food depot in the west of Havana, Cuba

reporta como favorable para el crecimiento fúngico (Liao & Luo, 2005).

En relación a la ubicación dentro del depósito los resultados obtenidos para ambos factores físicos mostraron diferencias estadísticamente significativas lo que evidenció que el lado derecho del depósito, en la figura, es más húmedo (Figura 2 a y b). Esto podría explicarse por el hecho de que en ese lado se encuentran las neveras refrigeradas y por la ubicación geográfica del local que propicia un menor calentamiento del sol en esa área en las diferentes horas del día, considerando la posición y movimiento aparente del sol en el hemisferio norte, con mayor incidencia de los rayos solares

cuando alcanza la mayor altura entre las 10.00 am y las 2.00 pm (Sarmiento, 2013).

En la zona de las estibas ubicada próxima a las puertas, se obtuvo un valor estimado de velocidad promedio del viento de $0.55 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, valor que se encuentra dentro del rango (en abril: $0.82 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$; mayo: $0.49 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ y en junio: $1.05 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) reportado por Raisi *et al.* (2010). Sin embargo, este valor de velocidad del aire determinó 0.22 reposiciones. h^{-1} del volumen de aire en el depósito. Es decir, no es suficiente la ventilación natural de este local a través de las puertas, aspecto que puede incidir en los valores de concentración fúngica que se alcanzaron en el estudio.

