

## **Aislamiento y caracterización de la microbiota responsable del biodeterioro de tejas de cemento para tejados de viviendas en zonas tropicales de Latinoamérica**

N. M. ROJAS HERNÁNDEZ , T. ROJAS FLORES, A.G. GUERRA MÁLVAREZ & R. HERRERA MASPOCH

*Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de La Habana  
Calle 25, nº 455, entre J e I, Vedado, Plaza. La Habana. Cuba*

*(Recibido, junio de 2000. Aceptado, octubre de 2000)*

### **Resumen**

ROJAS HERNÁNDEZ, N.M., ROJAS FLORES, T., GUERRA MALVÁREZ, A.G. & HERRERA MASPOCH, R. (2001). Aislamiento y caracterización de la microbiota responsable del biodeterioro de tejas de cemento para tejados de viviendas en zonas tropicales de Latinoamérica. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, **11**:

Se realizó un estudio de la microbiota presente en tejas de cemento las que presentaban signos evidentes de biodeterioro y que fueron usadas en tejados de viviendas ubicadas en zonas tropicales de Latinoamérica. Se aislaron e identificaron 16 cepas de bacterias y 12 de hongos entre los cuales se encontraron especies de los géneros bacterianos *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Micrococcus*, así como hongos pertenecientes a *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Monilia*, *Aureobasidium* y *Tritirachium*. Se encontró un predominio de cepas bacterianas respecto a los hongos presentes (85,5% de las primeras respecto a 14,5% de hongos) y el género *Bacillus* significó el 56,2% del total de bacterias aisladas.

**Palabras clave:** Biodeterioro, contaminación microbiana, viviendas, America Latina.

### **Abstract**

ROJAS HERNÁNDEZ, N.M., ROJAS FLORES, T., GUERRA MALVÁREZ, A.G. & HERRERA MASPOCH, R. (2001). Isolation and characterization of microorganism involved to cement's lime roofs biodeterioration in Latin American tropical zone buildings. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, **11**:

The study of microbial strains presents in cement's lime roofs with deterioration signs used in houses from different Latin American regions was made. Sixteen bacterial strains from the genera *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Micrococcus*, and twelve fungal strains from genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Monilia*, *Aureobasidium* and *Tritirachium* were isolated and characterized. The number of bacteria was higher than the fungi, (85,5% vs 14,5%). *Bacillus* species was the 56,2% of the total bacteria isolated.

**Key words:** Biodeterioration, microbial pollution, buildings.

### **INTRODUCCIÓN**

Los microorganismos son importantes agentes del biodeterioro, ya que su diversidad

metabólica les confiere la capacidad para ocasionar gran parte del deterioro de los materiales más variados (FLORES *et al.*, 1997). Líquenes, bacterias y hongos son los más implicados en el

deterioro de edificaciones, pinturas murales y construcciones en general (ROELLEKE *et al.*, 1996; ARINO *et al.*, 1997; SAÍZ, 1997).

Hasta hace algunos años, sólo los objetos de museos, las obras de arte o las construcciones con valor histórico eran objeto de control y estudio microbiológico para su conservación (MÉNDEZ *et al.*, 1995; AMMAR & EL-DEEB ASMAA, 1996); sin embargo, ya se ha asimilado que el conocimiento de los microorganismos presentes como contaminantes de estos objetos y construcciones, así como el de sus posibilidades y características para sobrevivir y nutrirse a partir de los sustratos más diversos es primordial para combatir y prevenir ese deterioro.

Por otra parte, la población mundial sigue creciendo, y la problemática de la vivienda sigue teniendo vigencia en muchos países, sobre todo en los que están en vías de desarrollo. Los materiales de bajo coste para la construcción de viviendas constituyen una solución inmediata para las grandes masas, y en especial en Latino América; sin embargo, aún las edificaciones y viviendas más recientemente construidas, pueden ser objeto de deterioro químico o microbiano.

