

**PRESENCIA DE HONGOS MICELIALES TERMOTOLERANTES Y TERMOFÍLICOS  
EN EL VERTEDERO DE LAJAS, PUERTO RICO, PRESTANDO ESPECIAL  
INTERÉS A *ASPERGILLUS FUMIGATUS***

Por

Yanitza Padilla Luciano

Tesis sometida en cumplimiento parcial  
de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

Biología

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO  
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ  
2004

---

Vivian Navas, Ph.D.  
Miembro, Comité Graduado

---

Fecha

---

Carlos Santos, Ph.D.  
Miembro, Comité Graduado

---

Fecha

---

Sandra Lee Maldonado, Ph.D.  
Presidente, Comité Graduado

---

Fecha

---

Lucy Williams, Ph. D.  
Director Departamento de Biología

---

Fecha

---

Bryan Brunner, Ph. D.  
Representante de Estudios Graduados

---

Fecha

## ABSTRACT

Waste handling processes at a landfill facility may result in bioaerosol emissions, including several types of fungal spores. Thermotolerant and thermophilic fungi associated with the composting process at a waste handling facility in Lajas, Puerto Rico, were quantified and identified. Two seasons of the year, summer ("June-August") and winter ("December-February"), were investigated. For the primary isolation of fungi, Petri dishes containing Littman's Oxgall were exposed for 30 minutes and a two stage Andersen sampler was used. Fungi were identified using macroscopic and microscopic characteristics, and the appropriate taxonomic keys. The isolated fungi were *Aspergillus fumigatus*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizomucor pusillus*, *Chrysosporium tropicum* and *Aspergillus candidus*. *Aspergillus fumigatus* was the most frequent fungi collected in both seasons. A significant correlation was obtained between meteorological variables, such as soil temperature, soil humidity and wind velocity and viable spore concentration collected by Petri dishes.

## RESUMEN

El proceso de disposición de desperdicios en un vertedero puede resultar en la emisión de bioaerosoles, incluyendo las esporas de algunos hongos. Se identificaron y cuantificaron hongos miceliales termotolerantes y termofílicos asociados al proceso del compostaje en el vertedero de Lajas, Puerto Rico. Se investigaron dos épocas del año, verano ("junio-agosto") e invierno ("diciembre-febrero"). Para la recuperación primaria de los hongos se utilizó la técnica de exposición de platos conteniendo Littman's Oxgall por 30 minutos y un muestreador Andersen de dos etapas. Los hongos fueron identificados por sus características macroscópicas y microscópicas haciendo uso de las claves taxonómicas adecuadas. Los hongos encontrados fueron *Aspergillus fumigatus*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizomucor pusillus*, *Chrysosporium tropicum* y *Aspergillus candidus*. *Aspergillus fumigatus* fue el hongo más frecuentemente recuperado en las dos épocas del año. Se obtuvo una correlación significativa entre las variables meteorológicas de temperatura del suelo, humedad del suelo y velocidad del viento y la concentración de esporas viables recuperadas utilizando la técnica de exposición de plato.

*Derechos de autor reservados<sup>©</sup>, Yanitza Padilla Luciano 2004*

*Para Gabriel Andrés, con todo el amor de mami.*

## AGRADECIMIENTOS

Es meritorio agradecer la colaboración de aquellas personas que hicieron posible este estudio. Primero, le doy gracias a mi Dios, por crear el mundo y los hongos para que los pudiera estudiar, por darme la libertad y el intelecto necesario para cumplir esta meta. Agradezco al Departamento de Biología, UPR – Mayagüez, por los fondos, los materiales y el equipo administrado para llevar a cabo este proyecto. Agradezco, especialmente, a mi consejero de tesis, la Dra. Sandra Lee Maldonado, por su orientación profesional y su ayuda espiritual en el proceso. Gracias por tu apoyo incondicional, tus consejos y tus regaños cuando fueron necesarios y por inspirarme así como una vez te inspiró a tí el Dr. Betancourt. Gracias a los miembros de mi comité graduado, la Dra. Vivian Navas y el Dr. Carlos Santos, porque este proyecto es el fruto de su orientación, sus ideas y correcciones. Agradezco al Dr. Carlos Betancourt por facilitar el muestreador Andersen utilizado en este estudio y por nunca dejar de cumplir tu vocación de *Maestro*.

Agradezco a la Sra. Irmanette Torres Lugo, en la Oficina de Investigación Institucional y Planificación -Rectoría- UPR – Mayagüez, por su asistencia en el análisis estadístico de este trabajo. Agradezco a Carolyn Rivera, por sus sugerencias productivas para el desarrollo de esta investigación, su ayuda en el laboratorio y por hacer de éste un lugar en el que se puede conversar, además de trabajar. Agradezco al Sr. José Almodóvar - Laboratorio de Rayos X del Departamento de Geología- UPR - Mayagüez por su colaboración en la preparación de las fotos utilizando el microscopio electrónico de rastreo. Gracias por todo el tiempo adicional que brindaste sin tener que hacerlo.

Agradezco al Sr. Eleuterio Seda, empleado del Departamento de Control Ambiental del municipio de Cabo Rojo, por su apoyo, su confianza, su tiempo y ayuda en la adquisición del permiso para tomar muestras en el vertedero. En la motivación por tu trabajo encontré mi motivación para realizar un estudio en el que se evalúa la posición del trabajador en el vertedero. Agradezco al Sr. Elliot Segarra por el permiso otorgado para realizar los muestreos en el vertedero de Cabo Rojo y por posteriormente adquirir el permiso para muestrear en el vertedero de Lajas. Gracias al Sr. José Irizarry y al Sr. Miguel Blasini por otorgar el permiso para trabajar en el vertedero de Lajas. Agradezco, especialmente, a todos los trabajadores del vertedero de Lajas por facilitar el acceso al área de muestreo y por toda la ayuda brindada.

Agradezco a mi cuñado, el Sr. José Morales y mi hermana, Ing. Yazmín Padilla por brindarme transportación hacia el vertedero, por su tiempo y ayuda durante los muestreos. Gracias a mi hermana, Ing. Yeira Padilla, por la asistencia en la preparación de las tablas y gráficas. Agradezco a mi esposo Walter Barber, por su ayuda durante los muestreos y en el manejo del equipo. Gracias por tu comprensión, tu apoyo, tu confianza y tu interminable paciencia y por nunca decir *no*. ¡Gracias por todo tu amor! Agradezco a mi hijo, Gabriel Andrés Barber, por ser esa personita que me da fuerzas para continuar cada día. Eres mi razón para continuar. Finalmente, gracias a mis padres por la persona que soy. Gracias porque no sólo han sido buenos padres para mí, sino que han sido los mejores padres para mi hijo. Gracias por cuidar de él todo el tiempo necesario.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Página</b>
Lista de Tablas .....	ix
Lista de Figuras .....	x
Lista de Apéndices .....	xii
Introducción .....	1
Revisión de Literatura .....	3
Materiales y Métodos .....	9
Resultados .....	18
Discusión .....	45
Conclusiones .....	51
Recomendaciones .....	52
Literatura Citada .....	53

## LISTA DE TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla 1. Especies de hongos encontradas mediante la técnica de exposición de platos y el muestreador Andersen .....	23
Tabla 2. Comparación de la concentración de esporas viables (UFC's) promedio por época y técnica de muestreo .....	31
Tabla 3. Número de UFC's y valor de parámetros ambientales durante los muestreos realizados utilizando la técnica de exposición de platos y el muestreador Andersen .....	32
Tabla 4. Porcentaje de esporas viables recuperadas en cada etapa utilizando el muestreador Andersen .....	43
Tabla 5. Número de esporas viables totales por unidad de aire recuperadas utilizando el muestreador Andersen .....	44

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Área de depósito de basura en el vertedero de Lajas .....	9
Figura 2. Exposición de platos Petri en el área de depósito de basura del vertedero de Lajas. El medio de cultivo utilizado fue Littman's Oxgall para la recuperación de hongos termotolerantes y termofílicos (1, 3 y 4) y plato control (2) .....	11
Figura 3. El muestreador Andersen es un instrumento que simula el sistema respiratorio humano.....	12
Figura 4. Muestreador Andersen de 2 etapas compuesto por una bomba de succión (a), dos cámaras (b y c) caracterizadas por el diámetro de sus orificios y (d) cabezal con orificio por el cual entra el particulado.....	13
Figura 5. Instrumento Kestrel 4000 utilizado para monitorear condiciones ambientales durante los muestreos.....	14
Figura 6. Morfología de la colonia de <i>Aspergillus fumigatus</i> en Littman's Oxgall (A) y microscopía de luz de <i>A. fumigatus</i> (400 X) (B).....	24
Figura 7. Morfología de la colonia de <i>Aspergillus fumigatus</i> en diferentes medios de cultivo utilizados para su identificación; <i>Czapek Yeast Agar</i> (A), <i>25% Glycerol Nitrate Agar</i> (B) y <i>Malt Extract Agar</i> (C).....	24
Figura 8. <i>Humicola lanuginosa</i> en PDA. Morfología del anverso de una colonia joven (A) y una colonia madura (B); morfología del reverso de una colonia joven (C) y una colonia madura (D); microscopía de luz de <i>H. lanuginosa</i> (400 X) mostrando micelio y esporas (E).....	25
Figura 9. Morfología de la colonia de <i>Rhizomucor pusillus</i> en PDA (A) y microscopía de luz de <i>R. pusillus</i> (400 X) (B).....	26
Figura 10. Morfología de la colonia de <i>Chrysosporium tropicum</i> en Littman's Oxgall (A) y microscopía de luz de <i>C. tropicum</i> (400 X) (B).....	26

Figura 11. Morfología de la colonia de <i>Aspergillus candidum</i> en MEA (A) y microscopía de luz de <i>A. candidum</i> (400 X) (B).....	27
Figura 12. Morfología en microscopía electrónica de rastreo de <i>Aspergillus fumigatus</i> (A-C), <i>Humicola lanuginosa</i> (D-E) y <i>Rhizomucor pusillus</i> (F).....	28
Figura 13. Morfología en microscopía electrónica de rastreo de <i>Chrysosporium tropicum</i> (A-B) y <i>Aspergillus candidus</i> (C-F).....	29
Figura 14. UFC's vs. fecha de muestreo.....	30
Figura 15. Prueba de <i>t</i> pareada para la concentración de esporas viables por época de muestreo con $\alpha = 0.05$ .....	31
Figura 16. UFC's vs. velocidad del viento.....	33
Figura 17. UFC's vs. temperatura del suelo.....	34
Figura 18. UFC's vs. humedad del suelo.....	35
Figura 19. UFC's vs. humedad del suelo en relación polinómica de grado 4....	36
Figura 20. UFC's vs. humedad relativa.....	37
Figura 21. UFC's vs. humedad relativa en relación polinómica de grado 4....	38
Figura 22. UFC's vs. temperatura del ambiente.....	39
Figura 23. UFC's vs. altitud.....	40
Figura 24. UFC's vs. presión barométrica.....	41
Figura 25. UFC's vs. pH del suelo.....	42

## LISTA DE APÉNDICES

	<b>Página</b>
Apéndice 1. Prueba de hipótesis para diferencia de promedios de poblaciones independientes (Prueba de $t$ pareada) para la concentración de esporas viables recuperadas por época utilizando el muestreador Andersen y la técnica de exposición de plato. ....	57

## INTRODUCCIÓN

Durante el proceso aeróbico de disposición de desperdicios o compostaje, los materiales orgánicos se descomponen debido al crecimiento e interacción por parte de organismos mesofílicos (Kramer *et al.*, 1989). Luego, durante el proceso de fermentación, se genera calor y como consecuencia los organismos mesofílicos son eliminados a causa de su susceptibilidad a altas temperaturas. El calor generado hace al substrato ideal para el crecimiento de organismos termotolerantes, como *Aspergillus fumigatus* y termofílicos.

El proceso de disposición de desperdicios en un vertedero puede resultar en la emisión de bioaerosoles microbiológicos, algunos de los cuales son potencialmente patógenos (Jones y Cookson, 1983). El origen exacto y el número de microorganismos presentes en cada etapa del proceso, depende de la naturaleza del material a descomponerse y de los organismos presentes en el mismo (Crawford, 1985).

*Aspergillus fumigatus* es un hongo patógeno oportunista y alérgeno, que ha sido caracterizado como flora normal e integral en el proceso del compostaje y que participa con otros organismos en la descomposición final de los desperdicios (Boutin y Moline, 1987). Otros agentes biológicos que tienen el potencial de ser patógenos son los actinomicetos y las micotoxinas. Sin embargo, estos bioaerosoles no han mostrado ser significativos o lo suficientemente prevalentes en el proceso del compostaje (Epstein, 1997). *Aspergillus fumigatus* aparentemente no predomina en la micoflora de muchos suelos, aunque ha sido recuperado ocasionalmente. Este hongo es característico de suelos termales y constituye el 75 % del total de la micoflora viable recuperada de la composta (Millner *et al.*, 1977).

La recuperación de *Aspergillus fumigatus* representa un riesgo para la salud de los trabajadores, si no se siguen las medidas de seguridad necesarias durante el proceso de manejo de desperdicios en un vertedero. Aunque bajas concentraciones de esporas de *A. fumigatus* en el exterior ( $10$  a  $10^4$  / $m^3$ ) aparentemente no causan infección en individuos saludables, Austwick (1963) sugirió que estos niveles probablemente inciten respuestas alérgicas en individuos sensibles como los pacientes de asma y alergias.

El propósito de mi estudio fue cuantificar e identificar los hongos miceliales termotolerantes y termofílicos en el vertedero municipal de Lajas, Puerto Rico, prestando especial interés a *Aspergillus fumigatus*. Además, se estudió la correlación entre la concentración de esporas viables recuperada durante el proceso del compostaje y algunas variables ambientales, y se compararon diferentes técnicas de recuperación de esporas viables (técnica de exposición de plato y el muestreador Andersen de 2 etapas). Aunque en Puerto Rico anteriormente se han realizado estudios sobre hongos en material de composta, este tipo de estudio es el primero que se realiza en composta originada de desperdicios municipales, típica de un vertedero, y los resultados obtenidos constituyen el primer informe sobre la micoflora presente en los vertederos de la Isla.

## REVISIÓN DE LITERATURA

La composta consiste de cualquier materia orgánica degradable que se mantiene amontonada o apilada con suficientes nutrientes minerales, como el nitrógeno, y suficiente ventilación que permita el rápido crecimiento microbiológico. El ejemplo más familiar es el amontonamiento de material vegetal de jardín. Otras aplicaciones importantes de composta son las plantas de compostaje usadas para procesar desperdicios municipales y las utilizadas para la producción comercial de hongos.

El compostaje es un proceso microbiológico que genera contaminantes biológicos aéreos, particularmente bacterias y hongos. Los aerosoles microbiológicos que resultan del proceso del compostaje pueden ser potencialmente peligrosos (Burge y Millner, 1980). El riesgo de que se presenten concentraciones atmosféricas elevadas de esporas que representen un riesgo a la salud es muy alto en plantas de tratamiento de desperdicios (Varese *et al.*, 2002). Aparte de su patogenicidad, el impacto potencial de los bioaerosoles sobre la salud ha sido ampliamente discutido desde el punto de vista alérgico y toxicológico (Fischer *et al.*, 2000). Investigaciones hechas a agricultores mostraron que una exposición elevada a polvo contaminado con micotoxinas podría causar cáncer o micotoxicosis del pulmón (Ghio y Roggli, 1995). Las micotoxinas pueden encontrarse en esporas de hongos vivas o en esporas muertas y/o en el polvo.

Los hongos, especialmente las especies termofílicas, han sido recuperadas con frecuencia durante la transformación de materia orgánica. Los hongos termofílicos son aquellos que crecen a una temperatura máxima de o sobre 50 °C y una temperatura mínima

de 20 °C. Los hongos termotolerantes pueden crecer a 50 °C, pero crecen además a temperaturas por debajo de 20 °C (Cooney y Emerson, 1964).

En el primer estudio sobre la presencia, la concentración y funciones de los organismos termofílicos en el suelo o en la composta (Waksman *et al.*, 1939), se demostró que durante la descomposición de materia orgánica, la concentración de los hongos termofílicos era mayor a 50 °C, pero que estos organismos no se detectaban una vez la temperatura alcanzaba los 65 °C.

Durante el proceso del compostaje ocurren cambios continuos en la población de microorganismos (Poincelot, 1974). Chang y Hudson (1967) dividieron estos cambios en tres etapas. La primera etapa incluye las especies de hongos mesofílicos presentes en el material inicial que mueren al aumentar la temperatura. La segunda etapa incluye las especies de hongos termofílicos y termotolerantes presentes entre 40 °C – 60 °C. Por último, en la tercera etapa se incluyen algunos organismos termotolerantes y los organismos mesofílicos que surgen al disminuir la temperatura.

En estudios hechos sobre la utilización de celulosa y hemicelulosa en la composta, se ha demostrado que la mayor parte de la descomposición ocurre en la etapa termotolerante-termofílica y que la mayor degradación ocurre cerca de los 60 °C, siendo *Aspergillus fumigatus* uno de los hongos más activos en este proceso (Stutzenberger *et al.*, 1970; Jain *et al.*, 1979). En estudios hechos por Kirivanta *et al.* (1999) se presenta que los hongos más abundantes durante la recolección de basura y en el vertedero son *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Acremonium* sp., y *Fusarium* sp.

