

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE BIOFARMACIA

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE
BACTERIAS HETERÓTROFAS Y PSICROTOLERANTES QUE
COLONIZAN EL MONUMENTO PRINCIPAL DEL COMPLEJO
ARQUEOLÓGICO INGAPIRCA (CAÑAR, ECUADOR)**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE QUÍMICA FARMACEUTA**

AUTORA: ALISSON SAMANTHA TORRES MEDINA

DIRECTORA: LENYS MARGARITA BUELA SALAZAR

CUENCA – ECUADOR

2021

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE BIOFARMACIA

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS
HETERÓTROFAS Y PSICROTOLERANTES QUE COLONIZAN EL
MONUMENTO PRINCIPAL DEL COMPLEJO ARQUEOLÓGICO INGAPIRCA
(CAÑAR, ECUADOR)

**TRABAJO DE TITULACIÓN A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACEUTA**

AUTORA: ALISSON SAMANTHA TORRES MEDINA

DIRECTORA: LENYS MARGARITA BUELA SALAZAR

CUENCA – ECUADOR

2021

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Alisson Samantha Torres Medina portadora de la cédula de ciudadanía N° **0706160355**. Declaro ser la autora de la obra: **“AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS HETERÓTROFAS Y PSICROTOLERANTES QUE COLONIZAN EL MONUMENTO PRINCIPAL DEL COMPLEJO ARQUEOLÓGICO INGAPIRCA (CAÑAR, ECUADOR)”**, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, **22 de septiembre de 2021**



Alisson Samantha Torres Medina

C.I. 0706160355

CERTIFICACIÓN:

Certifico que el presente trabajo de titulación denominado **“AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS HETERÓTROFAS Y PSICROTOLERANTES QUE COLONIZAN EL MONUMENTO PRINCIPAL DEL COMPLEJO ARQUEOLÓGICO INGAPIRCA (CAÑAR, ECUADOR”**, realizado por **TORRES MEDINA ALISSON SAMANTHA**, ha sido revisado y orientado durante su ejecución bajo el asesoramiento permanente de mi persona en calidad de Tutora, por lo que certifico que el presente documento, fue desarrollado siguiendo los parámetros del método científico, se sujeta a las normas éticas de investigación, por lo que está expedito para su sustentación.

Cuenca, **22 de septiembre de 2021**



Lic. Lenys Margarita Buela Salazar

DEDICATORIA.

A Dios, mi familia y especialmente a mis padres porque fueron quienes me apoyaron, guiaron y acompañaron en mi constante proceso de formación académica. Su amor incondicional me inspira cada día a dedicarme y hacer los esfuerzos necesarios para ser una mejor hija, hermana, estudiante, compañera y humana. Les agradezco también porque siempre me inculcaron valores éticos y un profundo amor a Dios, que sin lugar a duda me sirvió de mucho durante mi formación.

AGRADECIMIENTOS:

A cada uno de los docentes que participaron en este proceso de formación académica; de cada uno me llevo aprendizajes que, a más de ser enseñanzas académicas, también fueron consejos e historias que gratifican y vuelven mucho más valioso todo el tiempo impartido.

A los tutores y guías de mi tesis, por tomarme en cuenta en este proyecto de investigación, además, mi gratitud por siempre mantenerse atentos de la evolución del proyecto. A su vez agradezco su tiempo y disposición para transmitirme su experiencia investigativa, conocimientos, consejos y destrezas en la aplicación de técnicas, métodos y prácticas de laboratorio. Todo eso permitió grandes resultados en la tesis y una fructífera experiencia.

RESUMEN

El paso del tiempo afecta negativamente a los monumentos arqueológicos a nivel mundial. Entre estos monumentos destaca el Complejo Arqueológico Ingapirca, cuyo deterioro es evidente. Los responsables del deterioro pueden ser los agentes físicos (condiciones ambientales) o biológicos. En estos últimos se encuentran los microorganismos que causan deterioro como resultado de su metabolismo (biodeterioro).

Hasta la fecha se conoce prácticamente nada acerca de los agentes y procesos microbianos que participan en el deterioro del CAI. Por ello, el objetivo de esta investigación es aislar, caracterizar e identificar algunas bacterias cultivables presentes en las rocas del CAI. Para lograrlo se implementó un diseño de tipo mixto, observacional y experimental, para lo cual se tomaron muestras de la superficie de las rocas, se inocularon medios de cultivo, se aislaron las bacterias heterótrofas capaces de multiplicarse a bajas temperaturas (psicrófilas o psicrotolerantes), se caracterizaron sus propiedades fenotípicas y fisiológicas bacterianas (color, tamaño, forma, clasificación, capacidad de psicrotolerancia y disolución de minerales poco solubles), y finalmente se identificaron mediante técnicas de biología molecular.

Los resultados muestran que los aislados bacterianos poseen variedad de caracteres fenotípicos, mostraron capacidad de tolerar el frío (psicrotolerancia), ya que nueve de las diez cepas bacterianas son capaces de crecer en temperaturas bajas, medias y altas. Y tres de las doce tienen la capacidad de disolver minerales poco solubles (biolixiviación).

Mediante la aplicación de métodos moleculares, fuimos capaces de identificar de manera preliminar a estos aislados. Esta información que fue contrastada con la publicada en las bases de datos científicas.

Palabras clave: Biodeterioro, psicrotolerancia, biolixiviación, fenotípicas, cladograma.

ABSTRACT

Time affects negatively archaeological monuments worldwide. Among these monuments, the Ingapirca Archaeological Complex (CAI) stands out, which deterioration is evident. The causes for deterioration can be physical (environmental conditions) or biological agents. Within biological agents, it is included microorganisms that provokes deterioration as a result of their metabolism (biodeterioration). To date, virtually nothing is known about the microbial agents and processes involved in CAI deterioration. Therefore, the objective of this research is to isolate, characterize and identify some cultivable bacteria present in CAI rocks. To achieve this, it was implemented a mixed observational and experimental, samples were taken from the surface of the rocks, it was inoculated cultivation means, it was isolated heterotrophic bacteria capable of multiplying at low temperatures (psychrophilic or psychrotolerant), it was characterized their bacterial phenotypic and physiological properties (color, size, shape, classification, capacity for psychrotolerance and dissolution of poorly soluble minerals), and finally they were identified using molecular biology techniques. The results show that the bacterial isolates possess a variety of phenotypic characters, such as the ability to tolerate cold (psychrotolerance), since nine of the ten bacterial strains are able to grow in low, medium and high temperatures. And three of the twelve ones have the ability to dissolve poorly soluble minerals (bioleaching). By applying molecular methods, it was able to preliminarily identify these isolates. This information was contrasted with published data in scientific databases.

Keywords: Biodeterioration, psicrotolerance, bioleaching, phenotypes, cladogram.

ÍNDICE

DEDICATORIA.

AGRADECIMIENTOS:

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.	4
Situación problemática:	4
I.2.- JUSTIFICACIÓN	6
Significado o importancia de la solución del problema	6
Aporte:	7
Beneficios:	8
I.2.1.- PREGUNTA CIENTÍFICA:	8
I.2.2.- HIPOTESIS:	8
I.3.- OBJETIVOS	9
I.3.1.-Objetivo General:	9
I.3.2.-Objetivos Específicos:	9
I.4.- MARCO TEÓRICO	9
I.4.1.- Antecedentes:	9
I.4.2.- Marco referencial	12
1.4.3.- Biodeterioro	12
Agentes causales del biodeterioro	13
Hongos	13
Líquenes	15
Bacterias	15
Bacterias nitrificantes	16

Actinomicetos	17
Cianobacterias	17
Bacterias oxidantes de azufre	18
Biopelículas	19
Microorganismos heterótrofos	20
Psicrotolerancia microbiana	20
II.2.- Población y muestra.	24
Técnicas e instrumentos:	26
II.5.1.- Procedimientos estadísticos y análisis de datos	31
Discusión	43
IV.1.- CONCLUSIONES	49
IV.2.- RECOMENDACIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXOS	60
ANEXOS REQUERIDOS	89

I. INTRODUCCIÓN

Los monumentos arqueológicos culturales son la herencia cultural más antigua del mundo. Representan los modos de vida, organización, arquitectura y costumbres de distintas culturas a lo largo del mundo. Mantener las condiciones propias de los monumentos es el trabajo que muchas instituciones llevan adelante; sin embargo, factores externos como la humedad, el viento, las precipitaciones (lluvias, granizo), los insectos y la colonización microbiana, hacen que las estructuras de los monumentos arqueológicos presenten cambios indeseados: Estos cambios se manifiestan como biopelículas, manchas, pigmentos en las paredes y meteorización de las rocas (1,2).