En este trabajo, se estudia la microbiota (bacteriana y fúngica) presente como contaminante en tejas deterioradas fabricadas con cemento, arena y tierra arcillosa, las cuales fueron empleadas como tejados de casas construidas en zonas tropicales de gran humedad y altas temperaturas, con la finalidad de conocer los géneros y especies más abundantes en las mismas y que pueden ser responsables de su biodeterioro.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo se emplearon fragmentos de tejas elaboradas con cemento, arena y tierra arcillosa utilizadas como tejados en viviendas procedentes de Honduras (2 muestras), Nicaragua (dos muestras) y Guatemala (una muestra). Estas tejas se retiraron por su mal estado después de su empleo durante un tiempo aproximado de dos años; se encontraban fragmentadas, porosas

y por lo tanto permeables y mostraban manchas oscuras en su superficie y en los lados transversales o se encontraban separadas en lascas o capas longitudinales fácilmente observables.

Para el aislamiento de los microorganismos presentes, se tomaron fragmentos de 25-30 g de cada teja y la parte exterior de cada una se impregnó con etanol y se flameó para eliminar los microorganismos contaminantes de la superficie. Posteriormente, porciones de cada muestra se introdujeron en un mortero de metal estéril en el cual se trituraron asépticamente hasta obtener un polvo fino. Cantidades de 5 g aproximadamente del triturado así obtenido de cada muestra se introdujo en tubos que contenían 20 ml de solución salina fisiológica estéril con un 0,1% de Tween 80, trabajando con dos réplicas por muestra. Los tubos se colocaron en un agitador mecánico durante 5 minutos y posteriormente se dejaron reposar durante una hora. Al cabo de este tiempo, se tomaron muestras de 0,1 ml del sobrenadante que se inocularon en la superficie de placas con Triptona Soja Agar (TSA), Extracto de Malta Agar, y Sabouraud Glucosa Agar. La incubación se efectuó a 36 °C durante 24 h en el medio para bacterias y a 25 °C durante 48 h para las placas para crecimiento fúngico.

De cada colonia así obtenida se realizó la descripción en los medios de procedencia y, posteriormente, con cada colonia bacteriana se realizó una tinción de Gram para clasificarlas y verificar su pureza antes de resembrarlas en tubos con medio agar nutritivo para, a continuación, proceder a su identificación siguiendo la metodología descrita en el MANUAL DE BERGEY (1994). Las colonias fúngicas se describieron morfológicamente y con ellas se realizaron preparaciones en fresco, las cuales se observaron al microscopio óptico. Posteriormente, se resembraron en tubos con medio Extracto de malta Agar.

Para identificar los cultivos bacterianos se utilizaron criterios morfológicos, de tinción, de cultivo y fisiológico-bioquímicos. Se consideró que aquellas colonias con características similares en el mismo medio de cultivo procedentes de

una misma muestra y con igual morfología microscópica y respuesta al Gram, pertenecían a la misma cepa.

Una vez clasificadas por su respuesta al Gram, se realizaron las pruebas para conocer el tipo de metabolismo (oxidativo o fermentativo), catalasa, oxidasa, hidrólisis de gelatina y almidón, empleo de citrato como única fuente de carbono, producción de indol, producción de acetil- metil carbinol (Voges -Proskauer), rojo de metilo, reducción de nitratos, hidrólisis de caseína, crecimiento en medio agar nutriente con NaCl al 5 y al 7%, hidrólisis de arginina y esculina, características en medio agar-hierro de Kligler, producción de pigmentos fenacínicos y fluorescentes (King A y King B). Estas pruebas se realizaron en función de los géneros a los que pertenecían las cepas bajo estudio.

Para los hongos aislados, la clasificación se realizó de acuerdo a las características de cultivo y morfológicas, atendiendo a las observaciones realizadas en lactofenol y en los microcultivos y posteriormente según los manuales de GILMAN, (1963), RAPER & FENNELL (1965), BARNETT & HUNTEN, (1972) y las claves de HOOG Y GUARRO (1995). En las cepas pertenecientes al género *Aspergillus*, se siguió la metodología descrita por KLICK & PITT (1988).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron un total de 231 colonias de bacterias y 39 de hongos. Una vez estudiadas y analizadas las características de las bacterias, de acuerdo al color, superficie, bordes, tamaño y elevación de las colonias, estas correspondían a 16 cepas diferentes; su respuesta a la tinción de Gram, permitió clasificarlas en 11 Gram positivas y 7 Gram negativas.

