

INFORME

"Estudio de las alteraciones cromáticas en las superficies externas de la planta de la empresa Silvalac (Grupo Armando Álvarez) (Ctra. Santes Creus, S/N. 43151, Els Pallaresos, Tarragona)"





Campus Sescelades 05/05/2017 Centre Tecnològic de la química de Catalunya

Marcel·lí Domingo, (edifici N5) 43007 Tarragona

Tel.: +34 977 256 182



1. Objetivo general:

Determinar la naturaleza de las alteraciones cromáticas aparecidas sobre las superficies externas de la planta de la empresa Silvalac (Grupo Armando Álvarez) ubicada en la población de Els Pallaresos, provincia de Tarragona.

2. Hipótesis de trabajo:

La hipótesis de trabajo, es la de considerar que las alteraciones cromáticas detectadas en las superficies externas de planta de la empresa Silvalac (Grupo Armando Álvarez) ubicada en la población de Els Pallaresos (Tarragona), son de origen biológico y concretamente debidas al desarrollo de colonias-consorcios fúngicos.

La presente hipótesis se fundamenta en las siguientes observaciones:

- Las alteraciones cromáticas se localizan preferentemente en la vertiente con una menor irradiación solar (orientación norte, umbría), caracterizada por:
 - a. Temperatura inferior a la de la cara sur con mayor incidencia solar
 - b. Menor incidencia de radiación ultravioleta. Efecto biocida sobre los microorganismos
 - c. Elevado grado de humedad. Favorable para el desarrollo de microorganismos, preferentemente hongos
- 2) Ausencia de alteraciones cromáticas en las zonas superiores de los focos instalados la vertiente norte de la fachada. Estas zonas registran elevadas temperaturas, las cuales serían sub-óptimas para el desarrollo de colonias fúngicas. En las zonas inferiores de los mismos, menor temperatura, se detecta elevado crecimiento fúngico.
- 3) Ausencia de alteraciones cromáticas en todas las estructuras tratadas con zinc (vallas galvanizadas) y presencia de alteraciones en las superficies circundantes, no tratadas. El zinc, junto con el cobre, son metales a los cuales los hongos son muy sensibles y que les impiden el crecimiento.
- 4) Diferencias en el nivel de afectación de las superficies en función de la variación estacional: se detecta una mayor afectación en épocas del año caracterizadas por elevado grado de humedad y temperaturas óptimas para el desarrollo de microorganismos.





3. Metodología de estudio:

1.-Evaluación preliminar

La evaluación preliminar se realizó el día 26-01-2017, y los resultados obtenidos indican la presencia de diferentes poblaciones de bacterias y hongos, así como de partículas de polen, probablemente de pino.

2.- Visita a la planta y documentación de las alteraciones

Las diferentes áreas afectadas, y a partir de las cuales serían obtenidas las respectivas muestras a estudiar fueron fotografiadas mediante una cámara digital Canon 500.

3.- Toma y transporte de muestras

Se realizó muestreo representativo el día 9 de marzo del 2017 de las superficies afectadas (tejido de alambre y postes recubiertos de pintura, paredes oscurecidas y suelos con detritus negruzcos) mediante el empleo de hisopos estériles humectados con solución fisiológica estéril en tubos tipo Stuart, y de la colecta de partículas sólidas mediante el empleo de un bisturí estéril, colocando la muestra recogida dentro de contenedores apropiados. El número total de muestras ha sido de diez. Las muestras fueron transportadas al laboratorio de la Unidad de Micología y Microbiología Ambiental de la Facultad de Medicina de Reus (URV) en contenedores isotérmicos, y procesadas de manera inmediata.

4.- Estudio de las muestras mediante microscopía de campo claro

Las muestras fueron suspendidas en 1 mL de solución fisiológica estéril dentro de tubos de ensayo, y se homogenizaron mediante agitación con vórtex. Una alícuota de la suspensión fue montada entre porta y cubreobjetos, y las preparaciones fueron observadas con un microscopio de campo claro Olympus BH1. También las suspensiones fueron mezcladas en partes iguales (1:1) con ácido láctico (líquido de montaje, en lugar de la solución fisiológica).