Todos estos cambios indeseados están relacionados con la colonización de las rocas por organismos como hongos, bacterias y líquenes, muchos de los cuales secretan ácidos orgánicos que reaccionan directa o indirectamente con los elementos químicos de las rocas. Esto modifica sus propiedades y resulta en compuestos químicos solubles que desencadenan los procesos de biodeterioro de los monumentos arqueológicos (3).

Las investigaciones realizadas en otros monumentos arqueológicos del mundo indican los daños causados por microorganismos, los posibles tratamientos para mejorar sus condiciones y la identificación de microorganismos que revisten las superficies arqueológicas. Pero la enorme mayoría de estos estudios han sido realizados en zonas húmedas y cálidas (tropicales), generalmente a baja altitud, donde las condiciones ambientales propician el crecimiento microbiano. Por lo tanto, hay un enorme vacío sobre el conocimiento de biodeterioro de los monumentos que se encuentran en zonas más frías y a mayores alturas. Por ello en la presente tesis se pretende caracterizar a algunas de las especies de bacterias que crecen en la superficie de las rocas del monumento Arqueológico Ingapirca, uno de los más emblemáticos e importantes del Ecuador, situado a más de 3000 metros sobre el nivel del mar (msnm) (2,4,5).

A los aislados obtenidos se les evaluó las capacidades de psicrotolerancia y biolixiviación, aspectos que realzan la importancia de esta investigación puesto.

Esto se debe a que, además de considerar los posibles daños que causan en las rocas, estos microorganismos psicrotolerantes podrían ser una importante fuente de enzimas, proteínas, polímeros y demás compuestos activos a temperaturas relativamente bajas, lo que es actualmente un foco de investigación en la industria farmacológica, biotecnológica, alimentaria, y minera, ente otras (6).

CAPÍTULO I
PLANTEAMIENTO TEÓRICO.

I.1.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.

Situación problemática:

La estructura de los monumentos arqueológicos de nuestro país está compuesta principalmente por rocas de diferente composición mineralógica. El paso del tiempo, las condiciones medioambientales y el crecimiento de microorganismos colonizadores, han hecho que dichas rocas hayan experimentado cambios importantes en sus características estéticas y estructurales.

Los microorganismos son los protagonistas de estos cambios, y a ese fenómeno se le denomina “biodeterioro”. Microorganismos como los hongos, las algas, las bacterias, los líquenes y los protozoos, deterioran las estructuras debido a su multiplicación y actividad metabólica, causando en las rocas erosión alveolar, desprendimiento laminar, recubrimiento de biopelículas, y pigmentación, entre otros (1).

Las bacterias experimentan una rápida adaptación al medio en el que se desarrollan, pudiendo crecer en ambientes con temperaturas relativamente altas o bajas. Esa capacidad de tolerancia a extremos de temperaturas hace que se dificulte su control. Por lo tanto, es importante conocer las particularidades fisiológicas de las bacterias que colonizan las rocas de los monumentos, para poder comprender el papel que juegan en su biodeterioro (2).

Las investigaciones relacionadas con el biodeterioro de monumentos en distintos lugares del mundo, muestran que los microorganismos pueden producir modificaciones en las rocas por acción mecánica o química. Por ejemplo, el crecimiento microbiano puede ejercer presión en las paredes que poseen pequeñas grietas en las rocas, causando su fragmentación. Por otro lado, los microorganismos son capaces de secretar metabolitos secundarios como ciertos ácidos orgánicos, que reaccionan con los minerales de las rocas provocando su meteorización (3,7).

Actualmente, las técnicas de prevención y control del crecimiento microbiano, para reducir al máximo la colonización de las superficies de los monumentos, no son lo suficientemente eficaces como para disminuir los efectos nocivos de los microorganismos. Por este motivo, es necesario investigar qué microorganismos están colonizando las superficies pétreas y cómo participan en su deterioro. A partir de este conocimiento se podrían implementar nuevas técnicas de protección, que se adecuen a las condiciones en las que se está desarrollando el biodeterioro (4,8).

La información científica publicada evidencia que las temperaturas elevadas, la humedad, y la radiación solar, entre otros factores, propician el biodeterioro en los monumentos arqueológicos de zonas tropicales localizados a baja altitud; sin embargo, hasta la fecha no se han publicado resultados de estudios realizados en monumentos situados a mayor altitud, como aquellos que se encuentran en la Cordillera de Los Andes, donde las temperaturas son generalmente bajas y las condiciones medioambientales son muy variables (9).

En nuestro país, el Complejo Arqueológico Ingapirca, perteneciente a las culturas ancestrales “Cañari e Inca”, se encuentra ubicado en la Provincia del Cañar, a una altitud de 3160 msnm. Posee una admirable edificación central (denominada “El Castillo” o “La Elipse”) construida a base rocas de andesita, y constituye uno de los monumentos más conocidos y visitados del país (5). Las condiciones climatológicas de la zona en la que se encuentra este Complejo Arqueológico, pueden incidir de forma variable en su biodeterioro. Es por ello que nos planteamos estudiar los microorganismos “cultivables” que colonizan las rocas del monumento Ingapirca y que podrían formar parte de los responsables de su biodeterioro.

Los resultados obtenidos aportarán información científica novedosa, puesto que las investigaciones publicadas sobre el biodeterioro en monumentos arqueológicos han sido realizadas en sitios con altitudes inferiores a las que se encuentra el complejo

de Ingapirca y en ambientes tropicales húmedos. Además, los resultados aportarán información para futuras estrategias en el mantenimiento y preservación de este valioso patrimonio cultural del país.

I.2.- JUSTIFICACIÓN

El deterioro de los monumentos considerados como patrimonios culturales tiene un fuerte impacto en la sociedad, por lo que es una prioridad conocer sus causas. Sin embargo, en el Ecuador –hasta donde hemos podido consultar la bibliografía- no se han publicado hasta la fecha estudios sobre el biodeterioro de nuestros monumentos. De allí nace la necesidad de generar nuevos conocimientos en esta área.

Por otro lado, las investigaciones publicadas en los últimos años sobre el biodeterioro de monumentos arqueológicos en América Latina, se centran en el estudio de monumentos localizados en zonas tropicales húmedas, y ninguno se refiere aquellos construidos en zonas altas, con climas fríos.

Significado o importancia de la solución del problema

Debido a los procesos de deterioro que experimenta uno de los monumentos más importantes de nuestro país, el Complejo Arqueológico Ingapirca, hemos diseñado un proyecto que pretende aislar, cultivar, caracterizar e identificar algunas de las bacterias que colonizan las piedras del Castillo o Templo del Sol, una de las construcciones más emblemáticas del complejo. Debido a las bajas temperaturas que caracterizan a la zona, se cree que las bacterias que colonizan el monumento podrían ser psicrotolerantes, es decir, capaces de multiplicarse a temperaturas inferiores a los 20°C. Es por ello que su estudio, además, genera un especial interés, ya que estos microorganismos tienen muchas aplicaciones en las industrias alimentarias, farmacéuticas, textiles, entre otras.