*Aspergillus fumigatus* ha sido identificado como la especie más patógena de su género (Sinski, 1975; Mackenzie, 1988) y como el principal causante de aspergilosis, una enfermedad asociada con la exposición de esporas de algunas especies del género *Aspergillus*. La aspergilosis se puede presentar en 4 fases o entidades: (1) asma extrínica o alérgica; (2) aspergilosis alérgica broncopulmonar (AAPA), condición en la cual las esporas de *Aspergillus* invaden y germinan en los pulmones y el crecimiento micelial puede bloquear los bronquios (Vaughan, 1993); (3) pneumonitis hipersensitiva, condición asociada a la exposición repetitiva al alérgeno, y (4) aspergilosis invasiva (AI), condición que ocurre en pacientes inmunocomprometidos por padecer de serias enfermedades como leucemia, tuberculosis, diabetes, enfisema, o por el uso de drogas inmunosupresivas (como las administradas a pacientes que han recibido algún trasplante de órganos). En esta cuarta fase hay invasión del tejido pulmonar o la piel y se puede diseminar por la sangre a otras partes del cuerpo.

La presencia de *A. fumigatus* genera un gran número de esporas durante diferentes métodos del compostaje (Clark *et al.*, 1980; Millner *et al.*, 1980). Este organismo ha sido descrito por Cooney y Emerson (1964) como una especie termotolerante que puede crecer entre 12 °C y 55 °C. Usualmente se presenta en capas de micelio de aproximadamente 5 – 40 cm de grosor en el interior de la pila de composta (Gotaas, 1956; Boutin y Moline, 1987). Normalmente obtiene sus nutrientes de materia orgánica en descomposición, por lo que se clasifica como un organismo saprófito, pero puede obtener también sus nutrientes de células vivas. Según Sinski (1975), el ciclo de vida de este organismo es normalmente saprófito y la invasión a los tejidos es incidental.

La inhalación de las esporas de *A. fumigatus* es la ruta más común de exposición en el ser humano. Holmberg (1987) reportó que niveles mayores de 50 unidades formadoras de colonia (UFC's) / m<sup>3</sup> de aire de especies termotolerantes de *Aspergillus* sp. representaban un factor de riesgo de sufrir irritación en los ojos y síntomas respiratorios. Esto es muy importante si se toma en consideración un modelo respiratorio desarrollado por Boutin y Moline (1987), el cual estima que un trabajador completamente desprotegido en el momento de traspalear la composta puede inhalar de 25,000 a 30,000 esporas viables por hora.

En estudios hechos por Clark *et al.*, (1983) se reportaron concentraciones de *A. fumigatus* de hasta 10<sup>6</sup> UFC/ m<sup>3</sup> durante el manejo y procesamiento de la composta. Jones y Cookson (1983) también reportaron la incidencia de *A. fumigatus* durante el proceso del compostaje. Durante su estudio tomaron muestras de las cercanías de una facilidad de composta en Washington, D.C. (E.E.U.U.) utilizando el muestreador tipo Andersen. Estos determinaron que *A. fumigatus* representaba un 95 % de la fracción de organismos potencialmente respirables. En Finlandia, Kirivanta *et al.*, (1999) revelaron concentraciones de esporas viables de *A. fumigatus* de hasta 10<sup>5</sup> UFC/m<sup>3</sup>.

Actualmente no existen leyes que regulen la concentración de esporas de hongos en el aire. Sin embargo, aunque no hay guías o estándares establecidos, algunos expertos y agencias de control ambiental y de la salud tienen diversas opiniones de lo que debe ser un nivel aceptable de esporas de hongos en el aire. Según un documento publicado por la agencia *Wonder Makers Environmental Inc.* (2001), la *American Industrial Hygienist Association* (AIHA), reportó que no existe un nivel aceptable de esporas de hongos cuando se refiere a un organismo patógeno. En este documento se reporta también que la agencia

*Air Sampling Instruments for Evaluation of Atmospheric Contaminants (ASIEAC)* consideraba que niveles mayores de 1,000 UFC/m<sup>3</sup> no eran aceptables. Además que, Godish (2001) argumentó que concentraciones mayores de 1,000 UFC/m<sup>3</sup> y mayores de 10,000 esporas (viables y no viables) / m<sup>3</sup> indicaban contaminación (Wonder Makers Environmental Inc., 2001).

Otros hongos termofílicos frecuentemente asociados al proceso del compostaje son *Rhizomucor pusillus*, *Chaetomium thermophile*, *Humicola insolens*, *H. lanuginosa* y *Thermoascus aurantiacus*. Se ha reportado que la mayoría de estos hongos son degradadores de celulosa, excepto *H. lanuginosa*, que es un hongo que no puede degradar celulosa y vive como comensal con especies degradadoras de celulosa.

En Puerto Rico, actualmente hay alrededor de 29 vertederos en operación municipal y privada. En 1994, 32 vertederos cesaron operaciones al entrar en vigor las enmiendas al subtítulo D de la Ley de Conservación y Recuperación de Recursos (RCRA) de la Agencia Federal de Protección Ambiental (EPA por sus siglas en inglés). La mayoría de estas instalaciones no cumplían con la reglamentación y presentaban situaciones de operación deficiente, escasez de material de cobertura, capacidad receptora limitada o nula, ubicación en áreas ambientalmente sensitivas, ausencia de sistemas para el control de gases y de monitoreo de aguas subterráneas, de recolección y tratamiento de los lixiviados y del desvío de la escorrentía del área activa, así como la ausencia de programas para detectar y prevenir la deposición de desperdicios peligrosos, controlar la proliferación de vectores y llevar un registro de la operación diaria y de los muestreos de las aguas subterráneas y gases.

Algunos vertederos en Puerto Rico están localizados próximos a zonas altamente pobladas. Esto puede representar un riesgo para las personas que viven en las cercanías de los vertederos ya que no existe alguna regulación o estándar para UFC/m<sup>3</sup> de hongos patógenos en el aire. Algunos investigadores (Raper y Fennel, 1965; Epstein y Epstein, 1985; Maritato *et al.*, 1992) han argumentado que *A. fumigatus* no representa un riesgo a la salud en personas saludables expuestas mientras trabajan en vertederos o viven en las cercanías. Sin embargo, Díaz *et al.* (1992) argumentaron que aunque la existencia de daño por las esporas de *A. fumigatus* no había sido demostrada, y que solamente podrían representar daños significativos para individuos susceptibles, la prudencia indicaba que un vertedero no debería estar situado próximo a lugares de vivienda.

El presente estudio es el primer informe para Puerto Rico y el Caribe sobre hongos miceliales termotolerantes y termofílicos asociados al proceso de disposición de desperdicios en un vertedero. El mismo tuvo como propósito cuantificar e identificar las especies termotolerantes-termofílicas recuperadas y correlacionar su concentración con las variables ambientales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Area de muestreo y recuperación de hongos miceliales termotolerantes-termofílicos*

El lugar de muestreo fue el área de depósito de basura en el vertedero de Lajas, localizado en la Carretera 303, km. 6.8, del Barrio Llanos Costa, Sector Fajardo del municipio de Lajas, Puerto Rico (Figura 1). El método de disposición utilizado en el vertedero se denomina *trinchera*. En el mismo, se diseña y se construye una trinchera o fosa profunda tomando en consideración el tipo de suelo y el nivel de las aguas subterráneas en el lugar, entre otros aspectos. Luego, se depositan los desperdicios, se compactan con un tractor y se soterran al finalizar las labores del día. Esta cubierta diaria de tierra es de 15 cm de espesor para evitar la infiltración de lluvia, la interacción de animales, la dispersión de olores y el levantamiento de bolsas plásticas, entre otros.



**Figura 1.** Área de depósito de basura en el vertedero de Lajas (Fotografía tomada por Yanitza Padilla, 2003).

Durante el estudio se realizaron un total de 12 muestreos. Se realizaron 2 muestreos mensualmente (al azar) durante un periodo de 3 meses en época de verano (en los meses de junio, julio y agosto) y durante un periodo de 3 meses en época de invierno (en los meses de diciembre, enero y febrero).

Para la recuperación de hongos termotolerantes y termofílicos se utilizaron dos técnicas: (1) exposición de platos Petri conteniendo medio de cultivo y (2) el muestreador volumétrico Andersen de 2 etapas. Para la recuperación primaria en ambas técnicas se utilizó el medio de cultivo Littman's Oxgall, desarrollado por Littman y usado por Millner *et al.*, (1977) para aislar hongos asociados a la composta.

### ***I. Técnica de exposición de platos Petri con medio de cultivo***

En el área de depósito de basura se expusieron sobre el suelo 3 platos Petri (100 x 15 mm) conteniendo Littman's Oxgall Agar (Difco, 55g; 1L de agua destilada) durante 30 minutos (Figura 2). Para cada muestreo se mantuvo un cuarto plato Petri con medio de cultivo cerrado que se utilizó como control.

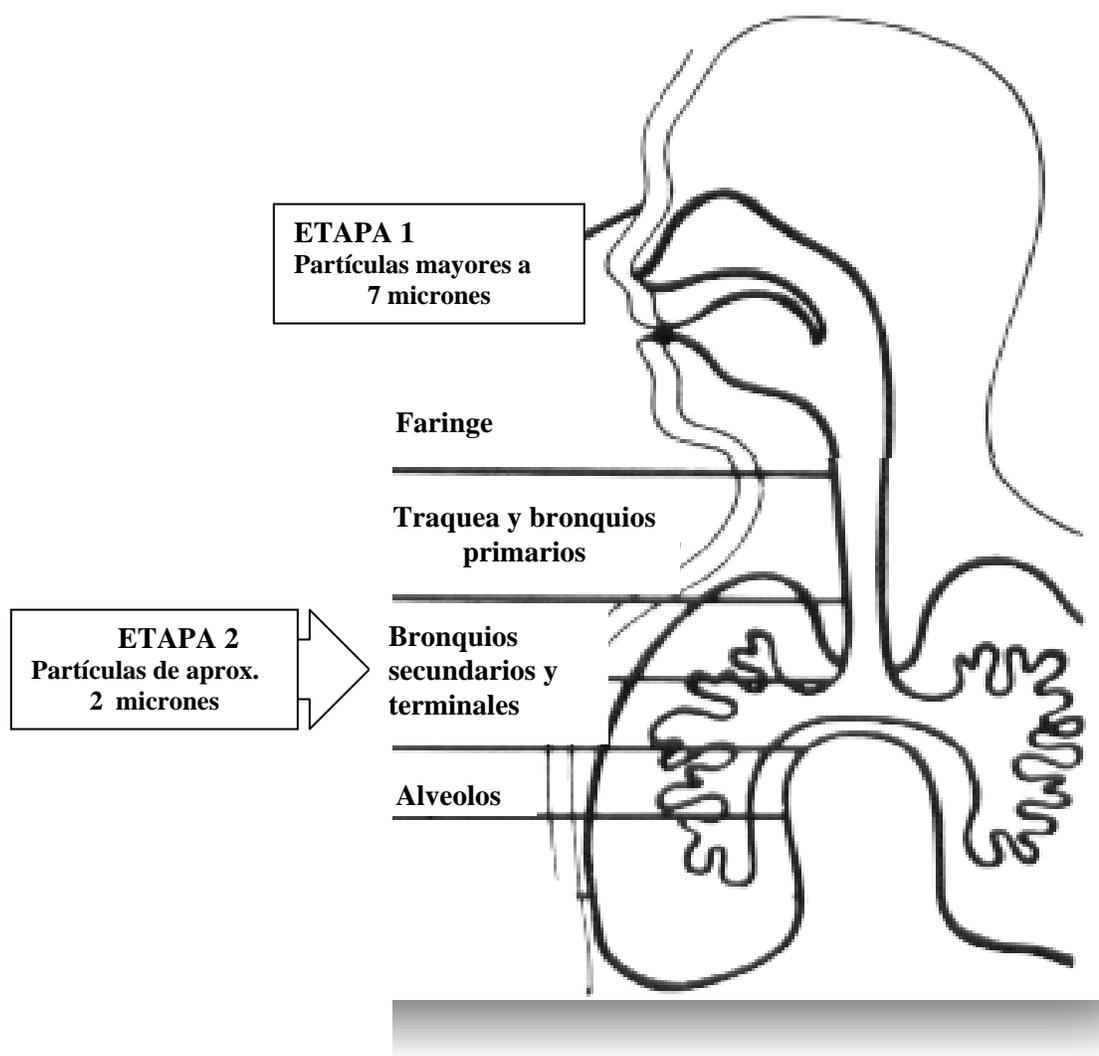
Littman's Oxgall Agar contiene 0.001% de cristal violeta como agente bactericida y es recomendado para la recuperación de hongos saprófitos del suelo. Además, se utilizó estreptomicina (30  $\mu$  g/ ml de medio) para suprimir el crecimiento de bacterias. Éste fue preparado en una solución concentrada con 10 ml de agua destilada estéril y 1 g de estreptomicina. Luego, se añadió 1 ml de esta solución a 9 ml de agua destilada estéril para obtener la solución final. Se añadieron 3 ml de esta última a cada litro de medio de cultivo líquido, luego de esterilizar en autoclave a 121 °C y 15 lb/pulg.<sup>2</sup> por 15 minutos y disminuido su temperatura a 45 °C.



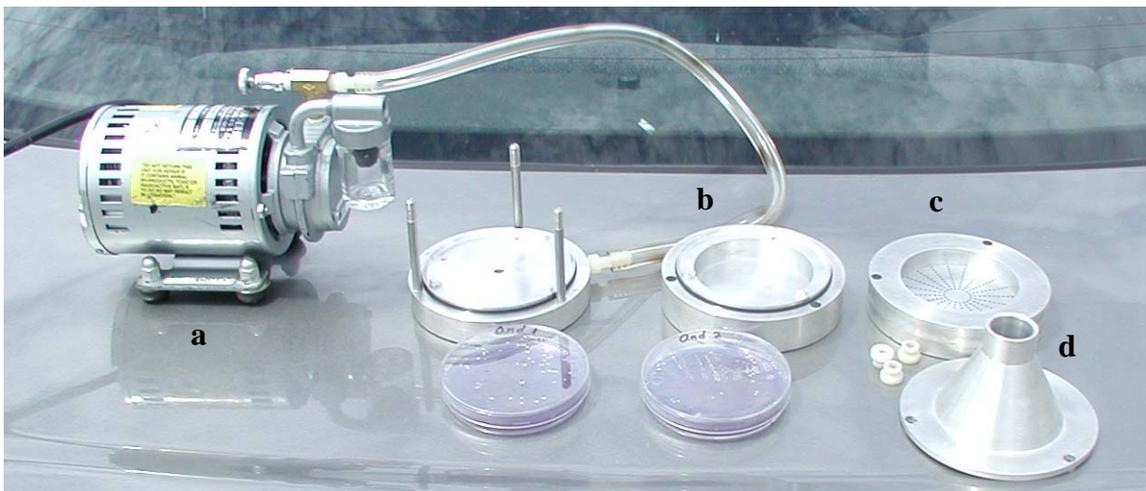
**Figura 2.** Exposición de platos Petri en el área de depósito de basura del vertedero de Lajas. El medio de cultivo utilizado fue Littman's Oxgall para la recuperación de hongos termotolerantes y termofílicos (1, 3 y 4) y plato control (2) (Fotografía tomada por Yanitza Padilla, 2003).

## **II. Técnica utilizando el muestreador Andersen de 2 etapas**

El muestreador Andersen de dos etapas (Andersen Instrument, Georgia, E.U.) es un instrumento volumétrico construido en aluminio que simula el sistema respiratorio humano (Figura 3). Cada etapa de impacto o cámara del instrumento contiene 200 orificios. El diámetro de los orificios de la primera etapa es de 1.5 mm (recupera partículas no respirables) y en la segunda etapa es de 0.4 mm (recupera partículas respirables) (Figura 4).



**Figura 3.** El muestreador Andersen es un instrumento que simula el sistema respiratorio humano.



**Figura 4.** Muestreador Andersen de 2 etapas compuesto por una bomba de succión (a) y dos cámaras (b y c) caracterizadas por el diámetro de sus orificios y (d) cabezal con orificio por el cual entra el particulado (Fotografía tomada por Yanitza Padilla, 2003).

El muestreador Andersen se esterilizó con alcohol isopropílico al 70 %, previo a cada muestreo. De forma aséptica se colocaron 2 platos Petri (100 x 15 mm) con medio de cultivo Littman's Oxgall dentro de cada una de las cámaras del instrumento. Se tomaron muestras en duplicado en el área de depósito de basura por un periodo de 3 minutos a una altura de 3 pies del suelo. Se utilizó un generador de corriente eléctrica (Coleman) de 10 caballos de fuerza para proveer electricidad al instrumento. Una vez expuestos los platos, éstos fueron removidos, rotulados y sellados con parafina.

Todos los muestreos con ambas técnicas se realizaron de 10:00 - 11:00 am. Se tomaron datos de temperatura, humedad relativa, velocidad del viento, altitud y presión barométrica utilizando un instrumento Kestrel 4000 (Nielsen-Kellerman, Pennsylvania, E.U.) (Figura 5). La temperatura del suelo del área a muestrear se midió con un termómetro (Weksler Instrument Corp., E.U.) y para medir el pH y la humedad relativa del suelo se utilizó un muestreador de suelo (modelo HB-2).



**Figura 5.** Instrumento Kestrel 4000 utilizado para monitorear condiciones ambientales durante los muestreos (Fotografía tomada por Yanitza Padilla, 2003).

### ***Procesamiento de muestras***

Las muestras recolectadas se procesaron en el Laboratorio C-324 del Edificio de Biología. Todos los platos se incubaron a 45 °C en una incubadora de convección por gravedad modelo 4 (Precision Scientific Group, GCA Corp., Illinois, E.U.) durante un periodo de 3-5 días. Luego del periodo de incubación se anotó el número de UFC's por plato. Se subcultivaron todas aquellas colonias de organismos que presentaban morfotipos diferentes. Cada colonia recuperada fue transferida a platos Petri (100 x 15 mm) conteniendo medios de cultivo Littman's Oxgall y *Potato Dextrose Agar* (PDA, Difco<sup>®</sup>, 39g; 1L de agua destilada) y se identificaron con un código de acuerdo a su procedencia y fecha de recuperación. Los platos inoculados se incubaron a 45 °C por 3-5 días. Los

cultivos puros se conservaron en tubos de cristal con tapa conteniendo medio de cultivo Littman's Oxgall para ser identificados posteriormente.