Entre las primeras, las cepas 1,5,6,7,10, 11,12,13 y 14 eran bacilos esporógenos pertenecientes al género *Bacillus*; las cepas 3 y 5 son cocos agrupados en tétradas del género *Micrococcus*.

Las cepas 2, 4, 8, 9 y 16, eran bacilos Gram negativos no formadores de esporas, de extre-

mos redondeados, aislados, catalasa y oxidasa positivos, de metabolismo oxidativo y pertenecientes al género *Pseudomonas*.

Como se puede apreciar en la Tabla I, de los 16 cultivos con características similares aislados, 9 pertenecen al género *Bacillus*, lo cual corresponde al 56,2% del total de colonias aisladas, coincidiendo con las características de 7 especies diferentes del mismo. Como las cepas 6, 7 y 14 crecieron en placas inoculadas con distintas muestras, se consideraron cepas diferentes aunque pertenecen a la misma especie.

TABLA I. Cepas pertenecientes al género *Bacillus* y su frecuencia porcentual de aislamiento respecto al total de bacterias aisladas

| Cepa      | Frecuencia | Identificación                     |
|-----------|------------|------------------------------------|
| 1         | 13,8       | <i>Bacillus thurigiensis</i>       |
| 5         | 10,8       | <i>Bacillus brevis</i>             |
| 6, 7 y 14 | 20,7       | <i>Bacillus megaterium</i>         |
| 10        | 6,9        | <i>Bacillus sphaericus</i>         |
| 11        | 2,2        | <i>Bacillus lentus</i>             |
| 12        | 8,6        | <i>Bacillus stearothermophilus</i> |
| 13        | 3,9        | <i>Bacillus circulans</i>          |
| Total     | 66,9       |                                    |

El género *Bacillus* está ampliamente representado en la naturaleza, distribuyéndose en suelos, agua, polvo, etc. Esta diseminación puede estar ocasionada por las endosporas las cuales constituyen formas altamente resistentes, lo cual explica la elevada frecuencia con la que se aíslan especies de este género como contaminantes ambientales en los hábitats más diversos dada la facilidad de su diseminación al ser arrastradas por las lluvias y vientos. (BALUARTE, 1998).

Las cepas bacterianas que resultaron bacilos Gram negativos no fermentadores y oxidasa positivos pertenecientes al género *Pseudomonas* y su frecuencia relativa de aislamiento se indican en la Tabla II. Aunque entre las 5 especies de este género no se encuentra la más estudiada y conocida de ellas (*Pseudomonas aeruginosa*), la cual se caracteriza por la gran cantidad de enzimas extracelulares que produce y por su resistencia frente a agentes químicos y terapéuticos, algunas

de estas características (si bien no en tan alto grado) también son exhibidas por otras especies del mismo género, lo cual explica su presencia en las tejas (TORTORA *et al.*, 1995).

TABLA II. Cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* y su frecuencia porcentual de aislamiento respecto al total de bacterias aisladas

| Cepa  | Frecuencia | Identificación                       |
|-------|------------|--------------------------------------|
| 2     | 1,3        | <i>Pseudomonas syringae</i>          |
| 4     | 5,1        | <i>Pseudomonas putida</i>            |
| 8     | 6,5        | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> |
| 9     | 0,8        | <i>Pseudomonas pseudomallei</i>      |
| 16    | 1,3        | <i>Pseudomonas maltophilia</i>       |
| Total | 15,0       |                                      |

Las dos cepas pertenecientes al género *Micrococcus* y su frecuencia, se presentan en la Tabla III. La característica de algunas especies de este género, que habitan como saprofitos en suelos, aire, aguas negras y hasta aguas marinas, junto a su capacidad para producir pigmentos está relacionada con su hallazgo en objetos de arte, papeles, cuadros, etc. (CHARLES & PRINCE, 1996).

TABLA III. Cepas pertenecientes al género *Micrococcus* y su frecuencia porcentual de aislamiento respecto al total de bacterias aisladas

| Cepa  | Frecuencia | Identificación                 |
|-------|------------|--------------------------------|
| 3     | 10,8       | <i>Micrococcus sedentarius</i> |
| 15    | 6,9        | <i>Micrococcus varians</i>     |
| Total | 17,7       |                                |

Como se observa en la Tabla IV, de los 12 tipos de colonias de hongos aisladas a partir del material en estudio, el género *Penicillium* está representado en un 12,8% al pertenecer a él las cepas 2 y 10. Otro género fúngico con alta incidencia fue *Aspergillus*, ya que las cepas 5, 6 y 11 pertenecen a este género, aunque de tres especies diferentes. A él correspondió el 53,8%

del total de colonias aisladas. Las restantes colonias corresponden a géneros diferentes, con un número variable entre una y tres para cada caso.