Aporte:

Es importante destacar que los resultados obtenidos podrían aportar información científica muy valiosa a las instituciones gubernamentales encargadas de la administración y cuidado del patrimonio arqueológico. De hecho, con los datos que se generen se podrían diseñar estrategias de intervención y control del biodeterioro de este monumento.

Los beneficiarios directos de la investigación serán:

La Universidad Católica de Cuenca, ya que los resultados a obtener tendrían gran valor para la colectividad científica, y se generarán nuevas publicaciones indexadas que llevarán el nombre de la institución, lo que beneficia a la categorización de las carreras y en general de la Institución.

Los participantes en la investigación como docentes, investigadores y estudiantes de la Universidad Católica de Cuenca de las carreras de Biofarmacia y Bioquímica y Farmacia de la Unidad Académica de Salud y Bienestar; quienes, a partir de la aplicación de métodos de análisis, procedimientos y técnicas de experimentación, podrán adquirir nuevos conocimientos y desarrollar nuevas habilidades y destrezas.

Por otro lado, se encuentran los beneficiarios indirectos que son:

Los 17 millones de habitantes del Ecuador que podrán disfrutar del magnífico monumento arqueológico de Ingapirca en buenas condiciones, además, de permitir que las futuras generaciones también puedan seguir disfrutándolo.

Otro beneficiario indirecto importante del mantenimiento del Complejo Arqueológico Ingapirca, son las comunidades cercanas al complejo, ya que una parte de la economía local se desarrolla a partir de la gran cantidad de turistas nacionales y extranjeros que visitan el monumento.

Beneficios:

Los medios de comunicación también se beneficiarán del desarrollo de esta investigación, ya que al tratarse de una joya arqueológica que representa las culturas Cañari e Inca, los resultados serán ampliamente difundidos por los distintos medios de comunicación del país.

Las empresas que suministran los implementos, herramientas, reactivos y equipos necesarios para la realización de este proyecto.

El Instituto Nacional de Patrimonio Cultural, que podrá usar los resultados para tomar decisiones, basadas en evidencia científica sobre el adecuado manejo, cuidado y control del biodeterioro de los monumentos Arqueológicos Nacionales.

Asimismo, la experiencia y conocimiento que se adquirirá al ejecutar las diferentes actividades del proyecto, contribuyen en la formación profesional, ya que se obtendrá destreza en la aplicación de técnicas de microbiología y biología molecular, las cuales se aplican actualmente en varias ciencias y tienen gran relevancia en el área de las ciencias de la salud.

I.2.1.- PREGUNTA CIENTÍFICA:

¿Qué bacterias colonizan las superficies de las rocas del Complejo Arqueológico Ingapirca y qué relación tienen con su biodeterioro?

I.2.2.- HIPOTESIS: por las características ambientales en la zona de ubicación del Complejo Arqueológico Ingapirca, se logrará aislar bacterias heterótrofas y psicotolerantes, a partir de las rocas con las que está construido.

I.3.- OBJETIVOS

I.3.1.-Objetivo General:

Caracterizar aislados bacterianos psicrotolerantes, cultivables, que colonizan las rocas del Complejo Arqueológico Ingapirca (CAI).

I.3.2.-Objetivos Específicos:

- Aislar bacterias heterótrofas y psicrotolerantes a partir de muestras de superficies de las rocas del CAI;
- Determinar las características fisiológicas más relevantes de los aislados bacterianos seleccionados;
- Evaluar la capacidad biolixivante de este grupo de aislados bacterianos;
- Identificar por medio de métodos moleculares las cepas bacterianas que forman parte de este grupo;
- Determinar las relaciones filogenéticas de los aislados bacterianos seleccionados con otras especies relacionadas.

I.4.- MARCO TEÓRICO

I.4.1.- Antecedentes:

De la búsqueda en bases de datos de publicaciones científicas sobre biodeterioro de monumentos arqueológicos culturales, destacan varias investigaciones realizadas en monumentos de este tipo en distintos sitios del mundo:

En su tesis doctoral, Díaz Herraiz (10) estudió procesos de biodeterioro en tres tumbas de necrópolis etrusca en la región de Toscana (Italia) y una tumba necrópolis Romana en Andalucía (España). Las muestras se obtuvieron a partir de superficies que mostraban manchas blancas; las mismas fueron observadas por microscopía electrónica de barrido, espectroscopía de energía dispersiva de rayos

X, métodos moleculares, cultivo y caracterización microbiana. En cada una de las tumbas analizadas se lograron cultivar distintos tipos de microorganismos, entre ellos; actinobacterias, cianobacterias, alfa-proteobacterias y hongos. Algunos de ellos correspondían a especies poco conocidas.

Estudios realizados en el 2003 en las majestuosas edificaciones construidas por las civilizaciones Mayas en México, determinaron las causas del biodeterioro de los templos ubicados en las ciudades de Uxmal y Tulum (11). Para su estudio, los autores combinaron varias técnicas de microscopía con la dispersión de rayos X (EDAX), aplicados a las muestras de superficies del material rocoso de los templos, observando que las mismas presentaban pigmentaciones negruzcas y verdosas. En sus resultados destacan el crecimiento de bacterias, hongos y algas. Los autores determinaron que los metabolitos orgánicos secretados por hongos y bacterias, representaban el principal causante del biodeterioro de las rocas, conjuntamente con otros agentes externos, en los que mencionan la sal de mar y la humedad de las ciudades.

En el año 2016, se realizaron estudios sobre el biodeterioro de cerámicas arqueológicas del valle de Antinaco (Argentina) (12). En ese trabajo, los autores analizaron las superficies de las cerámicas por medio de procedimientos como: microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido, espectroscopía por dispersión de rayos X. Esto permitió identificar varias especies de cianolíquenes en las superficies, así como bacterias y hongos en las hendiduras y fisuras, mismos que tienen evidente incidencia en el biodeterioro de las cerámicas.

En Venezuela se estudiaron las posibles causas del biodeterioro del monumento religioso “San Antonio de Padua”. Los autores indican que las condiciones ambientales inciden claramente en el deterioro del monumento; además, realizaron cultivos a partir de muestras del templo, que permitieron identificar cinco taxones de

microorganismos entre los cuales están: gramnegativos, levaduriformes y filamentosos. Los autores plantean que estos microorganismos pueden provenir del depósito de las heces de aves que invaden el monumento y de las biopelículas microbianas que se han formado con el paso del tiempo (13).

En otro estudio realizado en varios monumentos arqueológicos de Malinalco (México), se observó deterioro en las superficies rocosas, siendo la presencia de manchas lo que más llamó la atención de los autores. En las muestras tomadas de la superficie se lograron identificar cianobacterias y microalgas que formaban biopelículas sobre las superficies pétreas. Estos microorganismos producen pigmentos y polisacáridos que causan las manchas y los principales procesos de biodeterioro (14).

En otra región del territorio mexicano, se estudió la infraestructura del castillo de Chapultepec. En las muestras analizadas a partir de biopelículas de superficies pétreas del Castillo, se identificaron un gran número de hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Mucor*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Rhodotorulas* y bacterias pertenecientes a los géneros *Kokuria*, *Bacillus*, *Pantoea*. Todos estos microorganismos fueron asociadas a procesos de biodeterioro de las estructuras, provocado principalmente por la formación de biopelículas y secreción de ácidos orgánicos corrosivos (15).

Perú es una nación conocida por poseer el grandioso monumento Machu Picchu, que es uno de los monumentos arqueológicos más visitados y reconocidos a nivel mundial. Para garantizar su preservación, un grupo de investigadores estudió el impacto que causan los líquenes y la comunidad microbiológica al invadir las rocas del monumento. Este estudio identificó a los agentes biológicos como los agentes causales de grandes daños irreversibles en las rocas; además, establecieron que la

mejor opción para el control de la invasión microbiana era combinar los efectos de biocidas con el láser de limpieza (16).