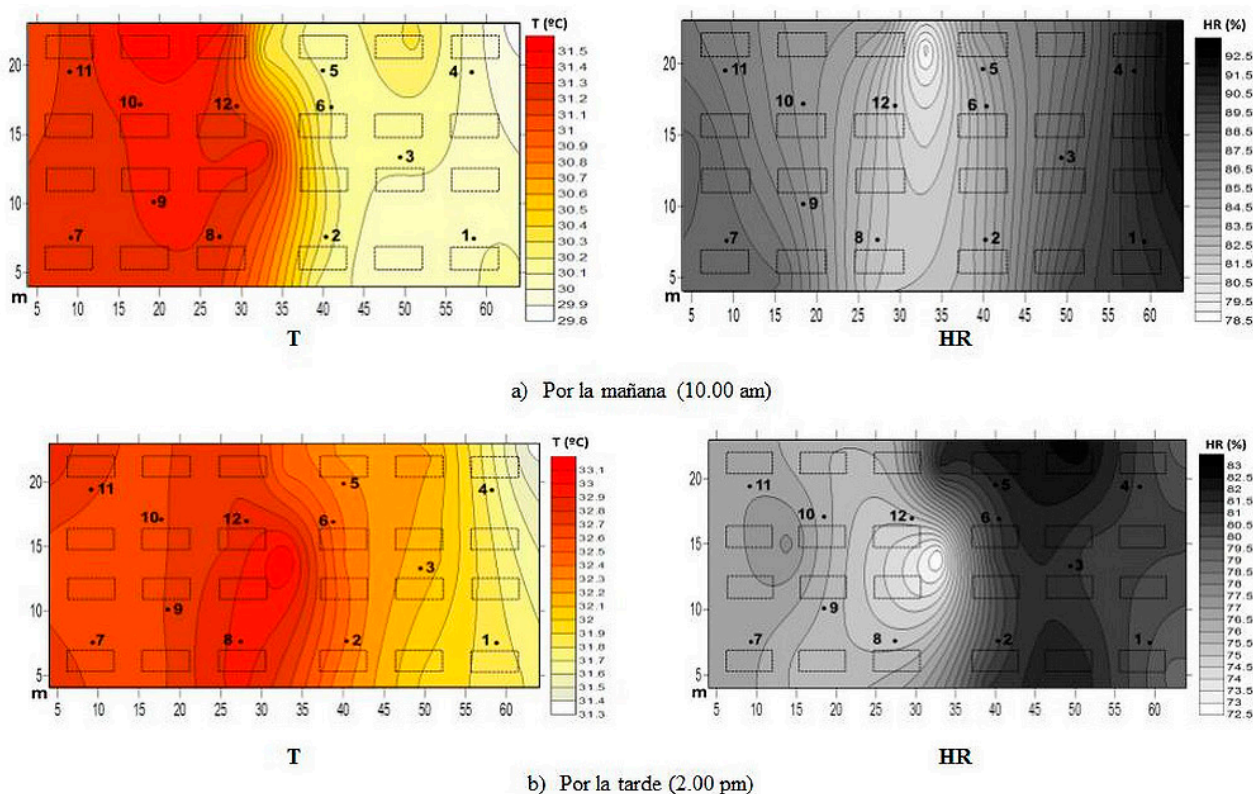


Figura 2. Mapa de contorno de la distribución de valores promedios de temperatura y humedad relativa durante tres días consecutivos en el depósito de alimentos estudiado. Las figuras muestran los 12 puntos de muestreo y los cuadrados de líneas discontinuas representan los envases de alimentos.

Figure 2. Contour map with the distribution of mean values of temperature and relative humidity during three serial days in the food depot studied. a) in the morning (10.00 am); b) in the afternoon (2.00 pm). The figures show the 12 sampling points and the squares with discontinuous lines represent the food containers

Niveles de contaminación microbiana ambiental y su distribución espacial

La Figura 3 muestra la concentración microbiana que se obtuvo en cada punto de muestreo. Se observa que las concentraciones oscilaron entre 144 y 760 UFC.m⁻³ de aire con valores promedios de 398 UFC.m⁻³ para el primer lunes y de 435 UFC.m⁻³ para el segundo. Por tanto, el depósito en esos días se encontraba poco contaminado a pesar de que los valores promedios de temperatura y humedad relativa estaban altos (31.1 °C y 80.0 %, respectivamente).

El muestreo de mayo mostró mayor variabilidad que el de junio (Figura 3). En este último no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los puntos del 1 al 3, 7 y 8 (Figura 3b). No obstante, los mayores valores se observaron del lado izquierdo del depósito en el primer muestreo (Fig. 3a) y del lado derecho en el segundo (Fig. 3b) independientemente del tipo de sustrato que se encontraba almacenado. Sin embargo, hubo excepciones para ambos casos en que se invirtió dicho comportamiento como se explica a continuación:

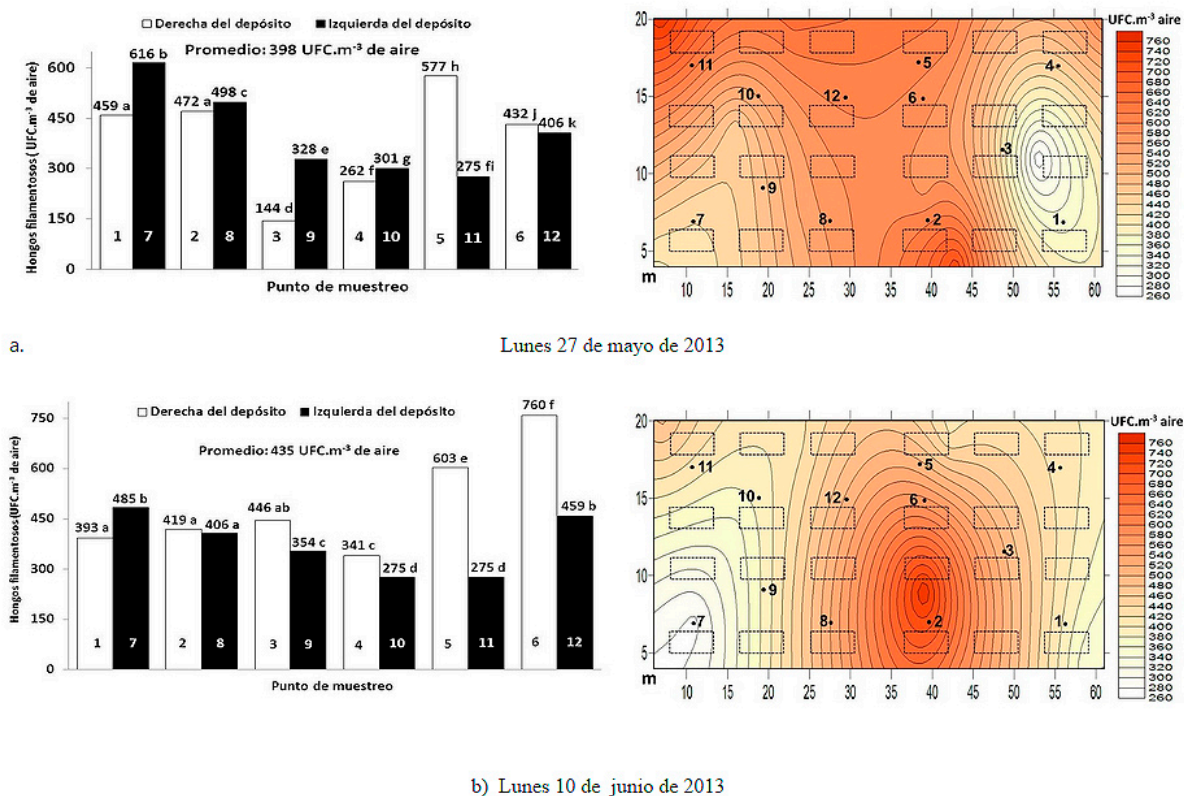


Figura 3. Conteo de hongos filamentosos dos lunes en periodo lluvioso en un depósito de alimentos ubicado al oeste de La Habana, Cuba (10.00 am). En las figuras de la izquierda las letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) y los números en el interior de las barras indican los puntos de muestreo que coinciden con los de las figuras de la derecha, donde los cuadrados de líneas discontinuas representan los envases de alimentos.

Figure 3. Count of filamentous fungi in two Mondays in the rainy period in a food depot in

the west of Havana, Cuba (10.00 am). a) 27 May 2013; b) 10 June 2013. The letters on the left figure indicate statistically significant difference ($p < 0.05$) and numbers inside the bars indicate the sampling points that coincide with those on the right figures where the squares with discontinuous lines squares represent the food containers

Para el primer muestreo (Figura 3a) en el punto 5 (almidón de maíz con 577 UFC.m^{-3}) se obtuvo una concentración fúngica superior al doble de la que se contabilizó en el punto 11 (envases de vidrio con 275 UFC.m^{-3}) y se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas. Esto puede explicarse por la diferencia de los sustratos que se almacenan, aunque en este caso los envases de vidrio acumulan gran cantidad de polvo sobre su superficie porque son materiales de lento movimiento. En el caso de los puntos 6 (pallets de madera con 432 UFC.m^{-3}) y 12 (envases de cartón con 406 UFC.m^{-3}) no se obtuvieron diferencias significativas.

Para el segundo muestreo (Figura 3b), entre los puntos 1 (proteína de soya, 393 UFC.m^{-3}) y 7 (malta tostada, 485 UFC.m^{-3}) no se observaron diferencias significativas, y esto pudo deberse a la preferencia de los microorganismos por los sustratos que se almacenan en el punto 1.

Al observar la Tabla 1 puede apreciarse que los materiales orgánicos presentes en el lado derecho del depósito (proteína, azúcar, almidón y madera) son más propensos a la contaminación y a la degradación fúngica que los materiales ubicados en el lado izquierdo (malta, grasa vegetal y cartón). Por tanto, el hecho de que en el muestreo de mayo el lado izquierdo estuviera más contaminado que el derecho puede justificarse porque en ese punto se encontraban productos de lento movimiento y al estar altos los valores de HR en esa mañana (horario del muestreo) se pudo haber favorecido la sedimentación de las partículas aerotransportables (Figura 2a).