TABLA IV. Identificación de las cepas de hongos y su frecuencia porcentual de aislamiento respecto al total de colonias fúngicas aisladas

| Cepa | Frecuencia | Identificación                     |
|------|------------|------------------------------------|
| 1    | 5,1        | <i>Curvularia lunata</i>           |
| 2    | 5,1        | <i>Penicillium</i> sp.             |
| 3    | 2,5        | <i>Syncephalastrum racemosum</i>   |
| 4    | 5,1        | <i>Tritirachium album</i>          |
| 5    | 20,5       | <i>Aspergillus fumigatus</i> Fres  |
| 6    | 17,9       | <i>Aspergillus flavus</i> Link     |
| 7    | 7,7        | <i>Aureobasidium pullulans</i>     |
| 8    | 5,1        | <i>Cladosporium cladosporoides</i> |
| 9    | 5,1        | <i>Fusarium</i> sp                 |
| 10   | 7,7        | <i>Penicillium</i> sp              |
| 11   | 12,8       | <i>Aspergillus tamarisii</i>       |
| 12   | 5,1        | <i>Monilia sitophila</i>           |

En cuanto a la mayor frecuencia de contaminantes bacterianos en las tejas respecto a la presencia de hongos en las muestras deterioradas (85,5% de los primeros respecto a 14,5% de los segundos); ello puede deberse a la amplia diversidad metabólica y de adaptación a condiciones extremadamente difíciles de las bacterias, las cuales aprovechan las fisuras ocasionadas por el ataque fúngico para penetrar en el material y vivir a expensas de minúsculas cantidades de materia orgánica e inorgánica allí presente (MURRAY *et al.*, 1997).

Como las tejas recién elaboradas tienen un pH altamente alcalino (13 aproximadamente), se midió el pH del sobrenadante después de preparar la suspensión a partir de las tejas trituradas; éste osciló entre 7,2 y 7,8. Indiscutiblemente, la lixiviación natural a la que están sometidas las tejas por las abundantes lluvias es la responsable de la disminución de su alcalinidad, posibilitando el establecimiento de los microorganismos a medida que el pH del material se acerca más a la neutralidad.

Debido al pequeño número de muestras de tejas examinadas, no se establece una relación

entre la procedencia de la teja y los microorganismos aislados a partir de ellas.

Las viviendas de bajo costo son una solución factible para las clases más humildes del mundo, pero en países cuyas condiciones climáticas lo favorecen, la contaminación química, los factores físicos y los microorganismos pueden dañar rápidamente la estructura de estas edificaciones si no se elaboran con materiales más resistentes o si no se protegen con alguna capa de pintura con protección antimicrobiana.

No existen datos anteriores publicados acerca del estudio de la presencia microbiana y su papel en el deterioro de este tipo de material, por lo que entendemos que este trabajo inicia un campo de investigación por realizar.

También es razonable pensar que el biodeterioro observado en tejas de material tan agreste como es la mezcla de cemento, arena y tierra arcillosa con la cual éstas están preparadas, esté precedido por la formación de una biocapa externa, compuesta por materia orgánica, otros contaminantes ambientales y microorganismos, como se ha planteado anteriormente (GAYLARDE & MORTON, 1998). Esta biocapa posibilita que posteriormente se favorezca un ataque más profundo debido al efecto sinérgico de ambos tipos de microorganismos, utilizando el complejo arsenal de metabolitos secundarios producidos por hongos y bacterias, lo cual ocasiona la ruptura de la integridad de la teja y, una vez corroída, la materia orgánica presente en las aguas de las lluvias y los contaminantes presentes en el polvo y traídos por el viento, penetran en las escoriaciones y permiten no sólo la supervivencia, sino además el crecimiento de los microorganismos en su interior.