En el 2018, un interesante estudio de las antiguas piedras caliza en distintos sitios de Egipto permitió identificar, mediante técnicas microscópicas y microbiológicas, a 15 cepas fúngicas pertenecientes a cinco géneros. Además, se estudió la capacidad de disolución de carbonatos que poseen los hongos, encontrando que las cepas fúngicas *Aspergillus niger* y *A. terreus* causan un daño mayor sobre las rocas, en comparación con las otras especies identificadas (17).

Hasta donde hemos consultado, no hemos encontrado publicaciones que mencionan a bacterias psicotolerantes y heterótrofas, causantes del biodeterioro en monumentos arqueológicos ubicados en regiones montañosas, frías y húmedas, tales como las que caracterizan al sitio donde se encuentra el Complejo Arqueológico Ingapirca.

I.4.2.- Marco referencial:

1.4.3.- Biodeterioro

El biodeterioro es la destrucción, daño o cambio indeseado de estructuras y materiales de cualquier origen (madera, papel, cemento, rocas, etc.) causado por la acción de organismos vivos. En general, los daños se presentan como cambios físicos de las estructuras, en los que se puede observar decoloración de superficies, incrustaciones, recubrimiento de biopelículas, erosión alveolar y desprendimiento laminar de las rocas (1,7).

Existen varios factores que influyen en el proceso de biodeterioro, entre los que cabe destacar la composición mineralógica de la roca, material que conforma la estructura, afecciones físico-químicas, condiciones medioambientales.

Dependiendo del número de factores que actúen, el proceso de biodeterioro puede acelerarse, y producir daños notorios en un periodo corto (18).

Al momento de realizar estudios de biodeterioro, es importante tomar en cuenta cada uno de los aspectos que afectan de forma directa o indirecta a la estructura del monumento. Para ejecutar un plan de cuidado que abarque todas las problemáticas que inciden en el biodeterioro de monumentos, se deben analizar por separado todos los factores que puedan estar involucrados como la radiación solar, la humedad, la temperatura, así como el metabolismo de los microorganismos colonizadores, posibles cadenas tróficas que se pueden establecer entre insectos, roedores y microorganismos, e incluso aquellos mecanismos de cuidado y control mediante el uso de compuestos químicos e insecticidas (3,8).

Agentes causales del biodeterioro

Los protagonistas en el proceso del biodeterioro son los microorganismos. Cada uno de ellos coloniza las rocas en diferente orden, dependiendo de los requerimientos nutricionales y metabólicos. De hecho, los microorganismos muestran diferentes formas de colonización que se traduce en diferentes tipos de daños. Los hongos, bacterias y cianobacterias son los primeros microorganismos colonizadores y los segundos las algas, líquenes, musgos y plantas (19,20). Cada uno ejerce una función en el proceso de biodeterioro de las rocas de los monumentos, que explicaremos a continuación:

Hongos

Los hongos son microorganismos quimioheterótrofos que obtienen la energía a partir de compuestos orgánicos. Por ello tienen la capacidad de invadir zonas escondidas en las rocas (18). Una de las características peculiares de los hongos es su capacidad de dispersarse en el ambiente, lo cual se debe al minúsculo tamaño

de sus esporas, logrando llegar a sitios escondidos o de difícil acceso. Los hongos poseen múltiples estructuras, que les permiten resistir y mantenerse metabólicamente activos aún en condiciones desfavorables, como en presencia de radiación UV y desecación. Estas características los hacen capaces de sobrevivir a condiciones ambientales extremas (6,9).

Los hongos pueden causar biodeterioro de las estructuras de materiales pétreos a través de los siguientes mecanismos:

El primero es la acción mecánica producida por el crecimiento y penetración de las hifas de los hongos en la superficie rocosas, generando de esta manera grietas, poros u orificios, que pueden llegar a alcanzar zonas profundas que debilitan la superficie, quebrantándola y formando fisuras. Estos daños mecánicos crean ambientes propicios para que otros factores como el agua, viento y contaminantes ambientales actúen en conjunto favoreciendo el deterioro de los monumentos (17).

El segundo es la alteración química del mineral. En este caso el daño es causado por la acción de los productos metabólicos como los ácidos orgánicos como el ácido glucónico, cítrico, oxálico, y fumárico. El ácido oxálico reacciona con el carbonato de calcio para formar oxalato de calcio monohidrato y oxalato de calcio dihidrato. Ambos compuestos son sales de color blanquecino que migran por las estructuras pétreas y les dan un aspecto antiestético a los monumentos de importancia cultural (21).

Por otro lado, los hongos producen melanina, que causa la modificación de la coloración de las paredes, cambiando el aspecto original de las superficies. La melanina también les brinda defensa ante la agresión química externa, haciéndolos resistentes al efecto de compuestos antimicóticos empleados en la erradicación de microorganismos colonizadores (19).

Líquenes

Los líquenes son estructuras que se originan de la relación benéfica entre cianobacterias (fotoautótrofos) y hongos (quimioheterótrofos). Los hongos que se unen a las algas para formar los líquenes son del grupo ascomicetes y las algas verdes son cianobacterias (22).

Los líquenes poseen características de supervivencia particulares, que les permiten vivir en ambientes en los que los hongos y algas de forma individual no podrían; por esa razón, pueden desarrollarse en diferentes ambientes y materiales como maderas, plásticos, papel, rocas, entre otros. Los líquenes forman una estructura palpable macroscópicamente en superficies y complementan el crecimiento de biopelículas que recubren las rocas (23,24).

La morfología de crecimiento de los líquenes puede variar muy significativamente: desde una costra (crustáceos), difícil de desprender de la superficie, pasando por forma de hoja (foliáceos), que se desprenden fácilmente, hasta aquellos que crecen en forma de ramas (fruticulosos) (9,24).

Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares procariotas capaces de multiplicarse de forma rápida. Se clasifican en diferentes grupos según su forma (cocos, bacilos, espirales), según su movilidad (móviles o inmóviles), por la estructura de su pared celular (gram positivos y gram negativos), y por su metabolismo (autótrofos y heterótrofos) (6,21).

Por ser microorganismos de fácil crecimiento pueden invadir fácilmente la superficie de las rocas en los monumentos y afectarlas por la formación de pátinas platinas de varios colores. La colonización bacteriana en las rocas se ve favorecida por

diferentes factores como la humedad, el viento y las condiciones medioambientales que facilitan su multiplicación (20).

Como ya se indicó las bacterias pueden clasificarse en varios grupos con características conocidas y definidas. Pero algunos estudios mencionan que son cuatro los tipos principales de bacterias que afectan las rocas calcáreas de monumentos rocosos:

Bacterias nitrificantes

Son un grupo de bacterias con metabolismo quimolitotrófico, multiformes y unicelulares, que se adaptan fácilmente a distintos ambientes debido a que son poco exigentes en cuanto a sus requerimientos nutricionales. De todas las bacterias nitrificantes, las que principalmente se encuentran en suelos y superficies son las pertenecientes a los géneros *Nitospira*, *Nitrobacter* y *Nitrosomona* (19). Las bacterias nitrificantes constituyen los principales microorganismos quimiolitotróficos colonizadores de las superficies deterioradas de material rocoso.

Las bacterias nitrificantes actúan por medio de la secreción de enzimas (amoníaco-monooxigenasa y nitrito-oxidoreductasa), degradando el amoníaco y los nitritos presentes en las rocas, los cuales son derivados de los desechos metabólicos de otros microorganismos, roedores, aves o fertilizantes (11,25).