5.- Siembra de las muestras en diferentes medios de cultivo para la recuperación de los microorganismos detectados en la tarea 4, incubación de las mismas y aislamiento en cultivo puro

Los hongos fueron aislados mediante la siembra (por duplicado) de una alícuota de la suspensión sobre la superficie de placas de Petri de 10 cm de diámetro





conteniendo los medios de cultivo agar patata dextrosa (PDA) y agar patata-zanahoria (PCA) adicionados con el antibiótico L-cloranfenicol para impedir el crecimiento de bacterias. La técnica de siembra utilizada para la obtención de colonias aisladas fue la del agotamiento de asa. Las placas fueron incubadas a 15 y a 25ºC por una-dos semanas, hasta la formación de colonias que permitieran su subcultivo y una identificación fenotípica presuntiva preliminar. A partir de colonias representativas, con tipos morfológicos diferentes, se realizó el aislamiento en cultivo puro en las mismas condiciones que las ya citadas, pero en placas de Petri de 5 cm de diámetro conteniendo el medio de cultivo del aislamiento primario. La pureza de las cepas fue comprobada mediante técnicas microscópicas, y cada una de ellas fue transferida a tres tubos con el medio de cultivo inclinado en "slant". Una vez crecidas en las condiciones previamente descritas, las cepas fueron almacenadas en nuestra colección de cultivos microbianos para su identificación definitiva.

6.- Identificación presuntiva de los hongos mediante caracterización fenotípica

Se realizó la caracterización morfológica de las colonias (sembradas en diversos medios de cultivo) y de las estructuras vegetativas y reproductivas de las cepas fúngicas representativas. Para realizar la identificación presuntiva, se consultó una amplia bibliografía de referencia.

7.- Identificación molecular de los microorganismos: extracción de ADN, reacción de PCR, obtención y purificación de los amplicones y secuenciación de diferentes regiones genómicas.

Una cepa de cada tipo morfológico diferente y representativo (N = 25) fue aislada en cultivo puro para su identificación definitiva posterior, basada en el análisis de las secuencias nucleotídicas de diferentes marcadores moleculares y los caracteres fenotípicos de las mismas. A partir de los cultivos puros, se realizó la extracción del ADN total mediante el protocolo *FastDNA-prep*. A partir de este ADN, se procedió a la amplificación mediante PCR de dos fragmentos de los genes ribosomales fúngicos, concretamente el espaciador intergénico (ITS) y una porción de unos 700 pb del gen 28S del ARNr. De los productos de estos fragmentos, se secuenció la región ITS de todas las cepas y de las que se consideró preciso, también se secuenció los dominios D1-D3 del gen 28S del ARNr en Macrogen-Europa (Holanda).

8.- Identificación definitiva, en base a estudios polifásicos (caracterización fenotípica y análisis de las secuencias nucleotídicas), de los microorganismos presuntamente responsables de las alteraciones cromáticas





Las secuencias nucleotídicas de la región ITS de cada uno de los aislados fúngicos estudiados (N = 25) fueron comparadas con las existentes en la base de datos *GenBank* mediante el algoritmo BLASTn, en vistas a su identificación molecular. Valores de similitud, entre las secuencias comparadas, iguales o mayores al 98% (y una cobertura superior al 90% de la longitud del amplicón) serán consideradas cómo pertenecientes a una misma especie.



4. Resultados:

A.- Muestras recolectadas e identificación fenotípica presuntiva de los hongos recuperados <u>in vitro</u>

<u>Muestra 1.</u> La localización de la misma, es una pared de la nave ubicada debajo de un tubo acodado de PVC en la zona umbría de la planta.