La existencia de puertas en el centro del depósito provocó turbulencias del aire, pero el valor estimado de la velocidad promedio del aire estuvo dentro del rango reportado en un estudio similar en el que no se

encontró correlación con la concentración fúngica (Raisi et al., 2010). Nótese que el viento en esta área creó zonas de menor humedad relativa (Figura 2) que pudieran provocar una diferencia en la sedimentación de las partículas fúngicas sobre las placas Petri respecto al resto del depósito, pero no se evidenció este efecto tal vez debido a la escasa reposición del aire. Sin embargo, hubo coincidencia en el hecho de que la mayor contaminación se detectó en las estibas cercanas a las puertas, delimitada por el contorno de los puntos 2, 5, 6, 8 y 12. Estos puntos se corresponden con las cargas que poseen materiales orgánicos (azúcar, almidón, madera y cartón) lo que permite inferir que los hongos aislados deben poseer una alta capacidad para degradar la lignina y la celulosa, ya que este depósito está rodeado de vegetación abundante. Por tanto, cubrir los sacos de azúcar blanco con nylon (punto 3) resultó ser una medida adecuada que les confiere protección ya que disminuye la contaminación de 472 a 144 UFC.m^{-3} de aire respecto a los sacos de azúcar descubiertos (punto 2), respectivamente.

Se encontró que la concentración fúngica aumentó cuando se incrementó la humedad relativa ($r_s = 0.1094$) y disminuyó cuando aumentó la temperatura ($r_s = -0.1548$), pero no se obtuvo correlación lineal entre la concentración fúngica y los dos factores físicos analizados. Este resultado concuerda con lo reportado por Raisi et al. (2010).

Clasificación ecológica de los géneros fúngicos aislados y las actividades enzimáticas que determinan su poder biodeteriorante

Los cuatro géneros fúngicos aislados con mayor frecuencia relativa de aparición (FR) en los dos muestreos fueron: *Trichoderma*

y *Aspergillus* (FR de 58.3 y 41.7 %, respectivamente), los que, en función de esos valores son calificados como frecuentes ecológicamente. *Neurospora* (FR de 33.3 %) clasificó como un género ocasional en tanto *Penicillium* (FR de 8.3 %) se comportó como un género raro. La Tabla 3 muestra los resultados del análisis de la fisiología de las cepas fúngicas aisladas de los cuatro géneros de mayor FR, y se evidencia en general la alta actividad enzimática que poseen y que es indicativo de la capacidad biodeteriorante de los mismos.

Todos los hongos aislados degradaron el almidón y la gelatina, sin producción de pigmentos. Particularmente, debe destacarse la actividad celulolítica de los mismos siendo capaces de crecer en todas las formas celulósicas. En cuanto a la prueba de acidez, se obtuvieron valores de pH entre 5.0 y 6.4 por lo que no se consideraron como altos productores de ácido al compararlos con los hongos aislados del aire en otros depósitos que conservan también materiales orgánicos (Borrego et al., 2012).