El proceso de biodeterioro inicia por la síntesis de enzimas bacterianas de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrosovibrios*, las cuales oxidan los iones de amoníaco para formar trióxido de nitrógeno. Posteriormente las bacterias pertenecientes a los géneros *Nitrobacter* o *Nitrococcus* convierten el trióxido de nitrógeno en ácido nítrico, que reacciona con el carbonato de calcio para producir nitrato de calcio. Este último es más soluble, lo que genera la rápida destrucción de las rocas, al disolverse fácilmente ante la presencia de agua y viento (25).

Actinomicetos

Pertencen al grupo de bacterias Gram negativas. Tienen la capacidad de adaptarse a distintos medios, tanto ambientales como hospitalarios, incluso están asociados a distintas patologías humanas. Sin embargo, en el ambiente, tienden a vivir en comunidad con otros microorganismos de metabolismo similar y en lugares que contengan compuestos químicos para la obtención de energía (13,26).

Los actinomicetos pueden alterar las rocas mediante la secreción de compuestos orgánicos como los ácidos cítrico y oxálico, que participan en reacciones químicas con el carbono, calcio y otros minerales del material rocoso, haciendo que las rocas se vuelvan susceptibles al efecto de los demás factores ambientales (19).

Los actinomicetos incluyen un subgrupo conocido como *Streptomyces*. Se trata de bacterias ampliamente investigados por la comunidad científica farmacéutica, por sintetizar una amplia gama de compuestos con principios activos antibióticos. Entre estos compuestos se encuentran los macrólidos, estreptomicina, cefalosporinas y otros; además, muchos *Streptomyces* tienen la capacidad de disolver fosfatos, lo cual tiene efectos negativos para estas estructuras (27).

Cianobacterias

Las cianobacterias son bacterias gram negativas, inmóviles, con metabolismo fotoautótrofo, lo que les permite vivir y adaptarse a ambientes como el agua, el suelo y las superficies. Están asociados con el biodeterioro, ya que son los primeros invasores de las superficies rocosas y están presentes en mayor proporción debido a la facilidad con la que obtienen energía (28).

Las cianobacterias pueden deteriorar las estructuras de los monumentos, ya que producen compuestos como clorofila, carotenoides, xantofilas, ficocianinas y

ficoeritrinas. Estos compuestos pigmentan las estructuras de diferentes colores como verde, naranja y rojo, cambiando las características estéticas de las rocas. Cabe destacar que estos compuestos brindan protección a las cianobacterias frente a agentes externos como la radiación UV, la humedad y otros factores ambientales (29).

La colonización de cianobacterias en las rocas, también provoca un aumento de la presión interna en las fisuras de las rocas, debido a la absorción de humedad, que con el paso del tiempo provocan que el polvo, ácaros o agua se filtren y afecten aún más las condiciones de las piedras. Además, las cianobacterias también sintetizan ácidos orgánicos que reaccionan con los minerales de las rocas de los monumentos formando sales que les dan un aspecto desagradable (6,29).

Bacterias oxidantes de azufre

Las bacterias con propiedades oxidantes de azufre, obtienen energía a partir de la oxidación de compuestos reducidos del azufre (como los sulfuros), originando la producción de ácido sulfúrico. Eso lo hacen con la ayuda de oxígeno y compuestos nitrogenados (nitritos, nitratos). Las bacterias pertenecientes a los géneros *Thiobacillus*, *Sulfolobus*, *Thermothrix*, *Beggiatoa* y *Thiothrix*, oxidan azufre y son las que se encuentran comúnmente en ambientes naturales (30).

El proceso de obtención de energía de estas bacterias es complejo y se basa principalmente en el hecho de que oxidan el azufre elemental del ácido sulfúrico con la ayuda de aceptores finales de electrones como el oxígeno o ciertos compuestos nitrogenados. Ese proceso afecta a las propiedades de las rocas cuando el ácido sulfúrico reacciona con el carbonato de calcio para formar el sulfato de calcio; este compuesto químico tiene aspecto de yeso y es más soluble que el carbonato de calcio, lo que debilita el material rocoso (7,30).

Las bacterias oxidantes del azufre han sido asociadas con el biodeterioro de los monumentos, ya que el sulfato de calcio, hace que las propiedades del material rocoso se vuelvan polvorosas, de fácil arrastre y que generen una sobrepresión en las fisuras o poros. Además, estas bacterias producen coloraciones negruzcas con aspectos desagradables (30).

Biopelículas

Las biopelículas son comunidades de microorganismos que se mantienen en constante interacción ecológica y crecen en las superficies. Están compuestas por polímeros que sintetizan los propios microorganismos para mantenerse en comunicación, adherirse fácilmente a las superficies, brindar soporte y resistencia, mejorar su adaptación y crecimiento (7).

Generalmente las biopelículas son heterogéneas (compuestas por varias especies de microorganismos), donde cada microorganismo tiene un metabolismo y una tasa de crecimiento diferente (31).

En los monumentos de roca, los primeros microorganismos invasores son los hongos, las bacterias y las algas, ya que por sus propiedades metabólicas no necesitan de muchos nutrientes para sobrevivir y multiplicarse en el material rocoso; luego colonizan los líquenes, las plantas y los musgos. Las comunidades microbianas que forman las biopelículas, crean microambientes que les permiten adaptarse y complementar su crecimiento en la superficie (32).

Las biopelículas son una amenaza para la preservación de monumentos compuestos de roca, ya que además de modificar el aspecto estético de superficies por la presencia de pigmentos, su crecimiento causa sobrepresión en las superficies, creando fisuras, grietas o poros que se desprenden fácilmente de la

matriz rocosa. Asimismo, al estar en comunidad ecológica con muchos microorganismos, las biopelículas hacen que los biocidas y demás compuestos químicos no funcionen adecuadamente, dificultando su erradicación y control (33).

Microorganismos heterótrofos

Los microorganismos heterótrofos (hongos y bacterias) son aquellos que tienen la capacidad de obtener energía a partir de la oxidación de sustratos orgánicos (como la glucosa, u otros carbohidratos); es decir, se benefician de los “nutrientes” orgánicos que otros organismos producen o que encuentran en el medio en que crecen como suelos, aguas, rocas, madera, entre otros (34).

Numerosos estudios han empleado estos microorganismos para la remediación de aguas y suelos contaminados por compuestos químicos letales como el cianuro, diésel, petróleo, entre otros, siendo capaces de degradar estos compuestos para obtener energía y multiplicarse (35).

Algunos autores los denominan “microorganismos patógenos”, ya que aprovechan el alimento del sustrato en el que crecen causando deterioro de las estructuras, mediante la liberación de ácidos orgánicos que resultan del metabolismo microbiano. En los procesos de biodeterioro de monumentos arqueológicos rocosos, son los principales responsables de la meteorización de las rocas, los ácidos orgánicos resultantes generan manchas de distintos colores y cambios en las propiedades estructurales de las rocas (6,20).

Psicrotolerancia microbiana

La psicrotolerancia es la capacidad que poseen ciertos microorganismos de crecer a temperaturas por debajo de los 20°C, aunque a tasas inferiores a las que presentan por encima de esta temperatura. De allí la diferencia con los verdaderos

psicrófilos: los primeros son “tolerantes al frío” y los segundos “amantes del frío”. Los microorganismos psicrotolerantes crecen normalmente en ambientes de temperatura bajas, pero las temperaturas óptimas de crecimiento generalmente son superiores a los 20°C, es decir pueden crecer en zonas frías y cálidas (36).

Para poder multiplicarse a estas temperaturas, los microorganismos psicrotolerantes adaptan su metabolismo, morfología y procesos de crecimiento. Esto se debe a que, al bajar la temperatura, los compuestos líquidos se convierten en gel, haciendo que disminuya su fluidez, afectando su capacidad de reproducirse, alimentarse e interactuar con otros microorganismos (37).

Uno de los mecanismos que desarrollan los microorganismos psicrotolerantes para soportar las bajas temperaturas, es aumentar el contenido de ácidos grasos insaturados en la membrana celular, con el fin de aportar fluidez y mejorar el transporte de sustancias a través de ella (36).