Figura 1. Imagen de la pared debajo de tubo acodado de PVC (parte umbría) [= muestra 1], y el crecimiento resultante de la siembra del material recolectado en una placa de Petri conteniendo medio de cultivo PDA.

Las colonias más grandes que se observan en la Figura 1 fueron identificadas presuntivamente como pertenecientes al género *Phoma*. Las colonias más pequeñas correspondieron a los hongos conocidos como "levaduras negras", y presentaron dos morfologías diferentes. También hubo el desarrollo de una colonia de color rosada, compatible con una levadura basidiomicete.



<u>Muestra 2.</u> Tal y como se observa en la figura 2, esta muestra no se colectó en las paredes de la planta, si no en el detritus depositado sobre el asfalto.



Figura 2. Imagen del detritus oscuro acumulado en gran cantidad sobre el asfalto (parte umbría) [= muestra 2], y el crecimiento resultante de la siembra del material recolectado en una placa de Petri conteniendo medio de cultivo PDA.

Las dos colonias negras pulverulentas que se observan en la Figura 2 (en los márgenes derecho e izquierdo casi a nivel ecuatorial) fueron identificadas presuntivamente como *Aspergillus niger*, y la colonia gris-azulada (zona central) como *Penicillium* sp. Las colonias más pequeñas correspondieron a los hongos conocidos como "levaduras negras", y presentaron tres morfologías diferentes. También hubo desarrollo de una colonia de un hongo filamentoso dematiáceo (pigmentado de color oscuro).



<u>Muestra 3.</u> Corresponde a una muestra procedente de la superficie de un tubo acodado de PVC en la zona umbría de la planta



Figura 3. Imagen de la superficie de tubo acodado de PVC (parte umbría) [= muestra 3], y el crecimiento resultante de la siembra del material recolectado en una placa de Petri conteniendo medio de cultivo PDA.

La mayoría de las colonias que se observan en la Figura 3 se correspondieron morfológicamente con dos tipos de levaduras negras.



<u>Muestra 4.</u> La procedencia de esta muestra es la superficie de una puerta de color azul localizada en la parte umbría de la nave.

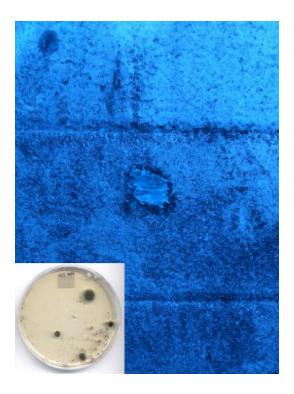


Figura 4. Imagen de la superficie puerta retráctil de color azul (parte umbría) [= muestra 4], y el crecimiento resultante de la siembra del material recolectado en una placa de Petri conteniendo medio de cultivo PDA.

La mayoría de las colonias de la Figura 4 correspondieron a dos tipos morfológicos de levaduras negras. También hubo el desarrollo de cuatro colonias de un hongo filamentoso dematiáceo identificadas como *Cladosporium* sp.



<u>Muestra 5.</u> Se corresponde con una pared blanca contigua a la puerta retráctil azul de la muestra 4

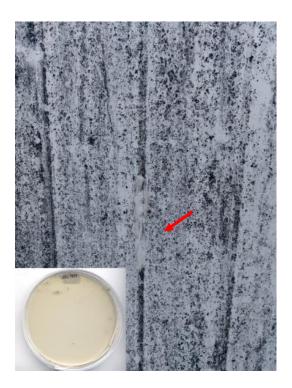


Figura 5. Imagen de la superficie pintada en blanco que rodea la puerta azul (parte umbría). [= muestra 5], y el crecimiento resultante de la siembra del material recolectado en una placa de Petri conteniendo medio de cultivo PDA. La flecha indica la zona donde se realizó la toma de muestra; se puede observar la facilidad con la que se desprende el material adherido.

Las colonias (muy pequeñas) que se observan en la Figura 5 se correspondían morfológicamente con levaduras negras.