Género fúngico	Número de cepa asignado - sustrato sobre el que se colocó la placa Petri	Actividad Celulolítica				Amilolítica Degradación de almidón	Proteolítica Degradación de gelatina	Producción de Ácidos pH
		Glucosa	Papel de filtro	Carboximetil-celulosa	Celulosa cristalina			
<i>Trichoderma</i> sp. (8 cepas)	1-Envases de cartón	++++	++	++	++	+	+	6.4
	2-Nylon p/azúcar	+++	+++	+++	+++	+	+	5.4
	3-Azúcar blanco	+++	+++	+++	++	+	+	5.8
	4-Almidón de maíz	+++	+++	++	++	+	+	5.2
	5-Almidón de maíz	+++	+++	+	++	+	+	5.3
	6-Proteína de soya	+++	++	+++	++	+	+	5.6
	7-Grasa vegetal	++	+	+	++	+	+	5.9
	8-Envases plásticos	++	+	+	+	+	+	5.1
<i>Aspergillus</i> sp. (7 cepas)	1-Envases plásticos	++++	++	++	++	+	+	5.9
	2-Azúcar blanco	+++	++	++	++	+	+	5.8
	3-Malta tostada	+++	++	++	+	+	+	5.3
	4-Malta tostada	+++	++	++	++	+	+	5.1
	5-Envases plásticos	+++	++	++	++	+	+	5.2
	6-Envase de cartón	+++	++	++	++	+	+	5.2
	7-Nylon p/azúcar	+++	+	++	++	+	+	5.3
<i>Neurospora</i> sp. (7 cepas)	1-Envases plásticos	+++	++	++	++	+	+	5.0
	2-Glutamato	++	+	+	±	+	+	6.0
	3-Proteína de soya	++	+	++	+	+	+	5.7
	4-Envases plásticos	++	±	++	++	+	+	5.0
<i>Penicillium</i> sp.	1-Proteína de soya	+++	+++	+++	++	+	+	5.1

++++: crecimiento muy abundante; +++: crecimiento abundante; ++: crecimiento moderado; +: crecimiento pobre sobre fuentes celulósicas, degradación positiva de gelatina y de almidón; ±: crecimiento muy pobre.

Tabla 3. Actividad enzimática de los géneros fúngicos que se aislaron del aire del depósito de alimentos estudiado.

Table 3. Enzymatic activity of fungal genera isolated from indoor air in the food depot studied

CONCLUSIONES

- Se determinó que este depósito de alimentos presenta poca contaminación fúngica a pesar de no estar climatizado evidenciando la importancia del cumplimiento de los requisitos normados para el almacenamiento y la rotación de los alimentos en su interior. La zona de mayor concentración fúngica fue donde se encontraban los materiales orgánicos (azúcar, almidón, madera y cartón) y se detectaron los mayores valores de humedad relativa del aire, por lo que resultó adecuado proteger los envases con cubiertas de nylon.
- Los géneros de mayor frecuencia relativa de aparición fueron: *Trichoderma* y *Aspergillus* (FR de 58.3 y 41.7 %, respectivamente) que se clasificaron como frecuentes ecológicamente, *Neurospora* (FR de 33.3 %) resultó ser un género ocasional y *Penicillium* (FR de 8.3 %) se comportó como un género raro.
- No se observaron daños en los envases, pero todas las cepas fúngicas que se aislaron poseen una alta capacidad para degradar celulosa, proteínas y almidón, lo cual resulta riesgoso para los alimentos conservados, haciendo que pierdan sus propiedades nutricionales y aportándoles micotoxinas dañinas al hombre.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asefa DT, Langsrud S & Gjerde RO. 2009. The performance of SAS. super-180 air sampled and settle plates for assessing viable fungal particles in the air of dry-cured meat production facility. *Food Control*, 20: 997-1001
- Awad AH & Mawla HA. 2012. Sedimentation with the Omeliansky formula as an accepted technique for quantifying airborne fungi. *Polish Journal of Environmental Sciences*, 21(6): 1539-1541
- Barnett HL & Hunter BB. 2003. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th edition. Burgess Publishing Company Minneapolis 15, Minneapolis: 218 p
- Bogomolova EV & Kirtsideli I. 2009. Airborne fungi in four stations of the St. Petersburg underground railway system. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63: 156-160
- Booth C. 1971. Introduction to general methods. P 49-94. En: Booth C (ed.) *Methods in Microbiology*. Vol. 4. Academic Press, London and New York
- 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, 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 and Biodegradation*, 64: 139-145
- Borrego SF, Lavin P, Perdomo I, Gómez de Saravia S & Guiamet P. 2012. Determination of indoor air quality in archives and the biodeterioration of the documentary heritage. *ISRN Microbiology*: 10 p, Article ID 680598, doi:10.5402/2012/680598
- Borrego SF & Perdomo I. 2012. Aerobiological investigations inside repositories of the National Archive of the Republic of Cuba. *Aerobiología*, 28: 303-316
- Casadesús L & Rojas TI. 1981. *Micología*. Manual Práctico. Editorial MES, La Habana, Cuba: 125 p
- Codina R, Fox RW, Lockey RF, de Marco P & Bagg A. 2008. Typical levels of airborne fungal spores in houses without obvious moisture problems during a rainy season in Florida, US. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 18: 156-162
- Esquivel PP, Mangiaterra M, Giusuiano G & Sosa MA. 2003. Microhongos anemófilos en ambientes abiertos de dos ciudades del nordeste argentino. *Boletín Micológico*, Chile, 18: 21-28
- FEDECAI-01. 2007. *Programa de certificación de calidad ambiental en interiores. Calidad ambiental en interiores: Criterios de muestreo*. Federación Española de Empresas de Calidad Ambiental Interior. Madrid, España: 14 p