Otros mecanismos de adaptación son la disminución del metabolismo y la modificación de la conformación de las proteínas, que reducen las interacciones covalentes y mejoran la disposición de la membrana mejorando la captación de nutrientes (37).

La producción de exopolisacáridos también es un mecanismo de protección que poseen estos microorganismos para mejorar su ambiente de desarrollo y protegerse de agentes externos (36).

En el área de la biotecnología hay gran interés en las enzimas que producen los microorganismos psicrotolerantes, y su estudio puede brindar resultados favorables en la producción de alimentos, detergentes y fármacos. Principalmente porque las enzimas (peptidasas, lipasas y galactosidasas) producidas por bacterias psicrotolerantes pueden actuar eficientemente a temperaturas bajas, en las que otras enzimas se encuentran inactivas. Actualmente los productos generados por las bacterias psicrotolerantes y psicrófilas, son empleados en proyectos de

investigación, por la peculiaridad de contar con principios activos que les brindan características favorables para su estudio (36).

Es importante mencionar que desde hace varias décadas los estudios de las bacterias extremófilas son una prioridad para los investigadores. Basta con recordar que la enzima ADN polimerasa empleada actualmente para realizar las pruebas PCR (llamada Taq polimerasa), fue descubierta por primera vez en la bacteria *Thermus aquaticus*, nativa de aguas termales, que tiene la capacidad de soportar y mantenerse funcional a temperaturas muy altas (38).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

II.1.- Diseño de investigación.

Se trata de una investigación básico-orientado, con un diseño observacional y de tipo descriptivo.

II.2.- Población y muestra.

II.2.1. Universo - Población: El principal foco de estudio son las bacterias presentes en las superficies de las rocas del Complejo Arqueológico Ingapirca, que se estudian con la finalidad de conocer sus características de crecimiento e incidencia en el proceso de biodeterioro que experimenta el complejo. Para ello se parte del análisis de las muestras tomadas del mismo monumento.

II.2.2 Muestreo y muestra: Las muestras se obtuvieron del templo principal del complejo Arqueológico Ingapirca denominado “Elipse”, “Castillo” o “Templo del sol”. Para ello, luego de observar las fachadas se eligieron las rocas que presentaron deterioro evidente, pigmentación y biopelículas de microorganismos. A partir de las mismas se tomó cuatro muestras representativas en cada una de las cuatro fachadas (este, oeste, norte y sur).

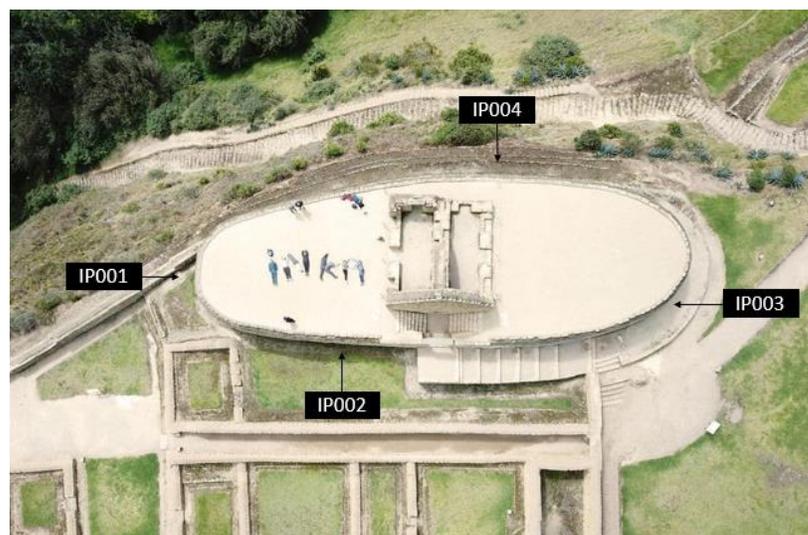


Figura 1. Puntos de muestreo.

II.4.- Definición y clasificación de las variables

1. Especie Bacteriana

Definición: Grupo de población bacteriana con gran similitud fenotípica y genotípica.

2. Temperatura óptima de crecimiento

Definición: Máximo rendimiento de biomasa de bacterias al cultivarlas *in vitro* a distintas temperaturas.

Escala de medición:

- Poco crecimiento: +
- Medio crecimiento: ++
- Alto crecimiento: +++

3. Capacidad de disolver minerales poco solubles

Definición: Capacidad para disolver minerales poco solubles mediante la producción de exometabolitos *in vitro* (en el medio de cultivo NBRIP/NBRIC).

Escala de medición:

Forma halos de disolución:

- Si
- No

4. Porcentaje de identidad de la secuencia nucleotídica con secuencias almacenadas en base de datos.

Definición: Comparación de dos secuencias nucleotídicas correctamente alineadas mediante el empleo de algoritmos específicos.

Escala de medición:

- Porcentaje de similitud de 0 a 100%.

II.5.- Procedimientos, técnicas e instrumentos para la obtención de datos.

Los datos recolectados durante la investigación, fueron ingresados en bases de datos empleando como herramienta Excel 2016, en donde se elaboró matrices de información resumida en tablas.

Además, algunos datos obtenidos por la investigación, se procesaron mediante el uso de la estadística descriptiva que resumió la información por medio de tablas, gráficos, fotografías y cuadros estadísticos para la presentación de los resultados finales de forma fácil y clara.

Técnicas e instrumentos:

Colecta de las muestras y cultivo

Las muestras fueron recolectadas en diferentes sitios de la fachada del templo principal “El Eclipse” del Complejo Arqueológico Ingapirca, Se escogió las rocas tomando como referencia la presencia de pigmentos, biopelículas, fisuras y erosión en las rocas. Por tratarse de un monumento emblemático se emplearon técnicas de recolección no abrasiva, mediante hisopado de aproximadamente 10 cm² de la superficie de cada roca. Los hisopos fueron depositados en tubos de fondo cónico con solución salina 0.8 % estéril y trasladados en contenedor hermético al laboratorio.

Para evitar cualquier tipo de contaminación se trabajó con todas las medidas de esterilidad, y haciendo uso de equipos e implementos de bioseguridad.

A las muestras se les realizó diluciones seriadas 1/10 y 1/100 con solución salina y a cada muestra se la cultivó en los medios agar nutritivo (diluido a ¼ de su concentración original de nutrientes), PDA y Czapeck. Para la siembra, se inoculó 100 µL de cada muestra en los medios de cultivo y con la ayuda de un rastrillo microbiológico (espátula de Drigalsky) se distribuyó la muestra con movimientos circulares por toda la caja.

Cada caja Petri sembrada fue incubada por cinco días a 12°C.

Aislamiento, purificación de colonias y conservación

El aislamiento de las colonias bacterianas se realizó por la técnica de cultivo en estriado con un asa bacteriológica previamente esterilizada, tomando cada colonia bacteriana y cultivándola en cajas Petri del mismo medio de crecimiento. El aislamiento permitió asegurar la pureza de las colonias bacterianas a partir de las características macroscópicas que se observó.

Caracterización fenotípica

A las colonias bacterianas purificadas se les asignó códigos de caracterización, según el fenotipo que fueron presentando durante su crecimiento, en donde cada colonia adquirió un carácter, para lo cual se estableció:

Color: blanco (B), crema (C), rosado (R), naranja (N), amarillo (A) y transparente (T).

Textura: brillante (b), opaco (o) y mucoide (m).

Borde: regular (R) e irregular (I)

Tamaño: pequeño (P), mediano (M) y grande (G).