<u>Muestra 6.</u> Se corresponde con un bajante de tubería plástica próximo a la puerta azul.



Figura 6. Imagen de la bajante de tubería plástica de color blanco, cerca puerta azul (parte umbría) [= muestra 6], y el crecimiento resultante de la siembra del material recolectado en una placa de Petri conteniendo medio de cultivo PDA.

Las colonias que se observan en la Figura 6 correspondieron a dos tipos morfológicos de levaduras negras.



<u>Muestra 7.</u> Se corresponde con uno de los postes que soportan la verja exterior de la planta



Figura 7. Imagen del tubo metálico pintado en blanco que sostiene la alambrada de iguales características (parte umbría) [= muestra 7], y el crecimiento resultante de la siembra del material recolectado en una placa de Petri conteniendo medio de cultivo PDA.

Las colonias que se observan en la Figura 7 correspondieron a dos tipos morfológicos de levaduras negras y a una colonia de *Alternaria* sp.



Muestra 8. Baranda metálica exterior no galvanizada

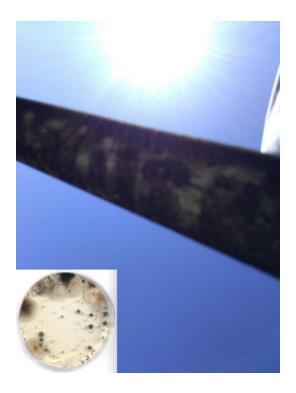


Figura 8. Imagen de la baranda metálica en el lateral de la planta (expuesta a irradiación solar) [= muestra 8], y el crecimiento resultante de la siembra del material recolectado en una placa de Petri conteniendo medio de cultivo PDA.

Las colonias correspondieron mayoritariamente a tres tipos morfológicos de levaduras negras, de *Alternaria* sp. (5 colonias grandes) y de *Cladosporium* sp. (14 colonias de color verde oliva, consistencia pulverulenta, pequeñas).



Muestra 9. Puerta lateral de planta pintada de color blanco



Figura 9. Imagen de la puerta pintada de blanco en el lateral de la planta [= muestra 9], y el crecimiento resultante de la siembra del material recolectado en una placa de Petri conteniendo medio de cultivo PDA.

Las colonias que se observan en la Figura 9 correspondieron mayoritariamente a tres tipos morfológicos de levaduras negras, y a una colonia de *Cladosporium* sp.



Muestra 10. Caja de protección de un extintor ubicado en el exterior de la planta



Figura 10. Imagen de la caja de protección del extintor de color rojo en el lateral de la planta [= muestra 10], y el crecimiento resultante de la siembra del material recolectado en una placa de Petri conteniendo medio de cultivo PDA.

Las colonias que se observan en la Figura 10 correspondieron mayoritariamente a tres tipos morfológicos de levaduras negras, a una de *Alternaria* sp. y a una de *Cladosporium* sp.



B.- Identificación (ID) molecular de los hongos aislados de las manchas cromáticas oscuras

En la Tabla 1 se muestra la correlación entre la ID morfológica presuntiva y la ID molecular de los hongos recuperados de un N = 10 muestras de manchas oscuras de distintas superficies externas de la planta de Silvalac (El Pallaresos, Tarragona).

Tabla 1.- Identificación fenotípica y molecular de cepas fúngicas representativas de la micobiota presente en las manchas cromáticas procesadas de la planta de Silvalac en Els Pallaresos, Tarragona.