### ***Identificación de hongos miceliales termotolerantes y termofílicos***

Se realizaron cámaras húmedas de los cultivos puros para preservar intactas las estructuras reproductivas de los hongos y facilitar su identificación. Los cultivos fueron identificados de acuerdo a sus características morfológicas macroscópicas y microscópicas. Para cada morfotipo se evaluó su color, aspecto y tamaño de la colonia, y se determinaron sus características microscópicas de forma y dimensiones (diámetro y longitud). Las especies de *Aspergillus* fueron subcultivadas en *Czapek Yeast Agar* (CYA), 25 % *Glycerol Nitrate Agar* (G25N) y *Malt Extract Agar* (MEA), siguiendo el procedimiento de identificación descrito por Pitt (1979). Se hizo uso de recursos y las claves taxonómicas adecuadas para la identificación de las especies recuperadas.

### ***Análisis de resultados***

#### ***I. Correlación entre variables ambientales y la concentración de esporas***

##### ***(UFC's)***

Una vez obtenidos los datos de temperatura, humedad relativa, velocidad del viento, altitud, presión barométrica y pH, se analizó la correlación existente entre los mismos y el promedio aritmético de la concentración de esporas. Los datos obtenidos se analizaron con el método de regresión lineal para cada variable utilizando el programa Excel 2000 de Microsoft Office. De este análisis de regresión lineal se determinó si existía una correlación significativa entre las

variables atmosféricas y la concentración de esporas. Para determinar si la concentración de UFC's recuperadas en verano e invierno mediante la técnica de exposición de plato y el muestreador Andersen seguían una distribución normal se utilizó la prueba para normalidad Anderson-Darling. Luego, se realizó la prueba de hipótesis para diferencias de promedio de poblaciones independientes (Prueba  $t$  pareada) para determinar si los promedios de la concentración de esporas viables recuperadas por época (verano e invierno) mediante la técnica de exposición de plato y el muestreador Andersen eran estadísticamente diferentes. Para ambas pruebas se utilizó el programa estadístico Minitab versión 12.

## ***II. Análisis e interpretación de la información obtenida utilizando el muestreador Andersen***

El número de esporas viables por unidad de volumen de aire se calculó dividiendo el número total de colonias (UFC's) recuperadas en ambos platos entre el volumen de aire total muestreado en pies cúbicos. Por conveniencia, si se mantuvo un flujo constante de 28.3 litros/min, el volumen de aire total muestreado en pies cúbicos es igual al número de minutos de duración del muestreo para obtener el número de esporas viables por pie cúbico de aire muestreado:

$$\frac{\text{Número total de colonias (UFC's) de los 2 platos}}{\text{Número total de tiempo en minutos}} = \text{Número de esporas viables por pie cúbico de aire muestreado}$$

El porcentaje de esporas viables en cada etapa se determinó dividiendo el número total de UFC's en cada etapa en particular entre el número total de UFC's en las dos etapas:

$$\frac{\text{Número de colonias (UFC's) de la etapa I}}{\text{Número total de colonias (UFC's) de los 2 platos}} \times 100 = \text{Porcentaje de esporas viables aprox. 1.5 mm diámetro}$$

$$\frac{\text{Número de colonias (UFC's) de la etapa II}}{\text{Número total de colonias (UFC's) de los 2 platos}} \times 100 = \text{Porcentaje de esporas viables aprox. 0.4 mm diámetro}$$

Para obtener el número de esporas viables (UFC's) por m<sup>3</sup> de aire se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{UFC's/ m}^3 = \frac{\text{Total de colonias (UFC's)}}{\text{Duración del muestreo (min)}} \times \frac{35.3 \text{ pie}^3}{1 \text{ m}^3} \times \frac{1 \text{ min}}{1 \text{ pie}^3}$$

## RESULTADOS

Se recuperó un total de 5 especies de hongos miceliales termotolerantes y termofílicos del área de depósito de basura en el vertedero municipal de Lajas. Las especies de hongos termotolerantes encontradas fueron *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus candidus* y *Chrysosporium tropicum*. Las especies termofílicas recuperadas fueron *Humicola lanuginosa* y *Rhizomucor pusillus*.

*Aspergillus fumigatus* fue el hongo más abundante recuperado utilizando el muestreador Andersen y la técnica de exposición de plato y también fue el más frecuente durante las dos épocas del año estudiadas. Se determinó que *Aspergillus fumigatus* representó aproximadamente el 60 % del total de UFC's recuperadas en verano y aproximadamente el 80 % del total de UFC's recuperadas en invierno mediante la técnica de exposición de plato (Tabla 1).

Este hongo termotolerante presentó colonias de color verde en el anverso que pueden adquirir diferentes tonos de verde al madurar. El reverso de la colonia es incoloro en algunas cepas, en otras puede variar de color amarillo a verde o marrón-rojizo oscuro. Microscópicamente, presentó cabezas conidiales de forma columnar, generalmente repletas de conidias globosas a subglobosas. Las vesículas tienen forma claviforme y su medida es de hasta 20 a 30  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los conidióforos son cortos y pigmentados (Raper y Fennell, 1965; Domsch *et al.*, 1980) (Figura 6 y 12).

En *Czapek Yeast Agar* (CYA), las colonias de *A. fumigatus* crecieron abundantemente. Estas presentaron color crema-marrón en el anverso y textura arrugada. En el reverso, el medio se tornó color marrón-rojizo. En 25 % *Glycerol Nitrate Agar* (G25N) el crecimiento de las colonias fue más lento. El anverso de la colonia se observó

primero de color crema, para luego adquirir color verde grisáceo a azul en el margen. El reverso presentó color crema a verde y, en ocasiones, se desarrolló color marrón-rojizo en el centro de la colonia. En *Malt Extract Agar* (MEA) las colonias crecieron abundantemente. En el anverso, las colonias presentaron color verde oscuro y textura pulvurulenta. El reverso se observó incoloro y en algunas cepas se difundió color amarillo al medio (Figura 7).

*Humicola lanuginosa* se recuperó utilizando ambas técnicas de recuperación y se recuperó en todos los muestreos hechos en los meses de junio, julio y agosto del 2003. Sin embargo, esta especie no se recuperó en invierno. Las colonias de *H. lanuginosa* crecieron rápido entre 45 – 50 °C en 2 días en diferentes medios de cultivo. La colonia presentó color blanco, que luego cambió a color gris-verdoso hasta color negro. En el reverso se observó un pigmento de color rosado a color vino que se difundió en el agar. Microscópicamente, presentó aleuroconidias globosas de color marrón oscuro y de pared gruesa (Domsch *et al.*, 1980) (Figura 8 y 12).

*Rhizomucor pusillus*, *Aspergillus candidus* y *Chrysosporium tropicum* fueron hongos encontrados con poca frecuencia. *Rhizomucor pusillus* solamente se encontró en muestras tomadas mediante exposición de plato durante el mes de junio del 2003. Esta especie presentó colonias de color marrón a color gris de textura algodonosa a aterciopelada en el anverso. En el reverso, la colonia se observó de color crema a marrón. A nivel microscópico, se caracterizó por su micelio pigmentado, de gris a marrón, y por el desarrollo de esporangióforos ramificados de color marrón-amarillento. Los esporangios son globosos, y cada uno posee una columela en forma ovalada o de pera. Las

esporangiosporas son hialinas y de forma globosa a subglobosa, algunas de forma ovalada (Domsch *et al.*, 1980; Ellis, 1997) (Figura 9 y 12).

*Chrysosporium tropicum* se recuperó utilizando el muestreador Andersen durante el mes de julio del 2003. Esta especie presentó colonias de color blanco a color crema-marrón y una textura pulvurulenta a granular en el anverso. El reverso fue inicialmente incoloro y desarrolló un color amarillo-marrón pálido al madurar. Microscópicamente, esta especie presentó conidias hialinas piriformes a claviformes intercaladas, laterales (en pedicelos), o terminales (Domsch *et al.*, 1980) (Figura 10 y 13).

*Aspergillus candidus* fue recuperado durante muestreos hechos en el mes de diciembre del 2003, mediante la técnica de exposición de plato. *Aspergillus candidus* presentó colonias de color blanco, que luego cambiaron a color crema a crema amarillento. Algunas cepas produjeron esclerocios de color púrpura a color negro. Microscópicamente, se observaron cabezas conidiales que variaron de globosas a columnares en el mismo cultivo. Las vesículas se observaron globosas y las conidias presentaron formas globosas a elipsoidales (Raper y Fennell, 1965; Domsch *et al.*, 1980).

En nuestro estudio, *A. candidus* creció muy poco en CYA y no creció en G25N. En MEA, esta especie creció rápidamente. En el anverso presentó color blanco a crema amarillento y el centro de la colonia más elevado. Se observó una textura pulvurulenta en los bordes de la colonia. El reverso se observó incoloro o crema-amarillento (Figura 11 y 13).

Por otro lado, se encontró que el número de UFC's que se obtuvo fue mayor en la época de verano para ambas técnicas de recuperación y se observó un mayor número de UFC's en el mes de julio (Figura 14). Al comparar estadísticamente la concentración de

esporas viables por época (verano e invierno) recuperadas mediante la técnica de exposición de plato y el muestreador Andersen, se determinó que, con  $n=6$  y poblaciones que siguen una distribución normal (de acuerdo a la prueba estadística Anderson-Darling),  $\alpha=0.05$  y un nivel de confianza del 95%, los promedios de las UFC's de verano vs. invierno para la técnica de exposición de platos son distintos estadísticamente y que los promedios de las UFC's de verano para la técnica de exposición de platos vs. los promedios de las UFC's de verano para el muestreador Andersen también son distintos estadísticamente. Sin embargo, no se puede probar que los promedios de las poblaciones de verano vs. invierno para el muestreador Andersen sean estadísticamente distintos. Tampoco hay evidencia suficiente para probar estadísticamente que los promedios de las poblaciones de invierno para la técnica de exposición de platos vs. los promedios de las poblaciones de invierno para el muestreador Andersen sean distintos (Tabla 2, Figura 15 y Apéndice 1).

Durante cada muestreo realizado en el área de depósito de basura, se midieron algunas variables ambientales (Tabla 3). En verano, se observó que la velocidad del viento ( $R^2 = 0.98$ ), la temperatura del suelo ( $R^2 = 0.78$ ) y la humedad del suelo ( $R^2 = 0.56$ ) se correlacionaron significativamente con el número de UFC's recuperadas mediante la técnica de exposición de plato, en una relación donde la concentración de esporas recuperadas disminuyó al aumentar la humedad del suelo. Sin embargo, la concentración de esporas viables fue mayor al aumentar la velocidad del viento y la temperatura del suelo (Figuras 16 - 18). En invierno, se determinó que la velocidad del aire y la humedad relativa se correlacionaron significativamente con la concentración de esporas recuperadas también por la técnica de exposición de plato. Al aumentar la humedad relativa, disminuyó la

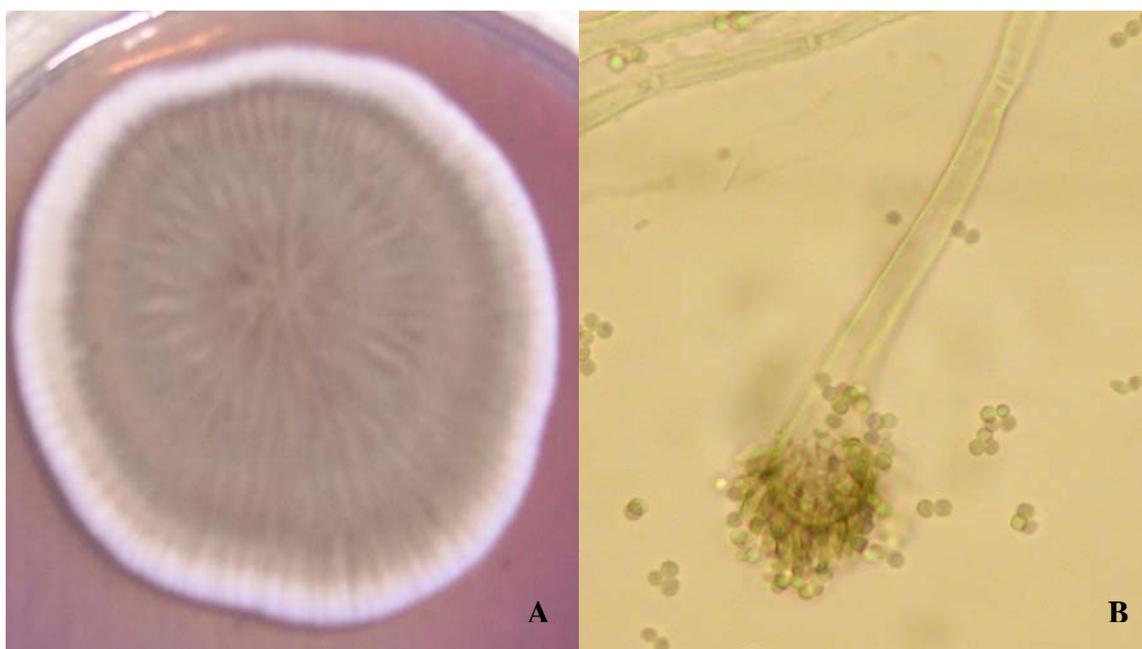
concentración de esporas y por el contrario, a mayor velocidad del viento, mayor fue la concentración de esporas recuperadas (Figuras 16 y 20). No se observó correlación significativa entre el número de esporas viables (UFC's) y las demás variables atmosféricas medidas (Figuras 22 - 25). Tampoco se encontró correlación significativa entre las variables atmosféricas y el número de esporas viables obtenidas utilizando el muestreador Andersen en ninguna de las dos épocas.

Asumiendo que la relación entre la concentración de esporas viables recuperadas y la humedad (relativa y del suelo) pudiera no ser una relación lineal, se analizaron los datos en una relación polinómica de grado 4. Se observó correlación significativa entre la concentración de esporas viables recuperadas y la humedad (relativa y del suelo) en verano e invierno en ambas técnicas de recuperación (Figuras 19 y 21).

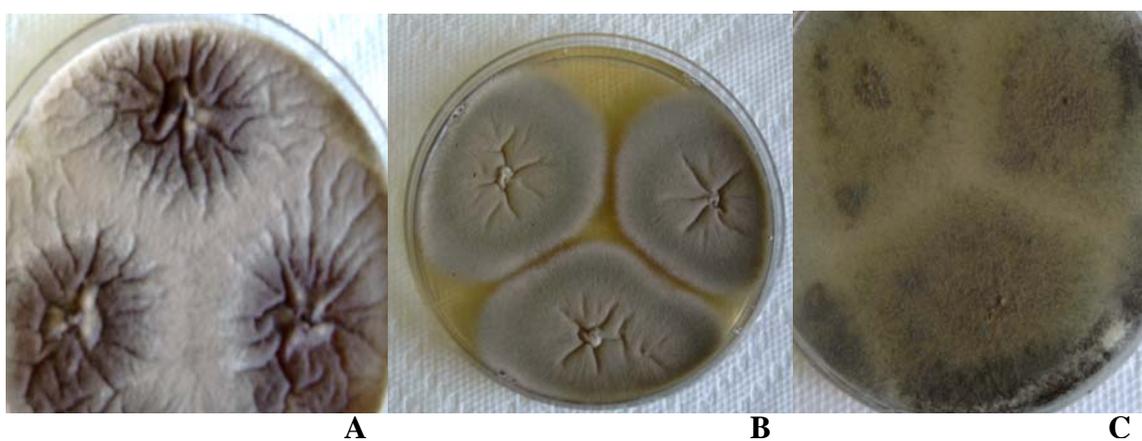
Al calcular el porcentaje de esporas viables recuperadas mediante el muestreador Andersen, se determinó que el número de esporas recuperadas en la segunda etapa fue mayor, o sea, fue mayor la fracción de esporas que pueden ser respirables, cuyo tamaño es de aproximadamente 0.4 mm (Tabla 4). Además, las concentraciones máximas de UFC's por volumen de aire se observaron en julio de 2003 (Tabla 5).