Análisis microscópico de tinción Gram

En primera instancia se estandarizó la tinción Gram, empleando la técnica establecida por el investigador Hans Christian Gram; se utilizó cepas de referencia ATCC para verificar la eficiencia de la tinción: *Escherichia coli* 25922 (Gram negativa) y *Staphylococcus aureus* 25923 (Gram positiva). El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

1) Se hizo el frotis de la muestra y se la fijó en el portaobjetos a la flama; 2) Se cubrió el portaobjeto con cristal violeta durante un minuto, después se lavó delicadamente con agua destilada; 3) Se cubrió con yodo-povidona (Lugol) durante un minuto, seguido de su lavado; 4) La decoloración con alcohol-acetona por 15 segundos, lavando; 5) Se cubrió con safranina por 30 segundos y se lavó.

Luego se observó los portaobjetos en el microscopio con aumento 100X, con lo cual se estableció la morfología de cada bacteria (bacilos, cocos, coco-bacilos o espirilos), además su clasificación en Gram positivas (azul-violeta) o Gram negativas (rosadas).

Para continuar con todos los procedimientos de investigación se escogió diez colonias bacterianas puras.

Crecimiento bacteriano a diferentes temperaturas

El estudio de crecimiento en las bacterias a varias temperaturas se llevó a cabo con el objetivo de determinar la temperatura óptima de crecimiento, y conocer así la capacidad fisiológica y adaptativa que poseen las bacterias para crecer a temperaturas relativamente altas, medias y bajas.

El estudio se realizó en el medio de cultivo de agar nutrido $\frac{1}{4}$ a temperaturas de 4°C, 12°C, 20°C y 30 °C. Previo a la siembra se preparó una solución homogenizada para cada bacteria, en donde se tomó una colonia bacteriana y se la suspendió en 200 μ L de agua destilada.

El proceso de la siembra se hizo con la inoculación de 5 μ L de cada solución bacteriana; mismas que se las distribuyó de forma simétrica por la caja Petri. Luego de la siembra, se incubaron las cajas durante cinco días, al cabo de los cuales se observó el tamaño y densidad de las colonias y se comparó con la misma cepa cultivada a otras temperaturas.

Capacidad de disolución de minerales inorgánicos poco solubles (fosfatos/carbonatos)

La capacidad de disolución de fosfatos y carbonatos de los aislados bacterianos obtenidos de las muestras de la superficie de las rocas del complejo arqueológico Ingapirca, fue determinado en los medios de cultivo NBRIP y NBRIC. El medio de cultivo NBRIP es un medio agarizado de doble capa, el cual fue enriquecido con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (un mineral poco soluble) en la capa superior, y empleando como fuente de carbono la glucosa (39). En el caso del medio de cultivo NBRIC fue enriquecido con otro mineral poco soluble, el carbonato de calcio (CaCO_3), y con glucosa como fuente de carbono y energía. El indicador de la capacidad de la disolución de fosfatos y carbonatos, fue la formación del halo de disolución alrededor del crecimiento de las colonias.

La inoculación fue realizada con una suspensión bacteriana homogénea compuesta por 200 μL de agua destilada y una colonia bacteriana; de esa suspensión se tomó 5 μL y se inoculó en la placa Petri, distribuidas de forma separada. Las placas fueron incubadas a temperaturas de 20°C por cinco días.

Extracción de ADN genómico y amplificación por PCR

El ADN genómico de las bacterias fue extraído mediante lisis por ebullición a una temperatura de 100°C; para ello, se suspendió una colonia bacteriana en 200 μL de agua destilada y se calentó en un baño María durante 10 minutos (40). El sobrenadante de esta suspensión se usó como fuente de ADN genómico.

El proceso de amplificación mediante PCR de un fragmento interno del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S (16S ADNr) fue realizado con el ADN genómico de las diferentes cepas puras. Para ello empleamos el kit Go Taq Green Mastermix de Invitrogen. La mezcla de reacción incluyó: 12,5 μL de Master Mix; 5,5 μL de Primer Fd1 (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'); 5,5 μL de Primer rd1 (5' CTG CTG CSY CCC GTA G 3'); 1 μL de ADN genómico y 6,5 μL de agua destilada estéril

y libre de nucleasas. El proceso de amplificación PCR fue realizado en el termociclador SimplyAmp de ThermoFisher, el cual se programó con un perfil térmico que consistió en: un primer ciclo de desnaturalización total a 94°C por 1 minuto; seguido de 35 ciclos a 94°C por un minuto, 55°C por un minuto, 72°C por dos minutos y por último un ciclo de elongación final a 72°C por 6 minutos.

Las muestras amplificadas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5 %. Estos geles fueron preparados mezclando 0.75 g de agarosa con 50 ml de buffer (TAE o TBE) y luego fundido en microondas hasta que se obtuvo una solución homogénea y transparente, a la cual se agregó 5 µL de SYBR Safe (Invitrogen). La mezcla fue depositada en el molde hasta que gelificó.

La corrida del gel consistió en la colocación del gel en el equipo de electroforesis, al que se cubrió completamente con buffer. Posteriormente se tomó 10 µL de la muestra amplificada y se mezcló con una microgota de tampón de carga Blue Juice™; en cada pocillo se colocó la mezcla de la muestra, incluidos los controles positivo y negativo. Continuando se conectó el equipo de corrida por aproximadamente 45 minutos.

Con el fin de mejorar los resultados se estandarizó y optimizó la amplificación del gen 16S rDNA. Para ello, y tomando en cuenta los resultados del ensayo preliminar, se usó un nuevo juego de primers universales: (REVB (también llamado 1492 R) 5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3') y 7f (también llamado 27f-YM): 5' AGA GTT TGA TYMT GGC TCA G 3' donde: Y es equivalente a C o T) (41) y ADN genómico de *E. coli* ATCC 25922, diluido en 1/10, 1/100 y 1/500. A partir de la información obtenida es que realizamos la amplificación de la región 16S (PCR) de las bacterias seleccionadas del complejo arqueológico Ingapirca.

Cuantificación del ADN amplificado y secuenciación de los amplicones

La cuantificación de los productos de amplificación (amplicones) se realizó con el fin de enviar a secuenciar la cantidad de ADN exigida por la empresa Macrogen. Para ello se utilizó el fluorómetro Qubit y el kit BR DNA el cual, por medio de la emisión de fluorescencia, permite cuantificar la concentración de ADN en cada una de las muestras. Así se envió a secuenciar a la empresa Macrogen (Corea).

Análisis de secuencias y construcción de cladogramas

Una vez obtenidos los datos de la secuenciación del ADN bacteriano, se procedió a ingresar las secuencias en la herramienta BLAST Search (42) disponible en la página del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Esta herramienta compara las secuencias generadas con las que están disponibles en la base de datos GenBank. Una vez obtenidos los resultados, se escogieron las especies bacterianas cuyas secuencias nucleotídicas presentaron el mayor porcentaje de identidad. De cada uno de estos “hits” se tomaron datos como: su identificación, el número de pares de bases secuenciadas, porcentaje de identidad y código de acceso al GenBank.

Las secuencias del gen 16S se procesaron en la plataforma bioinformática Mega X, con la finalidad de construir cladogramas que muestren las relaciones evolutivas (filogenia) entre ellas.

II.5.1.- Procedimientos estadísticos y análisis de datos

Técnicas estadísticas: las tablas fueron realizadas a través del programa Excel, en el cual se ingresaron todos los datos obtenidos por los estudios realizados. El cladograma fue construido empleando la plataforma bioinformática Mega X.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento primario de cepas bacterianas heterótrofas y psicotolerantes

El monumento más importante del Complejo Arqueológico de Ingapirca es de estructura oval, con paredes de más de cuatro metros de altura y fue construido empleando bloques de andesita verde, mineral de origen volcánico (Figura 2 A y B). Estas rocas presentan signos evidentes de deterioro causado, principalmente, por organismos macroscópicos (líquenes, musgos, plantas vasculares) y microscópicos (hongos, bacterias, algas) (Figuras 2C y 3 A-E).