FMR*	Muestra original/ID fenotípica	ID Molecular (% identidad BLAST-ITS)
16346	Muestra 1/ levadura basidiomicete, rosada	Erythrobasidium hasegawianum y
		Erythrobasidium yunnanense (99 %)
16347	Muestra 1/ levadura negra, colonias con forma de	Dothichiza sp. (95 %)
	"estrella de mar"	
16348	Muestra 1/ <i>Phoma</i> sp.	Didymella glomerata (100 %)
16344	Muestra 2/ hongo filamentoso	Trichoderma longibrachiatum (100 %)
16345	Muestra 2/ levadura negra, "pintas"	Erythrobasidium yunnanense (100 %)
16338	Muestra 3/ levadura negra	Dothichiza sp. (95 %)
16340	Muestra 4/ hongo filamentoso dematiáceo	Alternaria alternata (99 %)
16339	Muestra 4/ levadura negra	Dothichiza sp. (95 %)
16341	Muestra 5/ levadura negra	Dothichiza sp. (94 %)
16342	Muestra 5/ Aureobasidium sp.	Aureobasidium pullulans (100 %)
	·	
16343	Muestra 5/ levadura negra, aspecto mucoso	Exophiala phaeomuriformis (100 %)
16336	Muestra 6/ levadura negra	Dothichiza sp. (95 %)



16337	Muestra 6/ levadura negra, colonia color amarillento-negruzco	Dothichiza sp. (95 %)
16334	Muestra 7/ Alternaria sp.	Alternaria alternata 100%
16335	Muestra 7/ levadura negra, crecimiento expansivo	Catenulostroma microsporum (97 %)
16327	Muestra 8/ levadura negra, crecimiento expansivo	No creció
16328	Muestra 8/ levadura negra, colonia de aspecto seco	Dothichiza sp. (95 %)
16329	Muestra 8/ levadura negra, colonia de aspecto mucoso	Dothichiza sp. (95 %)
16324	Muestra 9/ levadura negra, crecimiento expansivo	Dothichiza sp. (94 %)
16325	Muestra 9/ levadura negra, forma de "boina"	Dothichiza sp. (94 %)
16326	Muestra 9/ levadura negra, color ocre	Dothichiza sp. 95%
16322	Muestra 10/ levadura negra, crecimiento expansivo	Dothichiza sp. (94 %)
16323	Muestra 10/ levadura negra, muy mucosa	Dothichiza sp. (95 %)

FMR* Colección de cultivos de la Facultad de Medicina de Reus



5. Conclusiones:

En base a los resultados obtenidos podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- Las afectaciones cromáticas observadas en las superficies externas de la planta de la empresa Silvalac (Grupo Armando Álvarez) (Ctra. Santes Creus, S/N. 43151, Els Pallaresos, Tarragona), son de naturaleza biológica, concretamente debidas al consorcio entre diferentes microorganismos y partículas de polen.
- 2) Los consorcios biológicos de dichas afectaciones, observados mediante microscopía óptica, están formados mayoritariamente por diferentes tipos de estructuras fúngicas (hongos levaduriformes y miceliares), bacterias y partículas de polen.
- 3) Todas las muestras estudiadas (N = 10) han sido positivas para la presencia de hongos.
- 4) En todas las muestras, a excepción de la número 2, se han observado colonias pertenecientes al hongo dematiaceo *Dothichiza* sp. Ello implica que cepas de este género, serían las principales responsables de las afectaciones cromáticas observadas en la planta.
- 5) No se ha podido realizar una identificación a nivel de especie, ya que probablemente las cepas aisladas, pertenezcan a una posible nueva especie para la ciencia.
- 6) El hecho de que mayoritariamente las especies del género Dothichiza se comporten como fitopatógenas y alguna de ellas (Dothichiza pityophila (= Sydowia polyspora)) sea parásita de los pinos (Butin 1964), induce a concluir que con una elevada probabilidad el pinar colindante a la planta de Silvalac, sea el reservorio y la fuente de contaminación de los hongos que detectamos en la planta de la empresa.
- 7) No se ha detectado ninguna **afectación cromática en el interior de la planta**, similar a las observadas en el exterior de la misma.

Butin H. 1964. Über zwei Nebenfruchtformen von Sydowia polyspora (Bref. et v. Tav.) Müller. Sydowia 17: 114-118.