Tabla 1. Especies de hongos encontradas mediante la técnica de exposición de platos y el muestreador Andersen

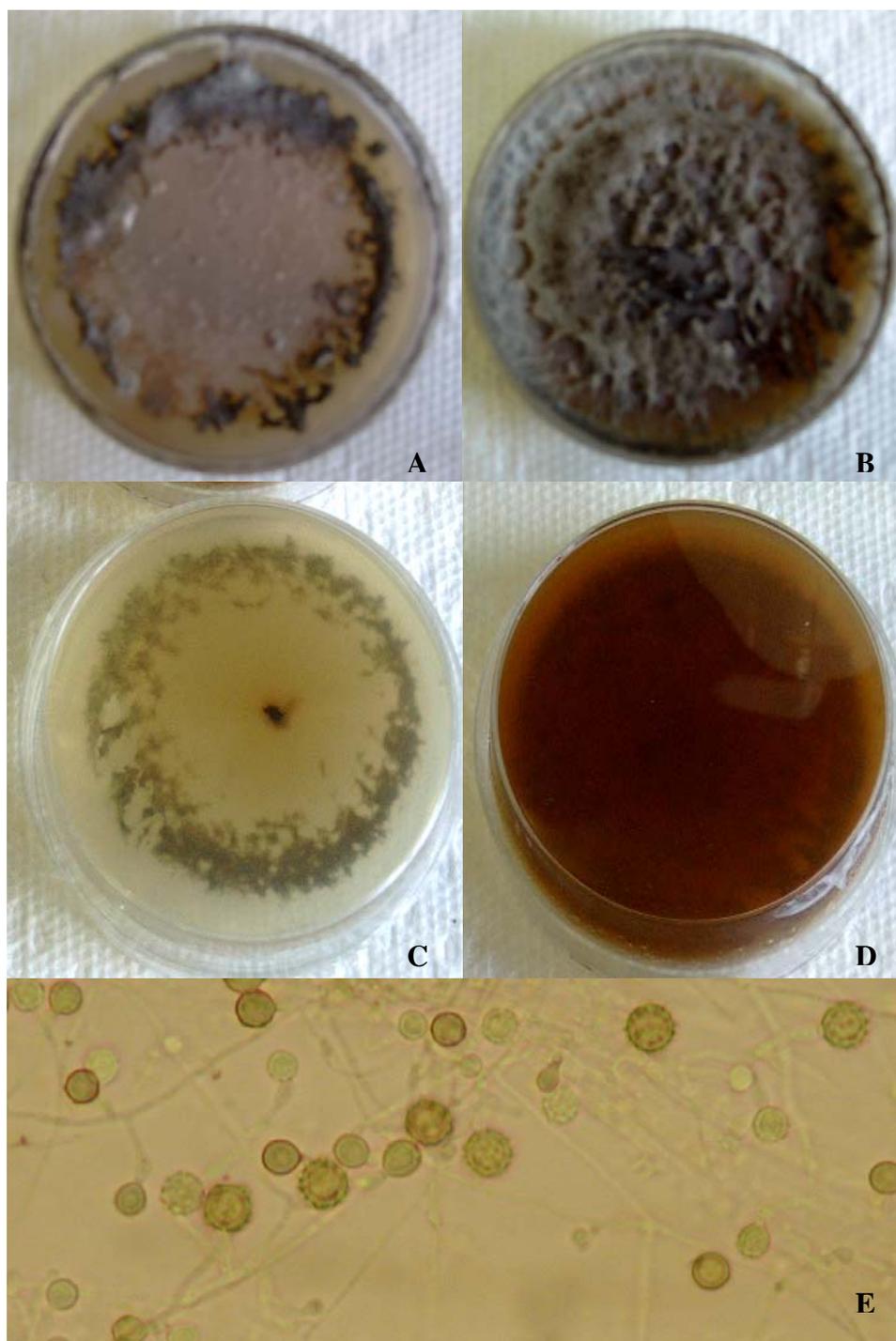
Especies recuperadas	Mes de recuperación												%recuperación verano		%recuperación invierno	
	jun	jul	ago	dic	ene	feb	x	x	x	x	x	x	Exp. de plato Andersen	61%	80%	Exp. de plato Andersen
<i>Aspergillus fumigatus</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	64%	61%	80%	100%
<i>Humicola laruginosa</i>	x	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	34%	33%	0%	0%
<i>Rhizomucor pusillus</i>	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2%	0%	0%	0%
<i>Chrysosporium tropicum</i>	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%	6%	0%	0%
<i>Aspergillus candidus</i>	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	0%	0%	20%	0%



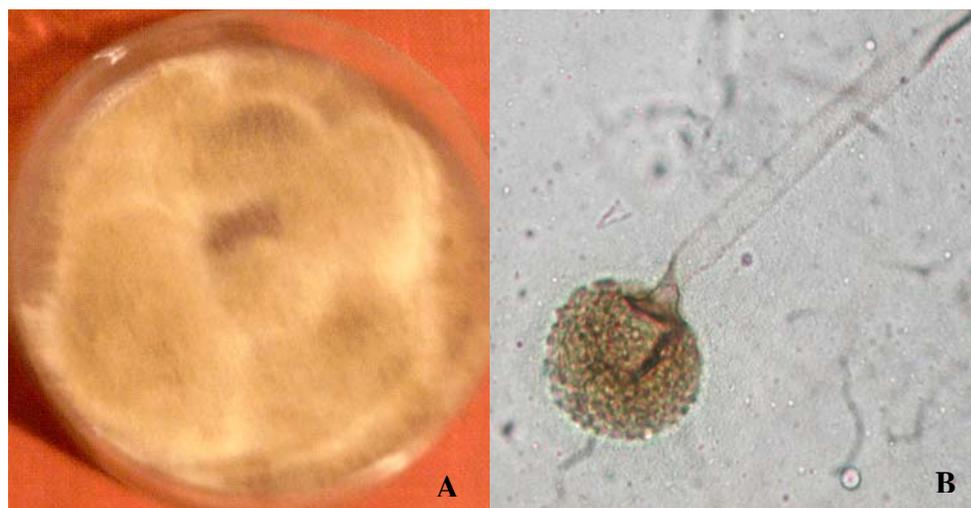
**Figura 6.** Morfología de la colonia de *Aspergillus fumigatus* en Littman's Oxgall (A) y microscopía de luz de *A. fumigatus* (400 X) (B) (Fotografías tomadas por Yanitza Padilla, 2004).



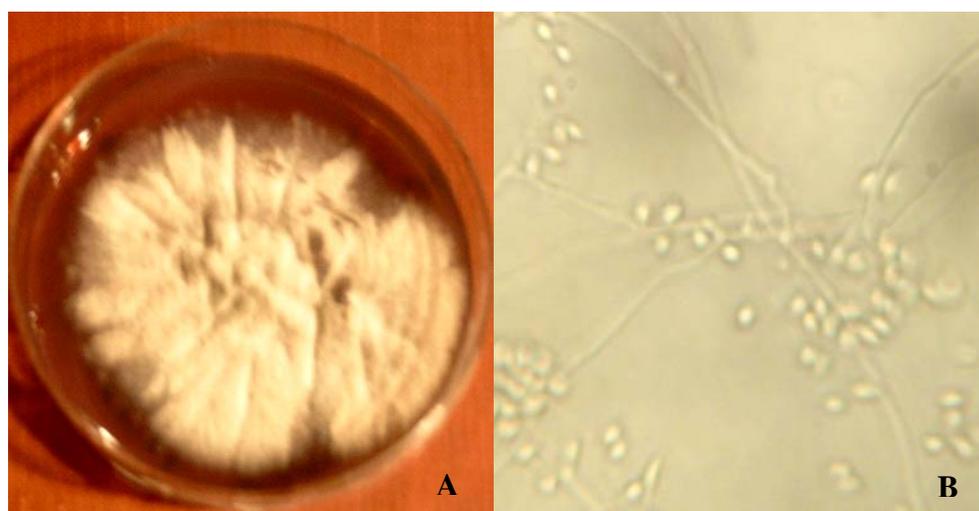
**Figura 7.** Morfología de la colonia de *Aspergillus fumigatus* en diferentes medios de cultivo utilizados para su identificación; *Czapek Yeast Agar* (A), *25% Glycerol Nitrate Agar* (B) y *Malt Extract Agar* (C) (Fotografías tomadas por Yanitza Padilla, 2004).



**Figura 8.** *Humicola lanuginosa* en PDA. Morfología del anverso de una colonia joven (A) y una colonia madura (B); morfología del reverso de una colonia joven (C) y una colonia madura (D); microscopía de luz de *H. lanuginosa* (400 X) mostrando micelio y esporas (E) (Fotos tomadas por Yanitza Padilla, 2004).



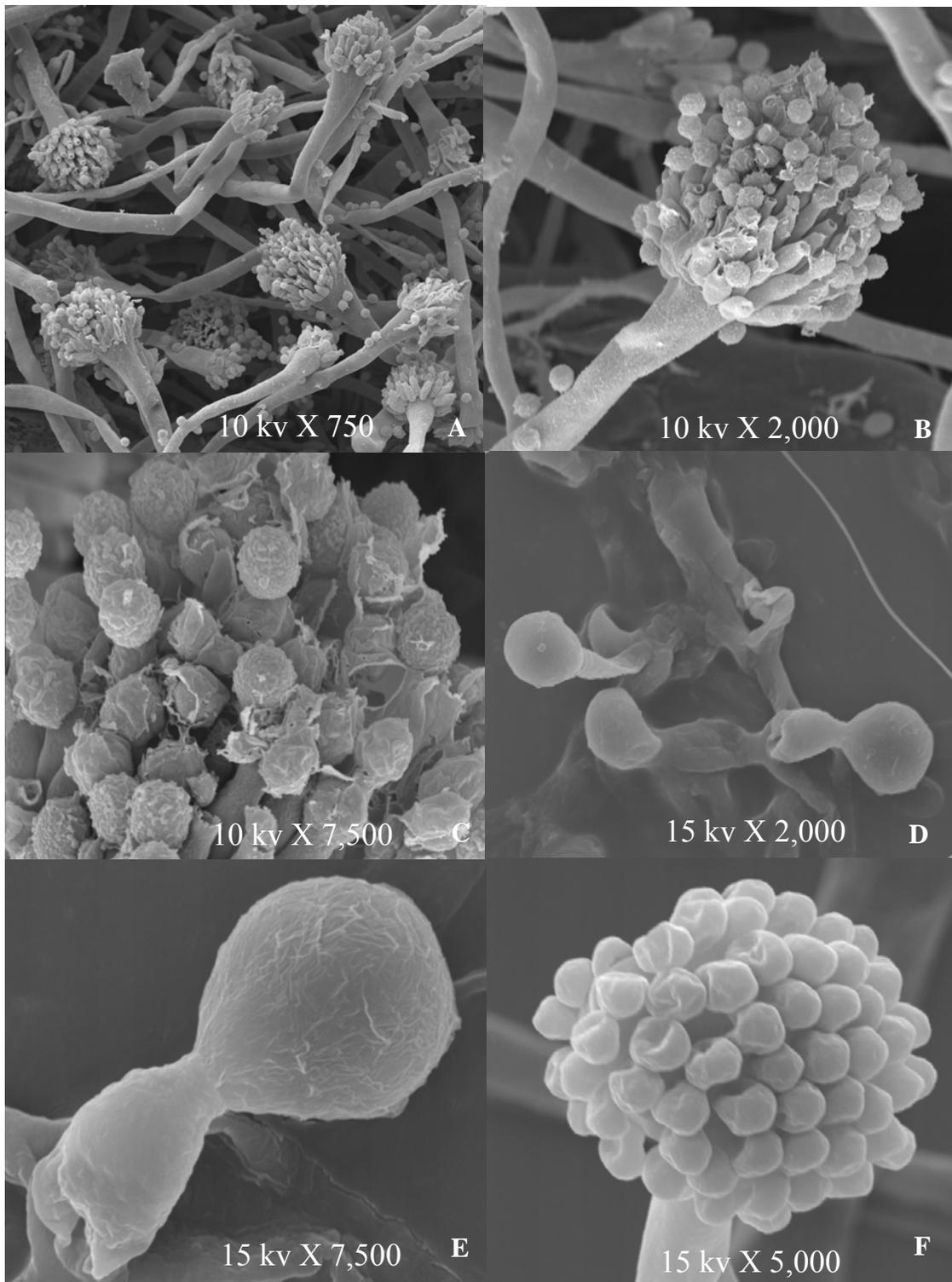
**Figura 9.** Morfología de la colonia de *Rhizomucor pusillus* en PDA (A) y microscopía de luz de *R. pusillus* (400 X) (B) (Fotos tomadas por Yanitza Padilla, 2004).



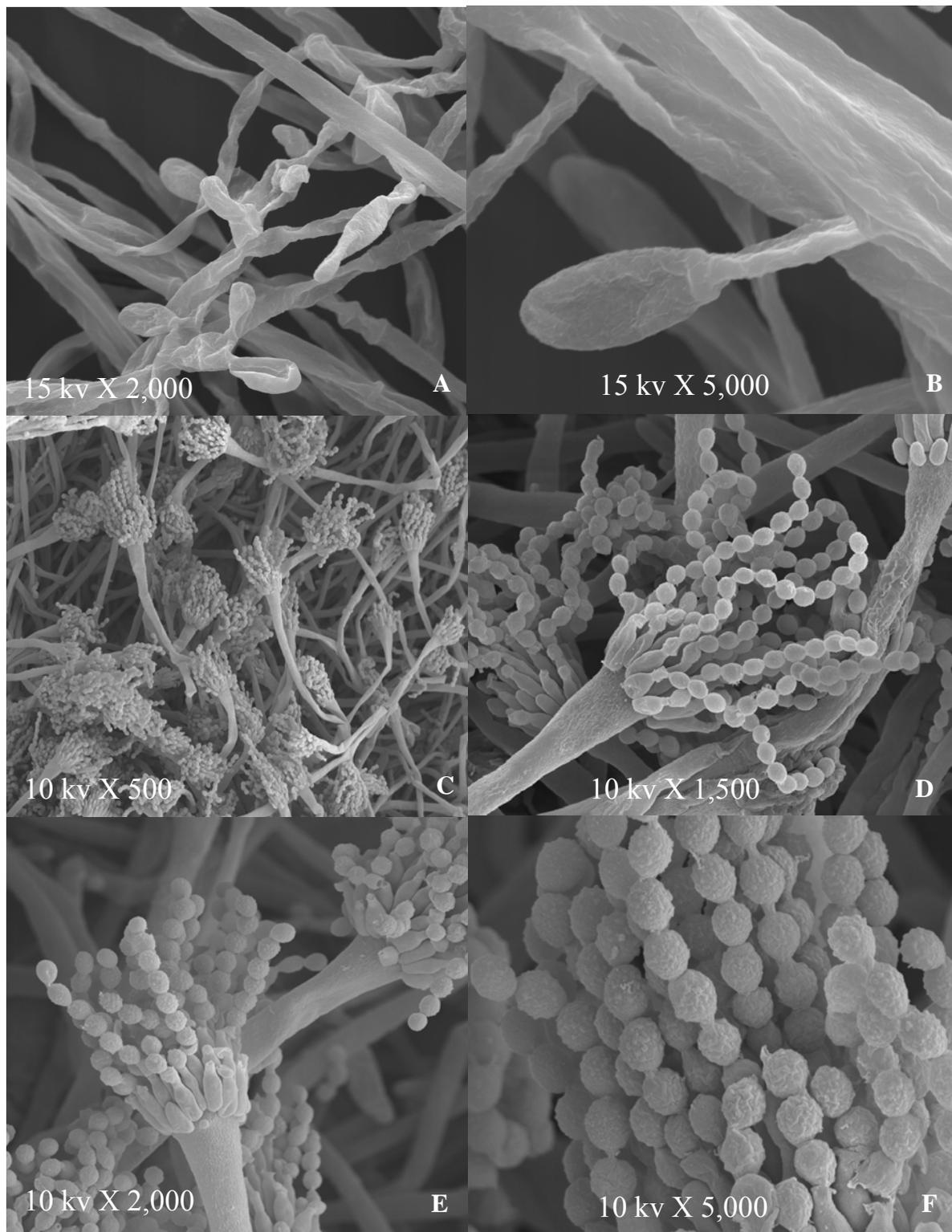
**Figura 10.** Morfología de la colonia de *Chrysosporium tropicum* en Littman's Oxgall (A) y microscopía de luz de *C. tropicum* (400 X) (B) (Fotos tomadas por Yanitza Padilla, 2004).



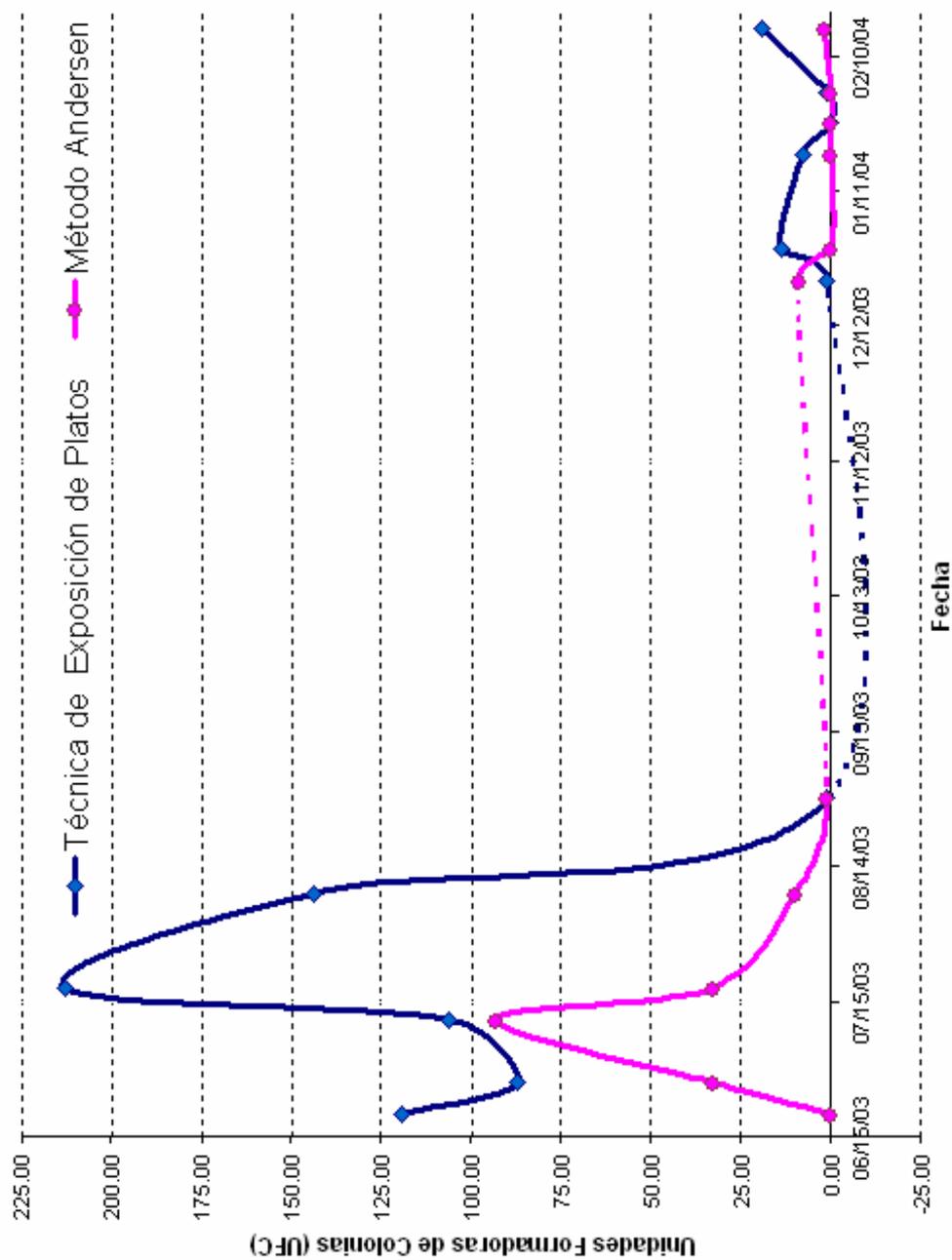
**Figura 11.** Morfología de la colonia de *Aspergillus candidum* en MEA (A) y microscopía de luz de *A. candidum* (400 X) (B) (Fotos tomadas por Yanitza Padilla, 2004).