## CONCLUSIONES

Se aislaron bacterias y hongos en el interior de tejas con signos de deterioro. Esta microbiota fue mayoritariamente bacteriana (85,5%) respecto a los hongos aislados (14,5%) y entre las bacterias predominaron las especies de *Bacillus*, (56,2%) seguidas de los géneros *Pseudomonas*

(31,2%) y *Micrococcus* (12,6%). En cuanto a los hongos presentes, los géneros más representados fueron *Aspergillus* (53,8%) y *Penicillium* (12,8%), mientras el resto de las cepas pertenecían a los géneros: *Cladosporium*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Monilia*, *Aureobasidium* y *Tritirachium*.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a los Doctores Enrique A. González y Buenaventura Cabezas, del Departamento de Microbiología, por su ayuda en la revisión de este trabajo, y a la Dra. Ma. Celia Besteiro por su cooperación en el mismo, todos profesores de la Facultad de Veterinaria, Campus de Lugo, de la Universidad de Santiago de Compostela.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARINO, X., GÓMEZ, A., SAÍZ, C. (1997). Lichens on ancient mortars. *International Biodet. and Biodeg.*, **40** (2-4): 217-224.
- AMMAR, M.S. & EL-DEEB ASMAA, A. (1996). In situ: Validity of the newly D-PI suggested formulation application for the absolute inhibition of microbial growth inside Tutankhamen Tomb (TAT) for at least three years of treatment. *Egyptian Journal of Microbiol.*, **31**(3): 405-421.
- BALUARTE, R.G. (1998). Estudio de la microbiota contaminante en derrumbes prehistóricos aztecas. *Revista de la UNAM*. México, UNESCO.
- BARNETT H.L. & HUNTEN, B.B. (1972) *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 3rd. Edition. Burgess Publishing Co., Minneapolis.
- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY (1994). 9<sup>th</sup> Ed. Holt *et al.* Eds., Baltimore, Williams & Wilkins.
- CHARLES, P.R. & PRINCE, D. (1996). Microbiota contaminante en obras de arte de alto valor. *I Reunión de Conservadores Latinoamericanos*. Argentina.
- FLORES, M., MORRILLO, M. & CRESPO, M.L. (1997). Deterioration of raw materials and cosmetic products by preservative resistant microorganisms. *International Biodet. and Biodeg.*, **40**(2-4):157-160.

- GAYLARDE, C.C. & MORTON, L.H. (1998). The importance of biofilms in microbial deterioration of construction materials. *Rev. Microb.*, **28**(4): 221-229.
- GILMAN, J.C. (1963). *A Manual of Soil Fungi*. 1ra edición. Compañía Editorial Continental S.A.
- HOOG, S. & GUARRO, T. (1995). *Claves de identificación de Hongos*. Facultad de Biología, Universidad de la Habana.
- KLICK, A.M. & PITT, J. (1988). *A Laboratory Guide to the common Aspergillus species and their teleomorphus*. Springer Verlag, New York.
- MÉNDEZ TOVAR, L.JL, MAINOU, L.M., PIZARRO, S.A., FORTOUL VANDERGOES, T. & LÓPEZ MARTÍNEZ, R. (1995) Fungal deterioration of colonial façades in Mexico city. *Rev. Mex. de Micología*, **11**(0): 133-144.
- MURRAY, P.R., KOBAYASHI, G.S., PFALLEN, M.A. & ROSENTHAL, K.S.(1997). *Microbiología Médica*. Harcourt Brace Publishers International, Division Iberoamericana.
- RAPER, K.B. & FENNEL, I.D. (1965). *The genus Aspergillus*. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- ROELLEKER, S., MUYZER, G., WAWER, C., WANNER, G. & LUBITZ, W. (1996). Identification of bacteria in a biodegraded wall painting by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR- amplified gene fragments coding for 16s rRNA. *Applied Environm. Microbiol.*, **62**(6): 2059-2065.
- SAÍZ, C. (1997). Biodeterioration and biodegradation: The role of microorganisms in the removal of pollutants deposited on historical buildings. *International Biodet. and Biodeg.*, **40**(2-4): 225-232.
- TORTORA, G.J., FUNKE, B.R. & CASE, C.L. (1995). *Microbiology, An Introduction*. The Benjamin Cummings Publishers Company Inc.