- 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
- Górný RL. 2004. Filamentous microorganisms and their fragments in indoor air. A review. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 11: 185 -197
- Liao CM & Luo WC. 2005. Use of temporal/seasonal- and size-dependent bioaerosol data to characterize the contribution of outdoor fungi to residential exposures. *Science of the Total Environment*, 347: 78-97
- Lignell U, Meklin T, Putus T, Rintala H, Vepsäläinen A, Kalliokoski P & Nevalainen A. 2007. Effects of moisture damage and renovation on microbial conditions and pupils' health in two schools - a longitudinal analysis of five years. *Journal of Environmental Monitoring*, 9: 225-233
- Orio J. 2008. Construyamos un anemómetro manual. Disponible en: <http://www.tiempo.com/ram/3304/construyamos-un-anemmetro-manual/>
- Pasquarella C, Sacconi E, Sansebastiano GE, Ugolotti M, Pasquariello G, Albertini R. 2012. Proposal for a biological environmental monitoring approach to be used in libraries and archives. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19: 209-212
- Pasquarella C, Giuliano ES, Sacconi E, Ugolotti M, Mariotti F, Boccuni C, Signorelli C, Schianchi LF, Alessandrini C & Albertini R. 2011. Proposal for an integrated approach to microbial environmental monitoring in cultural heritage: experience at the at the Correggio exhibition in Parma. *Aerobiologia*, 27: 203-211
- Pasquarella C, Pitzurra O & Savino A. 2000. The index of microbial air contamination. *Journal of Hospital Infection*, 46: 241-256
- Raisi L, Lazaridis M & Katsivela E. 2010. Relationship between airborne microbial and particulate matter concentrations in the ambient air at a Mediterranean site. *Global NEST Journal*, 12: 84-91
- Rodríguez S, Sauri MR, Peniche I, Pacheco J & Ramírez JM. 2005. Aerotransportables viables en el área de tratamiento y disposición final de residuos sólidos municipales de Mérida, Yucatán. *Ingeniería*, México, 9 (3): 19-29
- Rojas TI, Martínez E, Aira MJ & Almaguer M. 2008. Aeromicota de ambientes internos: comparación de métodos de muestreo. *Boletín Micológico*, Chile, 23: 67-73
- Sarmiento A. 2013. Movimiento del sol. Distribución de la energía solar. P 19-25 En: *Energía solar fotovoltaica. Temas seleccionados*. Ed. Academia, Cuba: 102 p
- Wong E. 2008. Metodología para realizar estudios de evidencia microbiológica en plantas procesadoras de alimentos. *Agronomía Mesoamericana*, 19: 131-137

- Wijnand E. 2009. Fungal spores: A critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting. *Critical Reviews in Toxicology*, 39(10): 799–864
- Yu H, Hou CH & Liao CM. 2002. Scale model analysis of opening effectiveness for wind-induced natural ventilation openings. *Biosystems Engineering*, 82:199– 207