**Figura 12.** Morfología en microscopía electrónica de rastreo de *Aspergillus fumigatus* (A-C), *Humicola lanuginosa* (D-E) y *Rhizomucor pusillus* (F) ( Fotos tomadas por José Almodóvar y Yanitza Padilla, 2004).



**Figura 13.** Morfología en microscopía electrónica de rastreo de *Chrysosporium tropicum* (A-B) y *Aspergillus candidus* (C-F) (Fotos tomadas por José Almodóvar y Yanitza Padilla, 2004).

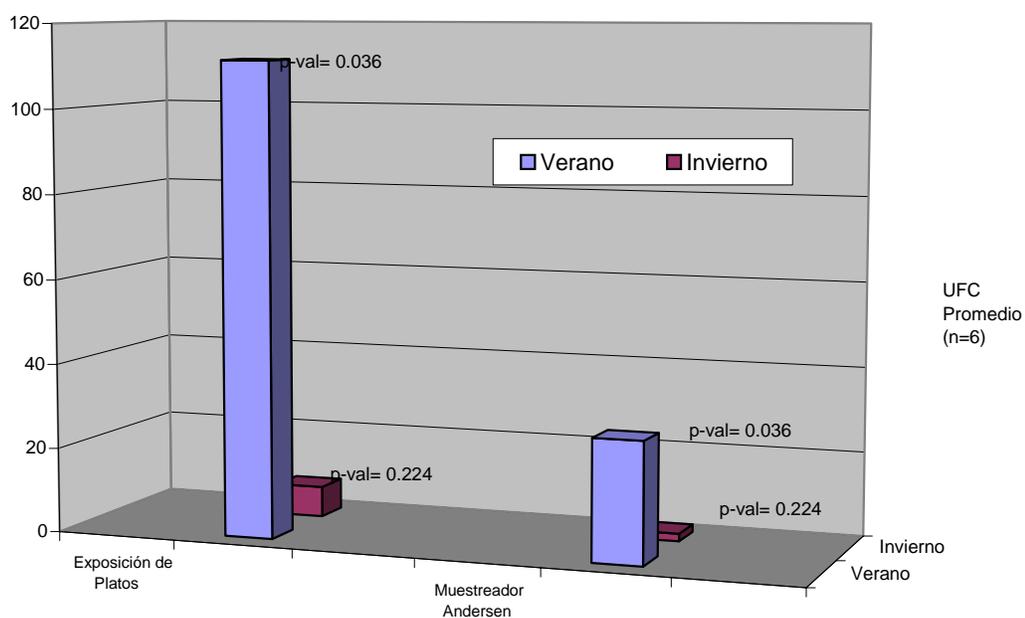


**Figura 14.** UFC's vs. fecha de muestreo

**Tabla 2. Comparación de la concentración de las esporas viables (UFC's) promedio por época y técnica de muestreo**

	Número de Muestras (n)	UFC promedio Exposición de Platos	UFC promedio Muestreador Andersen
Verano	6	111.6 +/- 69.6	28.3 +/- 36.1
Invierno	6	7.2 +/- 7.9	1.8 +/- 3.6
Diferencia	-	104.4	26.5

\* Desviación Estándar (+/-)



**Figura 15.** Prueba  $t$  pareada para la concentración de esporas viables por época de muestreo con  $\alpha = 0.05$

**Tabla 3. Número de UFC's y valor de parámetros ambientales durante los muestreos realizados utilizando la técnica de exposición de platos y el muestreador Andersen**

Epoca	Fecha	*UFC <sup>1</sup>	UFC <sup>2</sup>	T (°C)	HR (%)	*V <sub>viento</sub> (m/s)	Alt (m)	P (hPa)	*T <sub>suelo</sub> (°C)	*H <sub>suelo</sub>	pH
	20/6/03	119	0	35.0	46.5%	5.05	95	1008.3	35.0	20.0%	6.8
	27/06/03	87	33	32.4	48.4%	3.85	95	1008.3	32.5	0.0%	7.2
<b>*Verano</b>	11/07/03	106	93	30.2	55.5%	4.65	94	1008.1	34.0	25.0%	7.3
	18/7/03	213	33	31.5	57.0%	6.85	85	1009.2	40.0	12.5%	7.0
	08/08/03	144	10	30.7	56.0%	5.10	112	1005.9	33.0	0.0%	7.2
	29/08/03	1	1	31.1	63.4%	2.45	112	1006.1	31.0	100.0%	6.0
Epoca	Fecha	**UFC <sup>1</sup>	UFC <sup>2</sup>	T (°C)	**HR (%)	**V <sub>viento</sub> (m/s)	Alt (m)	P (hPa)	T <sub>suelo</sub> (°C)	H <sub>suelo</sub>	pH
	22/12/03	1	9	29.5	55.0%	3.25	102	1007.2	28.0	56.0%	7.2
	29/12/03	14	0	26.1	51.8%	3.90	130	1004.0	24.0	80.0%	7.0
<b>**Invierno</b>	19/1/04	8	0	34.0	51.0%	2.10	114	1005.8	28.0	25.0%	6.8
	26/1/04	0	0	24.8	64.5%	1.10	82	1009.5	24.0	80.0%	7.5
	02/02/04	1	0	30.3	58.5%	2.70	103	1007.0	36.0	100.0%	7.2
	16/2/04	19	2	32.3	47.0%	6.30	81	1009.9	30.0	40.0%	7.5

<sup>1</sup> UFC promedio para los tres platos expuestos mediante la técnica de exposición de platos

<sup>2</sup> UFC promedio para los platos en duplicado utilizando el muestreador Andersen.

\* En verano la relación de UFC<sup>1</sup> vs. V<sub>viento</sub>, T<sub>suelo</sub> y H<sub>suelo</sub> fue de R<sup>2</sup> > 0.5

\*\* En invierno la relación de UFC<sup>1</sup> vs. V<sub>viento</sub> y HR fue de R<sup>2</sup> > 0.5

T = temperatura

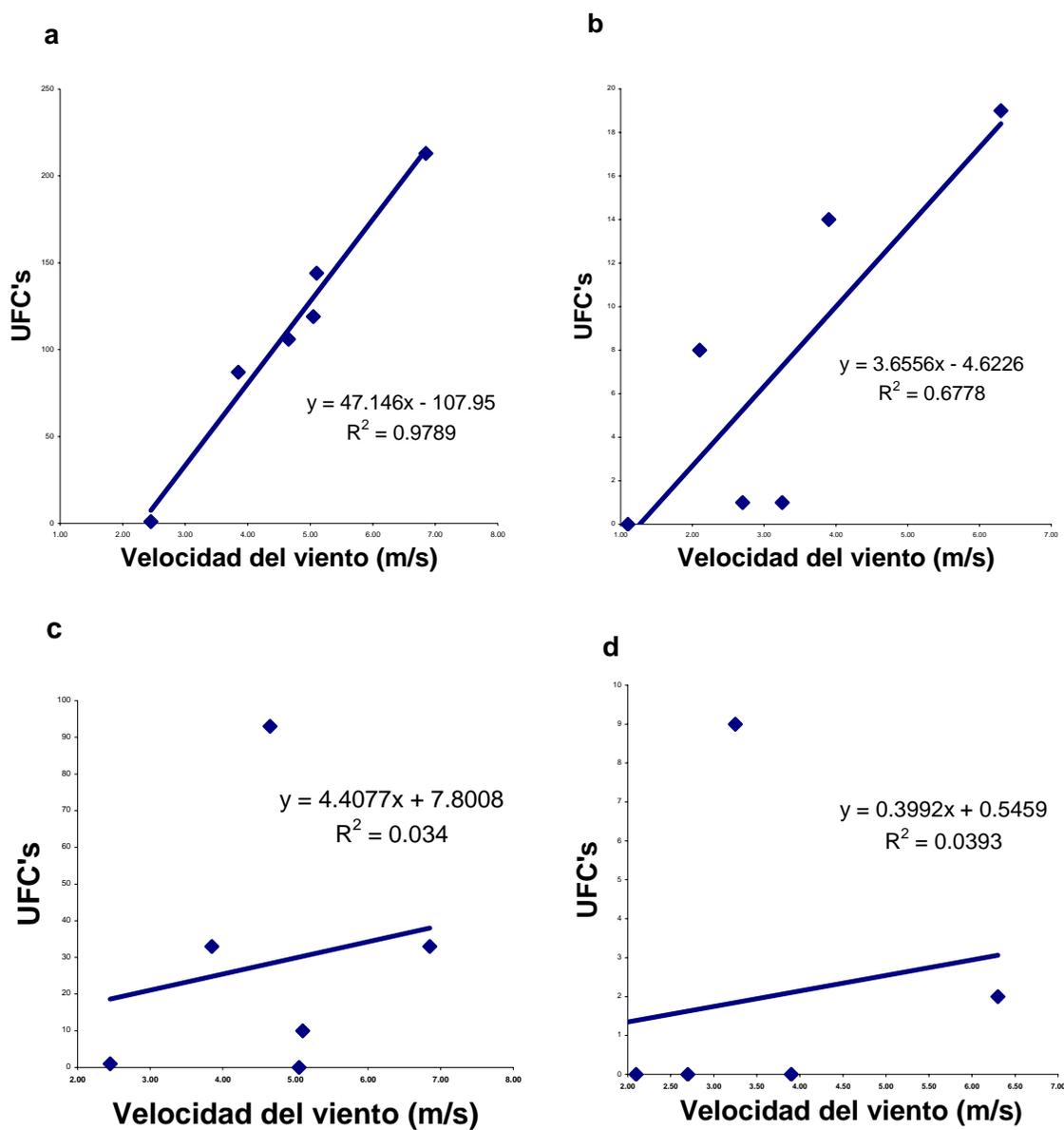
HR = humedad relativa

V = velocidad

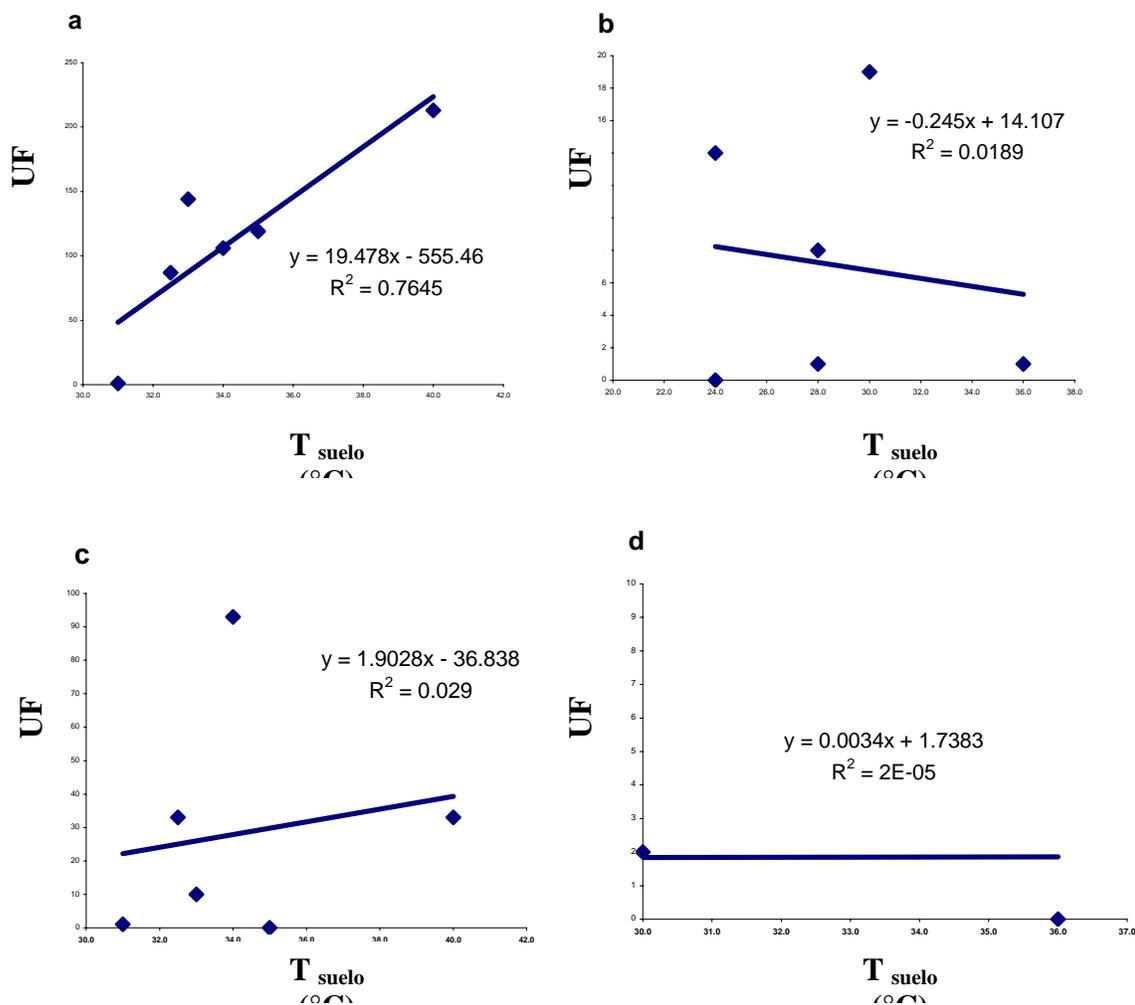
Alt = altitud

P = presión barométrica

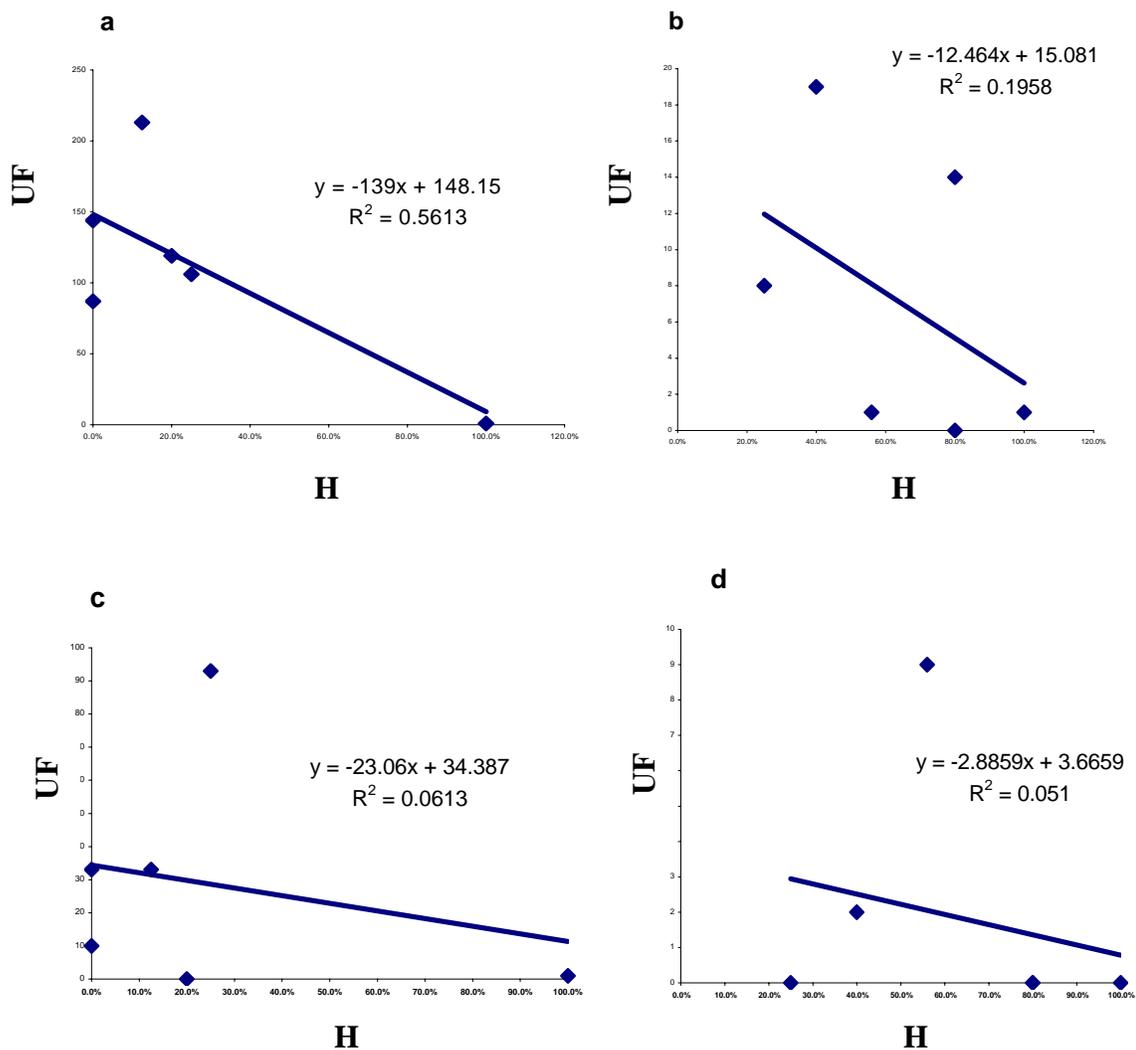
H = humedad



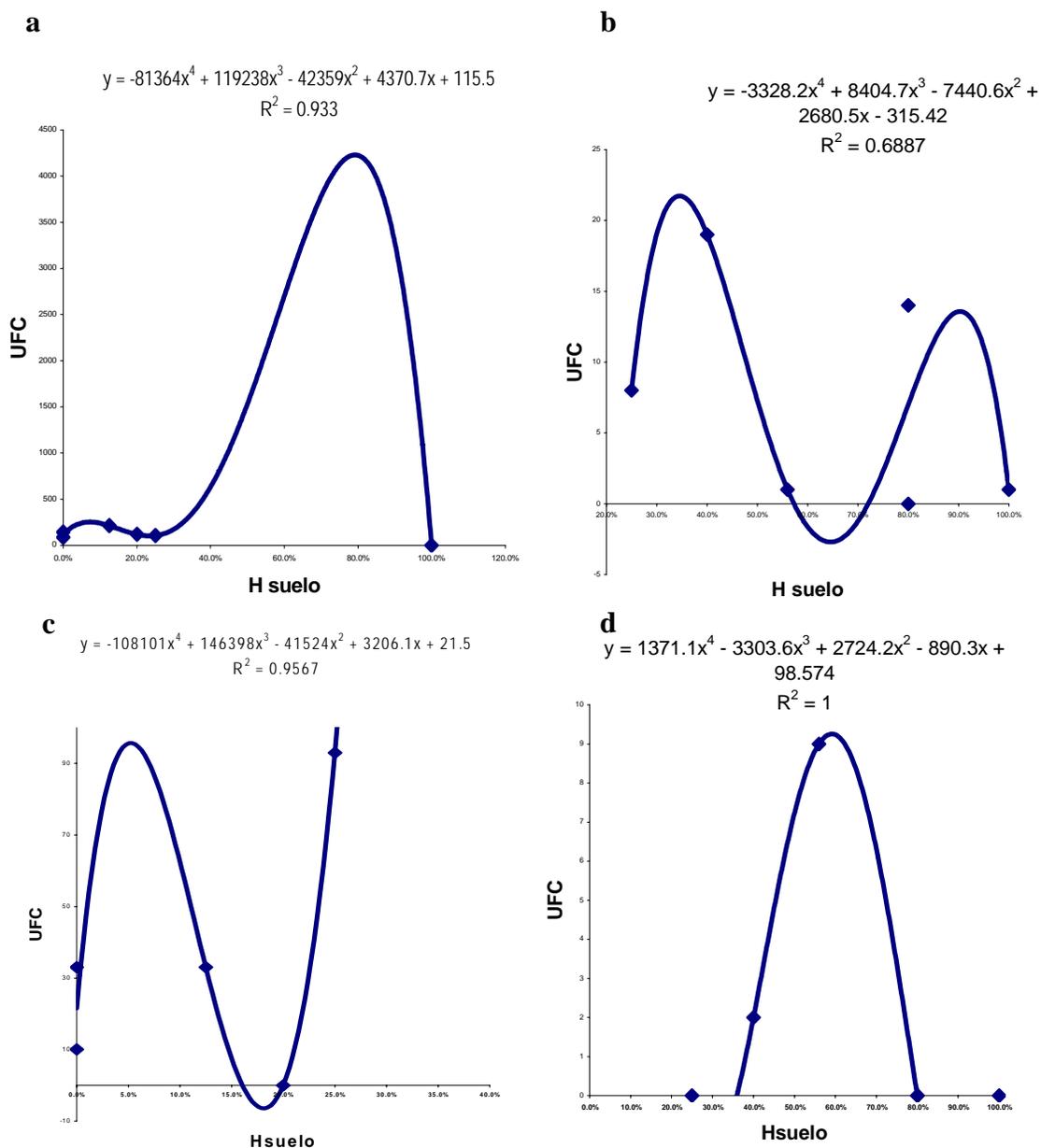
**Figura 16.** UFC's vs. velocidad del viento. *De izquierda a derecha: a)* utilizando técnica de exposición de plato en verano, *b)* utilizando técnica de exposición de plato en invierno, *c)* utilizando el muestreador Andersen en verano y *d)* utilizando el muestreador Andersen en invierno.



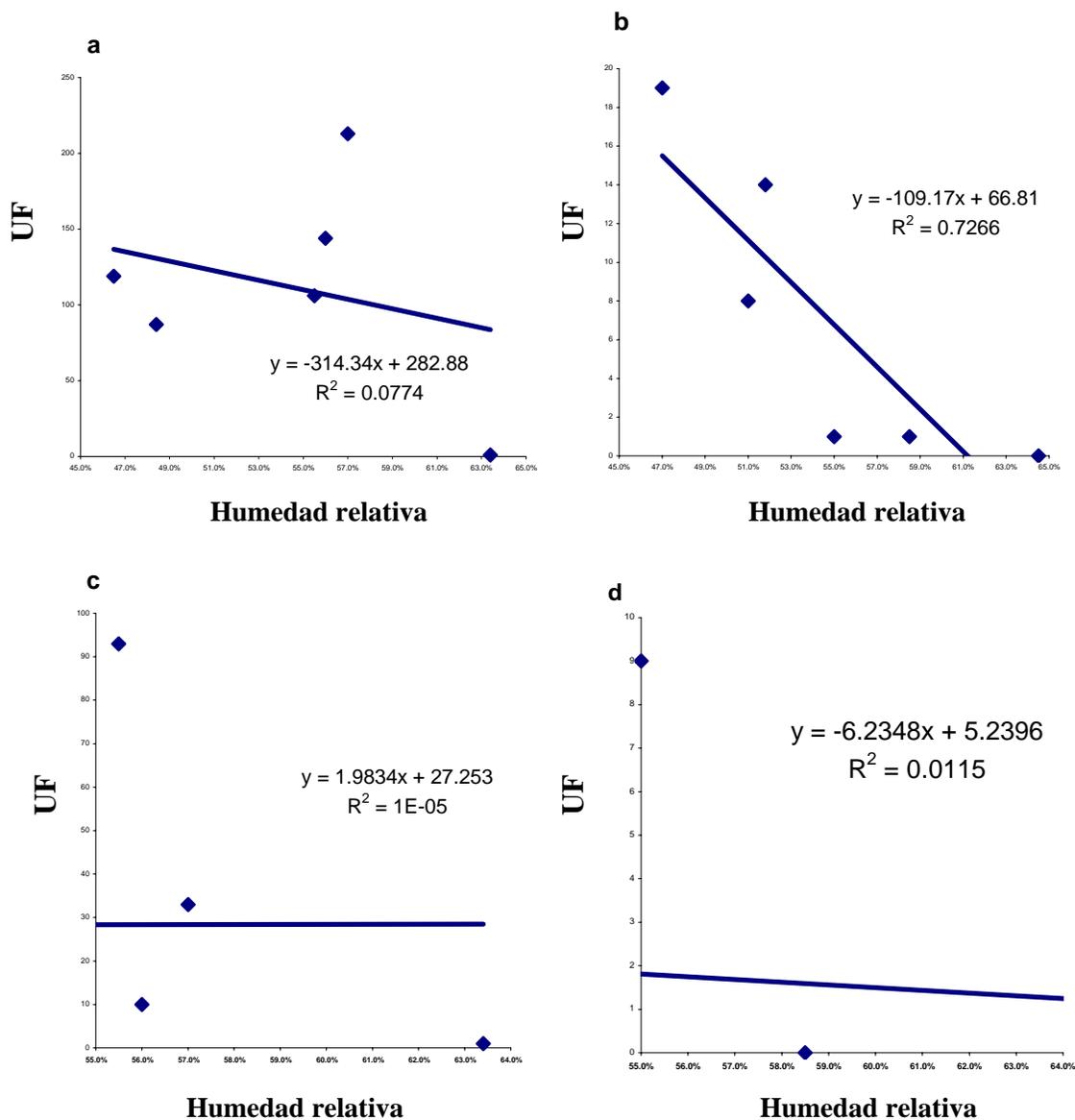
**Figura 17.** UFC's vs. temperatura del suelo. *De izquierda a derecha:* **a)** utilizando técnica de exposición de plato en verano, **b)** utilizando técnica de exposición de plato en invierno, **c)** utilizando el muestreador Andersen en verano y **d)** utilizando el muestreador Andersen en invierno.



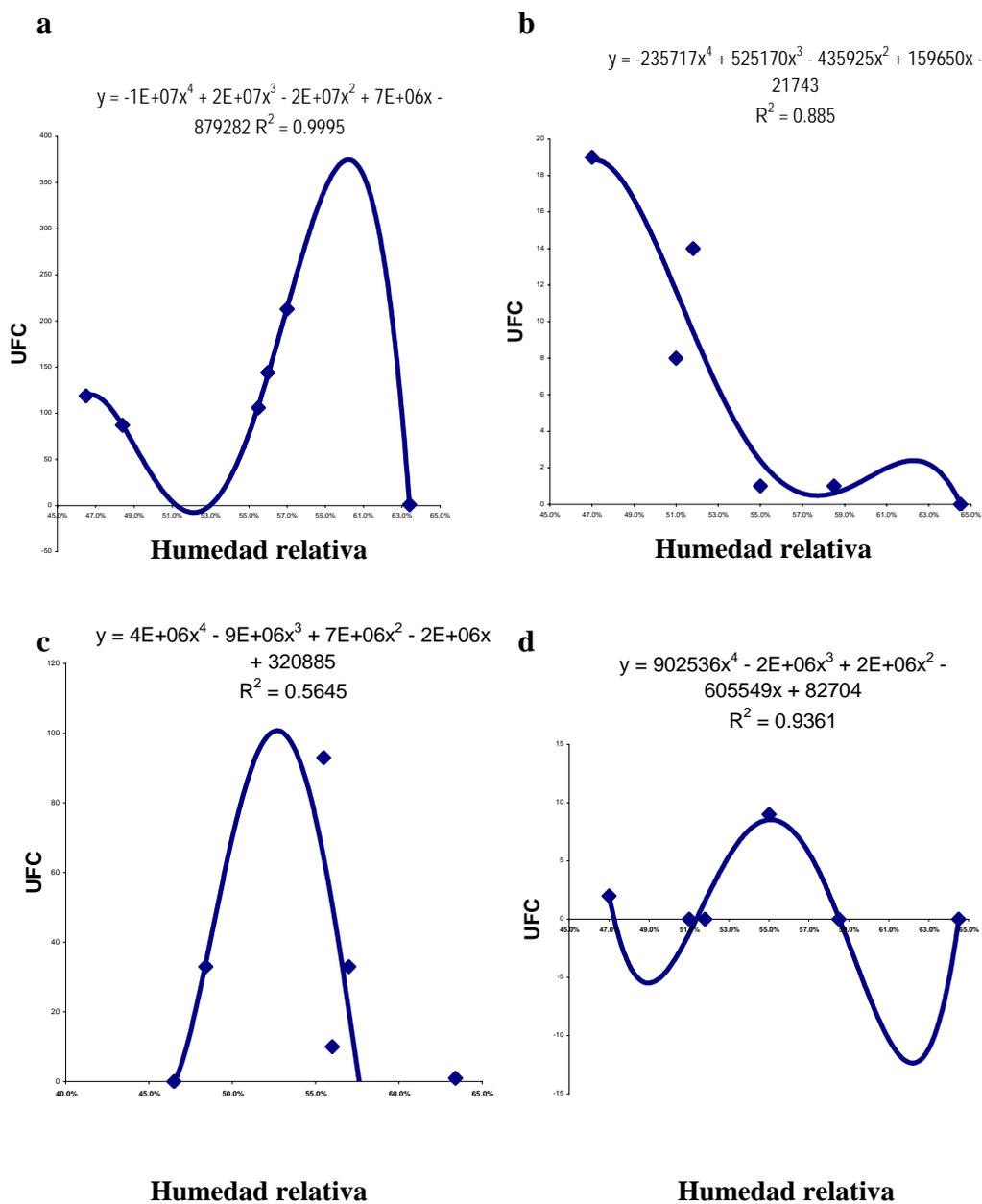
**Figura 18.** UFC's vs. humedad del suelo. *De izquierda a derecha:* **a)** utilizando técnica de exposición de plato en verano, **b)** utilizando técnica de exposición de plato en invierno, **c)** utilizando el muestreador Andersen en verano y **d)** utilizando el muestreador Andersen en invierno.



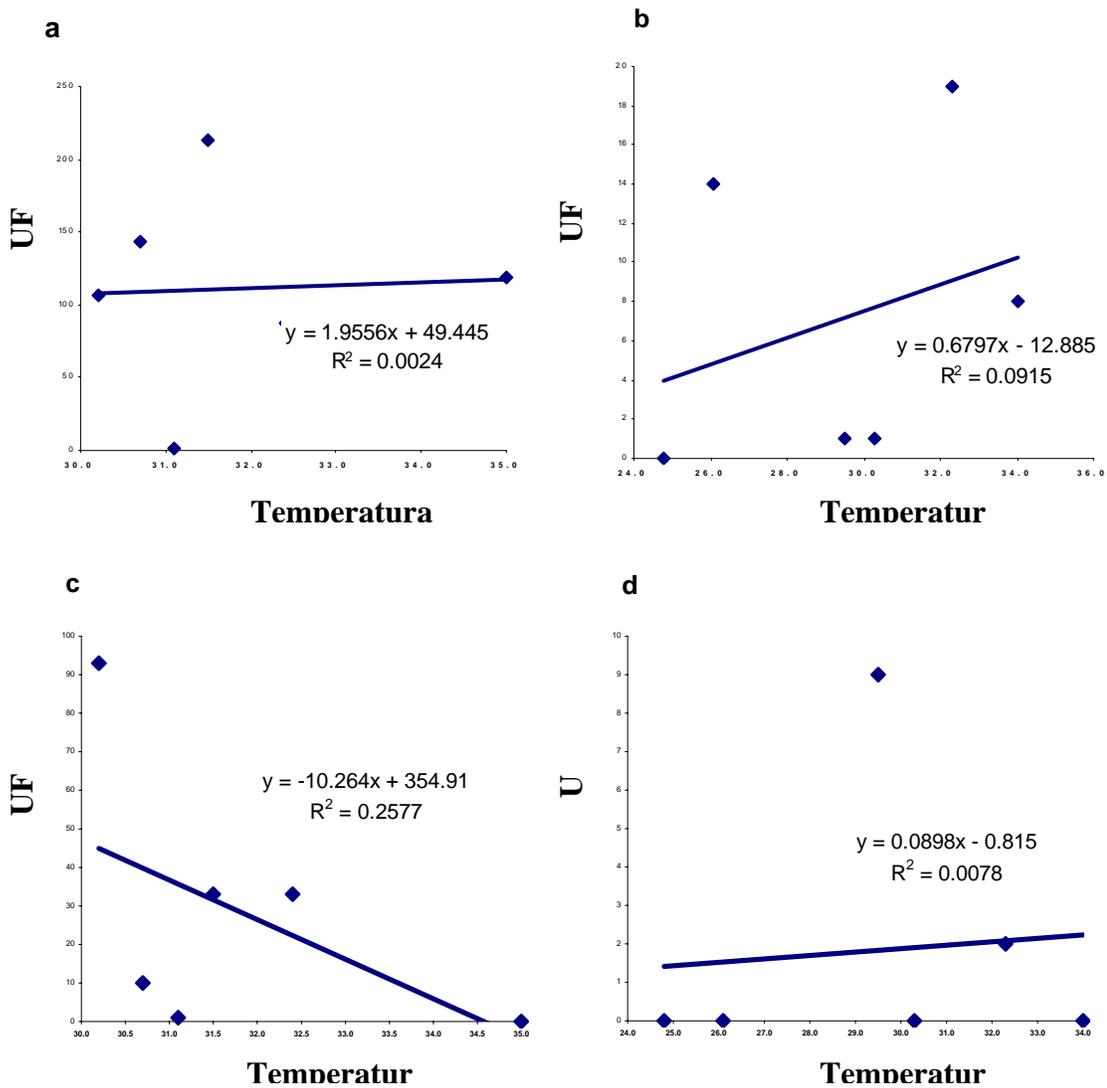
**Figura 19.** UFC's vs. humedad del suelo en relación polinómica de grado 4. *De izquierda a derecha:* **a)** utilizando técnica de exposición de plato en verano, **b)** utilizando técnica de exposición de plato en invierno, **c)** utilizando el muestreador Andersen en verano y **d)** utilizando el muestreador Andersen en invierno.



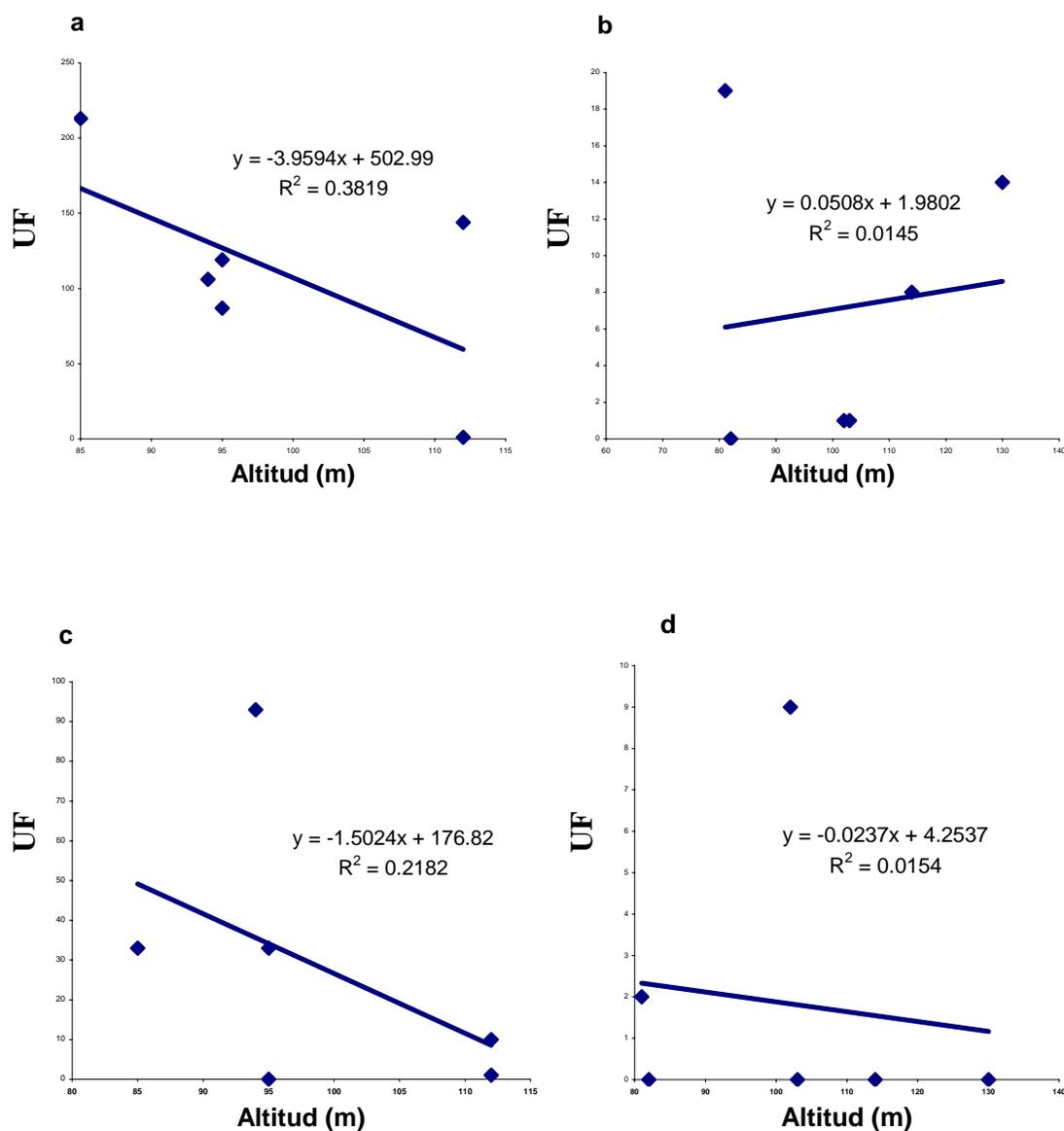
**Figura 20.** UFC's vs. humedad relativa. *De izquierda a derecha:* **a)** utilizando técnica de exposición de plato en verano, **b)** utilizando técnica de exposición de plato en invierno, **c)** utilizando el muestreador Andersen en verano y **d)** utilizando el muestreador Andersen en invierno.



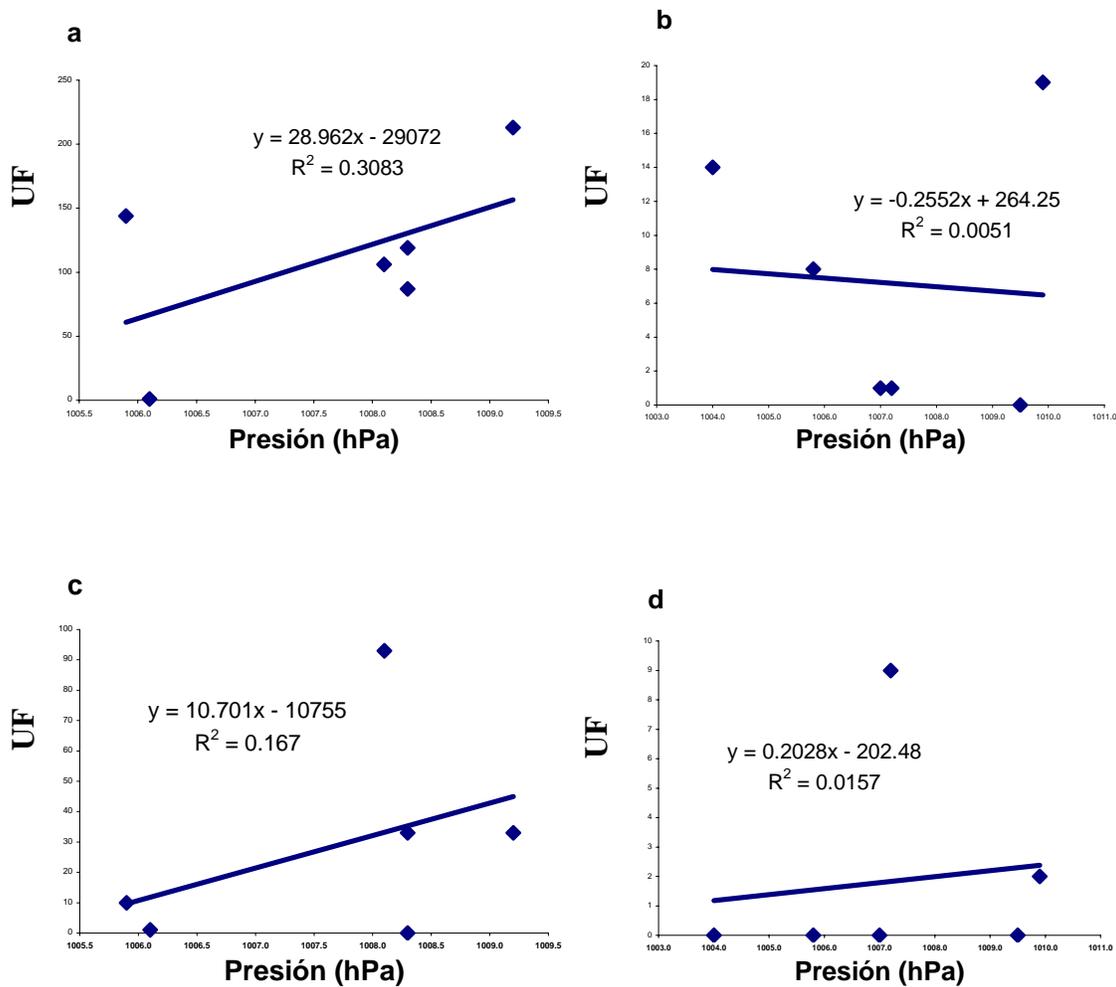
**Figura 21.** UFC's vs. humedad relativa en relación polinómica de grado 4. *De izquierda a derecha:* **a)** utilizando técnica de exposición de plato en verano, **b)** utilizando técnica de exposición de plato en invierno, **c)** utilizando el muestreador Andersen en verano y **d)** utilizando el muestreador Andersen en invierno.



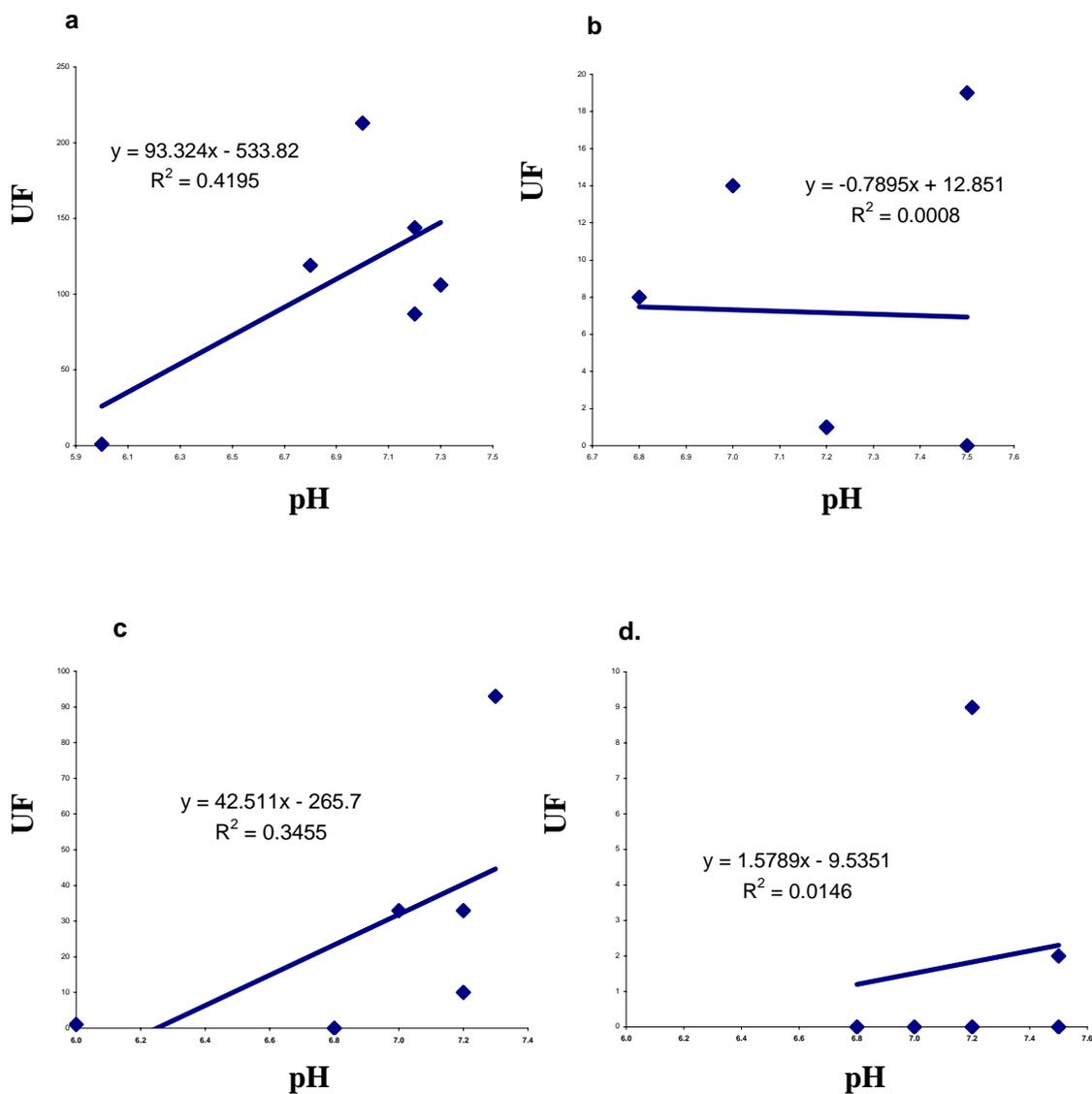
**Figura 22.** UFC's vs. temperatura del ambiente. *De izquierda a derecha:* **a)** utilizando técnica de exposición de plato en verano, **b)** utilizando técnica de exposición de plato en invierno, **c)** utilizando el muestreador Andersen en verano y **d)** utilizando el muestreador Andersen en invierno.



**Figura 23.** UFC's vs. altitud. De izquierda a derecha: **a)** utilizando técnica de exposición de plato en verano, **b)** utilizando técnica de exposición de plato en invierno, **c)** utilizando el muestreador Andersen en verano y **d)** utilizando el muestreador Andersen en invierno.



**Figura 24.** UFC's vs. presión barométrica. *De izquierda a derecha: a)* utilizando técnica de exposición de plato en verano, *b)* utilizando técnica de exposición de plato en invierno, *c)* utilizando el muestreador Andersen en verano y *d)* utilizando el muestreador Andersen en invierno.



**Figura 25.** UFC's vs. pH del suelo. *De izquierda a derecha:* **a)** utilizando técnica de exposición de plato en verano, **b)** utilizando técnica de exposición de plato en invierno, **c)** utilizando el muestreador Andersen en verano y **d)** utilizando el muestreador Andersen en invierno.

**Tabla 4. Por ciento de esporas viables recuperadas en cada etapa utilizando el muestreador Andersen**

<b>Epoca</b>	<b>Fecha</b>	<b>Etapa 1</b>	<b>Etapa 2</b>
<b>Verano</b>	20/6/03	0%	0%
	27/06/03	13%	87%
	11/07/03	20%	80%
	18/7/03	13%	87%
	08/08/03	23%	77%
	29/08/03	0%	100%
	22/12/03	13%	87%
<b>Invierno</b>	29/12/03	0%	0%
	19/1/04	0%	0%
	26/1/04	0%	0%
	02/02/04	0%	0%
	16/2/04	25%	75%

**Tabla 5. Número de esporas viables totales por unidad de aire recuperadas utilizando el muestreador Andersen**

<b>Epoca</b>	<b>Fecha</b>	<b>UFC/pe<sup>3</sup><sub>aire</sub></b>	<b>UFC/ m<sup>3</sup><sub>aire</sub></b>
<b>Verano</b>	20/6/03	0.0	0.0
	27/06/03	8.3	292.9
	11/07/03	31.0	1094.3
	18/7/03	11.0	388.3
	08/08/03	3.3	116.5
	29/08/03	0.3	11.7
<b>Invierno</b>	22/12/03	3.0	105.9
	29/12/03	0.0	0.0
	19/1/04	0.0	0.0
	26/1/04	0.0	0.0
	02/02/04	0.0	0.0
	16/2/04	0.7	23.3

## DISCUSIÓN

En este estudio, se recuperaron hongos miceliales termotolerantes y termofílicos del área de depósito de basura en el vertedero de Lajas, Puerto Rico. *Aspergillus fumigatus* fue la especie más frecuentemente recuperada y representó aproximadamente el 60 % del total de UFC's recuperadas en verano y aproximadamente el 80 % del total de UFC's recuperadas en invierno mediante la técnica de exposición de plato. En nuestro estudio, se observó una mayor concentración de este hongo termotolerante en verano, pero también se detectó su presencia en invierno. Esto nos sugiere que este hongo está presente durante todo el proceso del compostaje.

Esto coincide con resultados obtenidos por otros investigadores en estudios similares hechos al proceso del compostaje alrededor del mundo. Von Klopotek (1962) determinó que *A. fumigatus* representaba el 70 % de la micoflora presente en la composta llevando a cabo descomposición termofílica. Fergus (1964) también reportó la abundancia de *A. fumigatus* a temperaturas mayores de 50 °C en compostas hechas para la producción de hongos, sin embargo, a 55 °C, aunque las esporas germinaban, sólo observó un ligero crecimiento micelial. En estudios hechos a vertederos y desperdicios municipales sin procesar, esta especie se reportó como la especie más frecuente asociada a la composta (Kane y Mullins, 1973; Kirivanta *et al.*, 1999). *Aspergillus fumigatus* está descrito como una especie termotolerante de amplia distribución mundial que puede crecer entre 12 °C y 55 °C (Cooney y Emerson, 1964).

*Humicola lanuginosa* (sinónimo de *Thermomyces lanuginosus*, Tsiklinsky 1899 ) es un hongo termofílico, con crecimiento óptimo entre 47.5 – 52.5 °C, recuperado en la

época de verano. Esta especie también ha sido asociada al proceso del compostaje en estudios previos (Kane y Mullins, 1973; Kirivanta *et al.*, 1999) y es comúnmente recuperada en estudios hechos a hongos termofílicos alrededor de todo el mundo (Cooney y Emerson, 1964).

*Rhizomucor pusillus* se recuperó en muestras tomadas por exposición de plato durante el mes de junio del 2003. Esta especie se caracteriza por ser termofílica y de distribución mundial y crece entre 20 – 55 °C. Este cigomiceto es uno de los primeros colonizadores en la composta (Domsch *et al.*, 1980).

*Aspergillus candidus* se recuperó en época de invierno, en el mes de diciembre. Según Domsch *et al.*, (1980), esta especie tiene una temperatura óptima de crecimiento entre 25 – 28 °C, y crece a una temperatura máxima de 44 °C. *Aspergillus candidus* se distribuye principalmente en regiones subtropicales y tropicales, y ha sido reportado por algunos investigadores como contaminante común en el polvo orgánico. Se ha descrito como una especie que se desarrolla sobre materia vegetal en descomposición y se ha recuperado de granos, harinas, heno y de la composta (Krysinska-Traczyk y Dutkiewicz, 2000). En estudios hechos por Fischer *et al.*, (2000) en una facilidad de manejo de desperdicios se reportó la presencia de *A. candidus* como una especie termotolerante. Por otro lado, Swan y Crook (1998) reportaron la presencia de *A. candidus* a temperaturas máximas de 50 °C.

*Chrysosporium tropicum* se recuperó utilizando el muestreador Andersen en el mes de julio del 2003. Algunas especies de *Chrysosporium* se caracterizan por ser termotolerantes y saprófitos del suelo (Domsch *et al.*, 1980).

En términos generales, se encontró un mayor número de esporas viables en la época de verano con ambas técnicas de recuperación. Esto coincide con estudios publicados por Jones y Cookson (1983), quienes utilizaron un muestreador Andersen en las cercanías de una facilidad de composta en los alrededores de Washington, D.C. Estos encontraron que la concentración de partículas viables de bacterias, hongos termofílicos y *A. fumigatus* era mayor en verano y otoño y menor en los meses de invierno. Según ellos, esto nos sugiere que la diferencia entre épocas del año demuestran que se debe ser precavido al interpretar información de bioarsoles o microorganismos de diferentes periodos de tiempo, aún cuando se recuperen utilizando el mismo método experimental.

Luego de realizar un análisis estadístico de regresión lineal para relacionar las variables atmosféricas medidas durante el estudio y la concentración de UFC's obtenidas, se observó que la temperatura del suelo, la humedad del suelo y la velocidad del viento están significativamente correlacionadas con el número de esporas viables recuperadas utilizando la técnica de exposición de plato durante la época de verano. A temperaturas de suelo más altas, mayor fue el número obtenido de esporas viables. Cabe señalar que los hongos recuperados son especies termotolerantes y termofílicas que habitan en el suelo, y por lo tanto, altas temperaturas en el sustrato promueven su ocurrencia. Un aumento considerable en la temperatura del suelo puede tener como consecuencia la eliminación de algunos hongos mesofílicos y la proliferación de hongos termotolerantes y termofílicos. Esto nos sugiere que un suelo caliente y sin competencia por parte de otros hongos es el sustrato ideal para un hongo termotolerante o termofílico.

La concentración de esporas recuperadas disminuyó al aumentar la humedad del suelo. Además, la concentración de esporas viables fue mayor cuando la velocidad del

viento aumentó. Este último resultado se relaciona con el proceso de dispersión de las esporas en los hongos. El viento es uno de los métodos de dispersión principales en muchos hongos. Las esporas de hongos que se encuentran en el suelo son arrastradas por la corriente de aire y a altas temperaturas tienen el potencial de subir a la baja atmósfera y ser transportadas hasta ser depositadas posteriormente en diversos sustratos. Sería lógico pensar entonces que a mayor velocidad del viento, un mayor número de esporas se dispersan mediante este método y, por tal razón, es mayor la concentración de esporas en el aire al momento de muestrear.

La temperatura del suelo, la humedad del suelo y la velocidad del viento son variables atmosféricas que pueden estar relacionadas con las estaciones del año. En verano se obtuvieron medidas de temperatura del suelo y medidas de velocidad del viento mayores y la concentración de esporas viables obtenidas también fue mayor. En verano se reportaron medidas de humedad del suelo más bajas. Esto nos sugiere que la presencia y el crecimiento de un organismo no depende de o se relaciona con una variable en particular, sino que puede ser el efecto de un conjunto de variables.

Los datos obtenidos en el análisis de regresión lineal para la época de invierno son más complejos. Aunque se determinó que la velocidad del viento y la humedad relativa se correlacionan significativamente con la concentración de esporas recuperadas por la técnica de exposición de plato, hay que tener en cuenta que las UFC's recuperadas en invierno fueron mínimas y que cualquier cambio en las variables meteorológicas podría sugerir un efecto en las esporas viables. El análisis sugiere que al aumentar la humedad relativa, disminuye la concentración de esporas y que, por el contrario, a mayor velocidad del viento, mayor concentración de esporas.

Si asumimos que la relación entre la humedad relativa y del suelo vs. las UFC's no es una relación lineal, sino una polinómica de grado 4, observamos que existe una correlación significativa entre humedad relativa y del suelo vs. la UFC's en las dos épocas muestreadas (verano e invierno) mediante la técnica de exposición de plato y mediante el muestreador Andersen. Esto nos sugiere que la concentración de esporas puede aumentar al aumentar la humedad, pero que, sin embargo, condiciones de humedad muy extremas pueden traer como consecuencia una disminución en la concentración de esporas viables. Las condiciones extremas de humedad pueden estar relacionadas con eventos de lluvia que pueden eliminar gran parte de la concentración de esporas en el aire.

Por otro lado, no se encontró relación significativa entre las demás variables atmosféricas y el número de esporas viables obtenidas. El pH del suelo se mantuvo entre 6 y 7.5. El valor obtenido de esta variable ambiental podría ser un factor que promueve el crecimiento de hongos, si tomamos en consideración que el pH óptimo que promueve la actividad de hongos es entre 5.5 y 8.5.

Se calculó el porcentaje de esporas viables recuperadas en cada etapa (1 y 2) con el muestreador Andersen para cada muestreo y se determinó que la fracción de esporas que pueden ser respirables fue mayor. La fracción de esporas que pueden penetrar el tracto respiratorio del ser humano representó desde un 75 % hasta un 100 % de la recuperación total de esporas obtenidas con el muestreador Andersen en algunos muestreos. Esta información puede ser alarmante, si se considera que la inhalación de las esporas de *A. fumigatus* es la ruta más común de exposición en el ser humano. Los resultados obtenidos coinciden con Jones y Cookson (1983), quienes reportaron que *A. fumigatus* representaba

un 95 % de la fracción de organismos potencialmente respirables luego de utilizar el muestreador tipo Andersen en un estudio realizado en las cercanías de Washington, D.C.

La concentración máxima de UFC's por volumen de aire se observó en julio, con una concentración mayor de  $10^3$  UFC /m<sup>3</sup>. Estos niveles de concentración no son niveles aprobados por la ASIEAC (1995), que reportó que niveles mayores de 1,000 UFC/m<sup>3</sup> no eran aceptables, y Godish (2001) que argumentó que concentraciones mayores de 1,000 UFC/m<sup>3</sup> y mayores de 10,000 esporas/ m<sup>3</sup> indicaban contaminación (Wonder Makers Environmental Inc., 2001). Esto contrasta con lo reportado por Holmerg (1987), quien argumentó que niveles menores de 2,200 UFC/m<sup>3</sup> representan un ambiente libre de contaminación.

En este estudio se utilizaron dos técnicas de recuperación de esporas viables, la técnica de exposición de plato y el muestreador Andersen, con el propósito de comparar los resultados obtenidos y establecer posibles diferencias. Se observó que la concentración de esporas viables recuperadas mediante la técnica de exposición de plato en las dos épocas estudiadas fue mayor y que en verano el número promedio de esporas recuperadas mediante la técnica de exposición de platos fue significativamente distinto al número promedio de esporas recuperadas mediante el muestreador Andersen. Una posible explicación a esto podría ser que, en la técnica de exposición de plato el área de deposición para la recuperación de esporas (100 mm en cada plato) es más grande que el diámetro del orificio del cabezal (aproximadamente 30 mm) en el muestreador Andersen. Otra posible explicación es que en el muestreador Andersen el volumen de aire que entra al instrumento está regulado (28.3 litros/min), mientras que en la técnica de exposición de plato no se puede controlar el volumen de aire.

## CONCLUSIONES

Por primera vez en Puerto Rico, se estudió la presencia de hongos miceliales termotolerantes y termofílicos en un vertedero. Hasta el momento este es el único estudio de este tipo en Puerto Rico realizado con el propósito de cuantificar e identificar los hongos termotolerantes y termofílicos asociados al proceso del compostaje y correlacionar su concentración con las variables ambientales. En este estudio se concluye que :

1. *Aspergillus fumigatus* fue el hongo más frecuente, al igual que en estudios previos realizados por otros investigadores (Von Klopotek, 1962; Kane y Mullins, 1973; Kirivanta *et al.*, 1999).
2. La concentración de esporas viables fue mayor en la época de verano.
3. Existe una correlación significativa entre las variables ambientales de temperatura del suelo, humedad del suelo y velocidad del viento y la concentración de esporas viables recuperadas utilizando la técnica de exposición de plato.
4. La fracción de esporas viables respirables recuperadas utilizando el muestreador Andersen fue considerablemente mayor que la fracción de esporas no respirables.
5. *Aspergillus fumigatus* puede representar un riesgo para la salud de los trabajadores del vertedero, si no se siguen medidas de seguridad adecuadas durante el manejo de desperdicios en un vertedero.

## **RECOMENDACIONES**

Luego de haber finalizado este estudio y analizado los resultados, se recomienda:

1. Realizar un estudio similar de mayor duración para determinar si la distribución de organismos sigue algún patrón temporal (de época).
2. Realizar un estudio en el cual se tomen en consideración las diferentes etapas que involucra el proceso de disposición de desperdicios, desde el almacenaje de basura en las residencias hasta la recolección y el transporte de basura hacia el vertedero.
3. Mejorar las condiciones de trabajo en los vertederos, supervisando que las medidas de seguridad se lleven a cabo y haciendo compulsorio el uso de mascarillas en el área de depósito de basura en el vertedero, así como el uso de un uniforme de trabajo que no se debe llevar al hogar.
4. Designar un periodo de espera antes de pasar al área de depósito de basura, luego de una descarga.

## LITERATURA CITADA

- Austwick, P. K. C. 1963. Ecology of *Aspergillus fumigatus* and the pathogenic phycomycetes, pp. 644-651. En N. E. Gibbons (ed.), Recent progress in microbiology. University of Toronto Press, Toronto.
- Boutin, P. y J. Moline. 1987. Health and safety aspects of compost preparation and use, pp. 198-209. En: De Bertoldi, M., M. P. Ferranti, P. L'Hermite y F. Zucchini (eds.), Compost: Production, Quality and Use. Elsevier Applied Science for Commission of the European Communities, The Hague, Netherlands.
- Burge, W. D. y P. D. Millner. 1980. Health aspects of composting, pp. 245-264. En: G. Bitton, B. L. Damron, G. T. Edds y J. M. Davidson (eds.), Sludge-health risks of land application. Ann Arbor Science, Ann Arbor, Michigan, USA.
- Chang, Y. y H. J. Hudson. 1967. The fungi of wheat straw compost. Ecological studies. Trans. Br. Mycol. Soc. 50(4): 649-666.
- Clark, C. S., H. S. Bjornson, J. W. Holland, T. L. Hoge, V. A. Majeti y P. S. Gartside. 1980. Occupational hazards associated with sludge handling, pp. 215-244. En: G. Bitton, B. L. Damron, G. T. Edds y J. M. Davidson (eds.), Sludge-health risks of land application. Ann Arbor Science, Ann Arbor, Michigan, USA.
- Clark, C. S., R. Rylander y L. Larson. 1983. Levels of gram-negative bacteria, *Aspergillus fumigatus*, dust and endotoxin at compost plants. Appl. Environ. Microbiol., 45:1501-1505.
- Cooney, D. G. y R. Emerson. 1964. Thermophilic Fungi: An Account of their Biology, Activities, and Classification. W.H. Freeman and Co., San Francisco. 188 pp.
- Crawford, J. H. 1985. Composting of agricultural wastes. Biotechnology Applications and Research. Technomic Publishing Co. U. S. A. pp. 67-77.
- Díaz, L.F., G.M. Savage, L.C. Eggerth, y C.B. Golueke. 1992. Composting and Recycling Municipal Solid Waste. Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 296 pp.
- Domsch, K.H., W. Gams, y T.H. Anderson. 1980. Compendium of soil fungi. Volume 1. Academic Press, London, UK.
- Ellis, D.H. 1997. Zygomycetes, pp. 247-277. En: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9th edition Edward Arnold, London.
- Epstein, E. y J.I. Epstein. 1985. Health risks of composting. Biocycle, 26(4):38-40.

- Epstein, E. 1997. *The Science of Composting*. Technomic Publishing Co. U. S. A. 487 pp.
- Fergus, C. L. 1964. Thermophilic and thermotolerant molds and actinomycetes of mushroom compost during peak heating. *Mycologia*, 56(2): 267-284.
- Fischer, G., T. Muller, R. Schwalbe, R. Ostrowski y W. Dott. 2000. Exposure to airborne fungi, MVOC and mycotoxins in biowaste-handling facilities. *Int. Hyg. Environ. Health*, 203: 97-104.
- Ghio, A. J. y V. L. Roggli. 1995. Mycotoxins and interstitial lung disease. *Chest*, 108: 1185-1186.
- Godish, T. 2001. *Indoor Environmental Quality*. Lewis Publishers: Boca Raton, FL. 536 pp.
- Gotaas, H. B. 1956. *Composting: Sanitary Disposal and Reclamation of Organic Wastes*. World Health Organization, Geneva. 205 pp.
- Holmberg, K. 1987. Indoor mould exposure and health effects. *Indoor Air*, 1:637-645.
- Jain, M. K., K. K. Kapoor y M. M. Mishra. 1979. Cellulase activity, degradation of cellulose and lignin, and humus formation by thermophilic fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 73(1): 85-89.
- Jones, B. L. y J. T. Cookson. 1983. Natural Atmospheric Microbial Conditions in a Typical Suburban Area. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45(3):919-934.
- Kane, B. E. y J. T. Mullins. 1973. Thermophilic fungi in a municipal waste compost system. *Mycologia*. 65(5): 1087-1099.
- Kiviranta, H., A. Tuomainen y J. Liesivuori. 1999. Exposure to airborne microorganisms and volatile organic compounds in different types of waste handling. *Ann. Agric Environ. Med.*, 6:39-44.
- Kramer, M. N., V. P. Karup y J. N. Fink. 1989. Allergic broncopulmonary aspergillosis from a contaminated dump site. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 140:1086-1088.
- Krysinska-Traczyk, E. y J. Dutkiewicz. 2000. *Aspergillus candidus*: A respiratory hazard associated with grain dust. *Ann. Agric Environ. Med.*, 7:101-109.
- Mackenzie, D.W.R. 1988. *Aspergillus* in man, pp. 1-8. En: Bossche, H. V., D.W.R. Mackenzie, and G. Cauwenbergh (Eds.), *Aspergillus* and Aspergillosis. Plenum Press, New York.
- Maritato, M.C., E.R. Algeo, y R.E. Keenan. 1992. *The Aspergillus fumigatus* debate:

- Potential human health concerns. *BioCycle*, 33:70-72.
- Millner, P.D., D.A. Bassett y P.B. Marsh. 1980. Dispersal of *Aspergillus fumigatus* from sewage sludge compost piles subjected to mechanical agitation in open air. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39:1000-1009.
- Millner, P.D., P.B. Marsh, R.B. Snowden y J.F. Parr. 1977. Occurrence of *Aspergillus fumigatus* during composting of sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34(6):765-772.
- Pitt, J. I. 1979. The Genus *Penicillium* and Its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London. 187 pp.
- Poincelot, R. P. 1974. Biochemistry and methodology of composting. Connecticut Agricultural Experimental Station. Bulletin 727. pp. 4-37.
- Raper, K.B. y D.I. Fennel . 1965. The Genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins Co., Baltimore. 686 pp.
- Swan, J. R. M. y B. Crook. 1998. Airborne microorganisms associated with grain handling. *Ann. Agric Environ. Med.*, 5: 7-15.
- Sinski, J.T. 1975. The Epidemiology of Aspergillosis. pp. 25-42. En: Al-Doory, Y. (Ed.), *The Epidemiology of Human Mycotic Diseases*. Charles C. Thomas, Springfield, IL.
- Stutzenberger, F. J., A. J. Kaufman y R. D. Lossing. 1970. Cellulolytic activity in municipal solid waste composting. *Can J. microbial.* 16: 553-560.
- Varese, G. C., V. Prigione y A. Anastasi. 2002. Airborne fungi in compost plants: a neglected environmental and health hazard. University of Turin, Italy. En: *The Proceedings from the 2002 International Symposium: Composting and Compost Utilization*. Ohio, USA.
- Vaughan, L.M. 1993. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Clinic. Pharm.*, 12:24-33.
- Von Klopotek, A. 1962. Über das Vorkommen und Verhalten von Schimmelpilzen bei der Kompostierung städtischer Abfallstoffe. *Antoine van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 28: 141-160.
- Waksman, S. A., W. W. Umbreit y T. C. Cordon. 1939. Thermophilic actinomycetes and fungi in soils and in composts. *Soil Sci.* 47: 37-61.
- Wonder Makers Environmental, Inc. 2001. *Post-Remediation Guidelines*. Information Series, 147: 1-5.

## **APÉNDICE**

**Apéndice 1. Prueba de hipótesis para diferencia de promedios de poblaciones independientes (Prueba de  $t$  pareada) para la concentración de esporas viables recuperadas por época utilizando el muestreador Andersen y la técnica de exposición de plato**

**Paired T-Test**

**Técnica de Exposición de Platos**

Paired T for verano - invierno

	N	Mean	StDev	SE Mean
verano	6	111.7	69.6	28.4
invierno	6	7.2	7.9	3.2
Difference	6	104.5	76.8	31.3

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = 3.33  
P-Value = 0.021

H0: prom1 - prom2 = 0  
Ha: prom1 - prom2 no es igual a 0

alfa = 0.05  
p-val = 0.021  
p-val < alfa, por lo tanto rechazo H0, acepto Ha

**Paired T-Test**

**Muestreador Andersen**

Paired T for verano - invierno

	N	Mean	StDev	SE Mean
verano	6	28.3	35.0	14.3
invierno	6	1.8	3.6	1.5
Difference	6	26.5	36.9	15.1

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = 1.76  
P-Value = 0.139

H0: prom1 - prom2 = 0  
Ha: prom1 - prom2 no es igual a 0

alfa = 0.05  
p-val = 0.139  
p-val > alfa, por lo tanto acepto H0

## Paired T-Test

### Técnica de Exposición de Plato vs. el Muestreador Andersen

Paired T for verano - verano And

	N	Mean	StDev	SE Mean
verano EP	6	111.7	69.6	28.4
verano And	6	28.3	35.0	14.3
Difference	6	83.3	72.0	29.4

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = 2.83  
P-Value = 0.036

H0: prom1 - prom2 = 0  
Ha: prom1 - prom2 no es igual a 0

alfa = 0.05  
p-val = 0.036  
p-val < alfa, por lo tanto rechazo H0, acepto Ha

## Paired T-Test

### Técnica de Exposición de Plato vs. el Muestreador Andersen

Paired T for invierno - invierno And

	N	Mean	StDev	SE Mean
invierno	6	7.17	7.94	3.24
invierno	6	1.83	3.60	1.47
Difference	6	5.33	9.42	3.84

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = 1.39  
P-Value = 0.224

H0: prom1 - prom2 = 0  
Ha: prom1 - prom2 no es igual a 0

alfa = 0.05  
p-val = 0.224  
p-val > alfa, por lo tanto acepto H0