Como puede observarse en las imágenes, en la prospección inicial de las rocas del monumento observamos todo tipo de fisuras, grietas, manchas y biopelículas en las superficies de estos bloques de piedra (Fig. 2A, B, C).

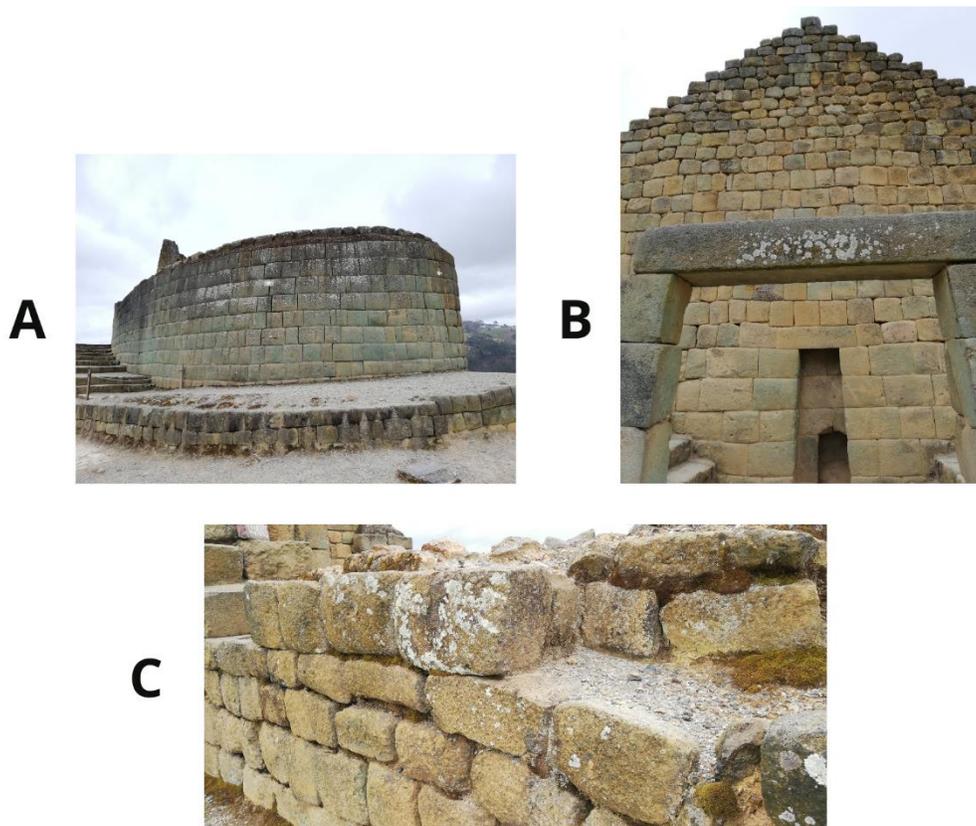


Figura 2. A. Estructura del templo “Eclipse” del Complejo Arqueológico Ingapirca, B. Paredes del CAI y C. Condiciones de las rocas del templo “Eclipse” del complejo Arqueológico Ingapirca.

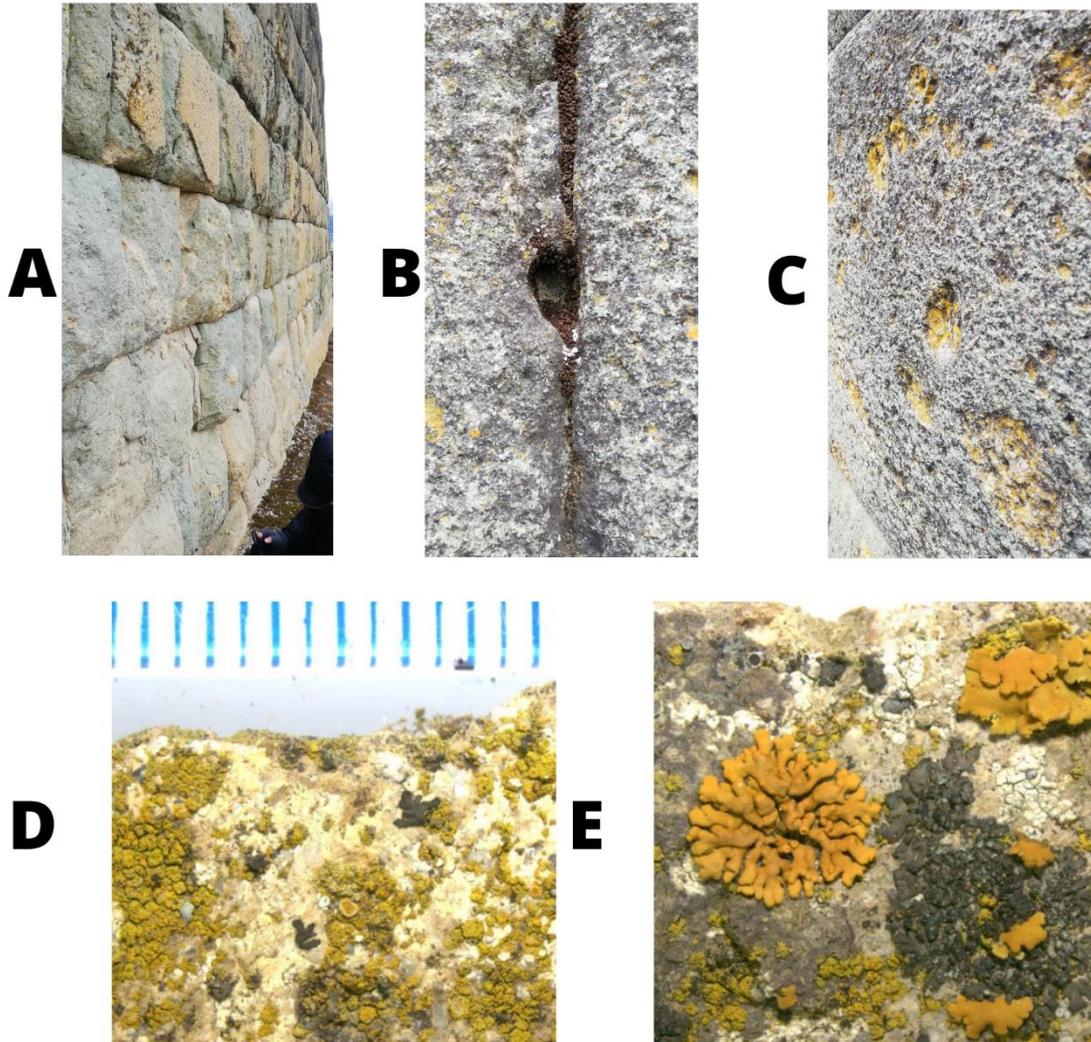


Figura 3. A, B, C, Superficies de las estructuras rocosas del templo “Eclipse” del monumento arqueológico Ingapirca; D, E, superficies de rocas bajo el microscopio estereoscópico.

A partir de las muestras colectadas de las rocas, mediante métodos no abrasivos, se realizó el aislamiento primario de los microorganismos allí presentes mediante inoculación con hisopo y rastrillo microbiológico (espátula de Drigalsky) en diferentes medios de cultivo, e incubación por varios días a una temperatura de 12°C. De los medios de cultivo escogidos para la siembra, el medio agar nutritivo fue el que permitió el mayor crecimiento y diversidad bacterianos (Figura 4B), seguido del medio PDA (Figura 4A) y el medio Czapek (Figura 4C); en todos estos

medios de cultivo se observaron variedad de colonias bacterianas con formas, tamaños y colores diferentes, con la particularidad de que en cada medio de cultivo crecieron morfotipos distintos, lo cual sugiere que la composición de los medios selecciona en favor de una u otra especie (Figura 4A, B, C). A partir de estos aislamientos primarios, se lograron obtener aislados bacterianos puros (axénicas), mediante sucesivos repiques en medio agarizado (Figuras 4D, E).

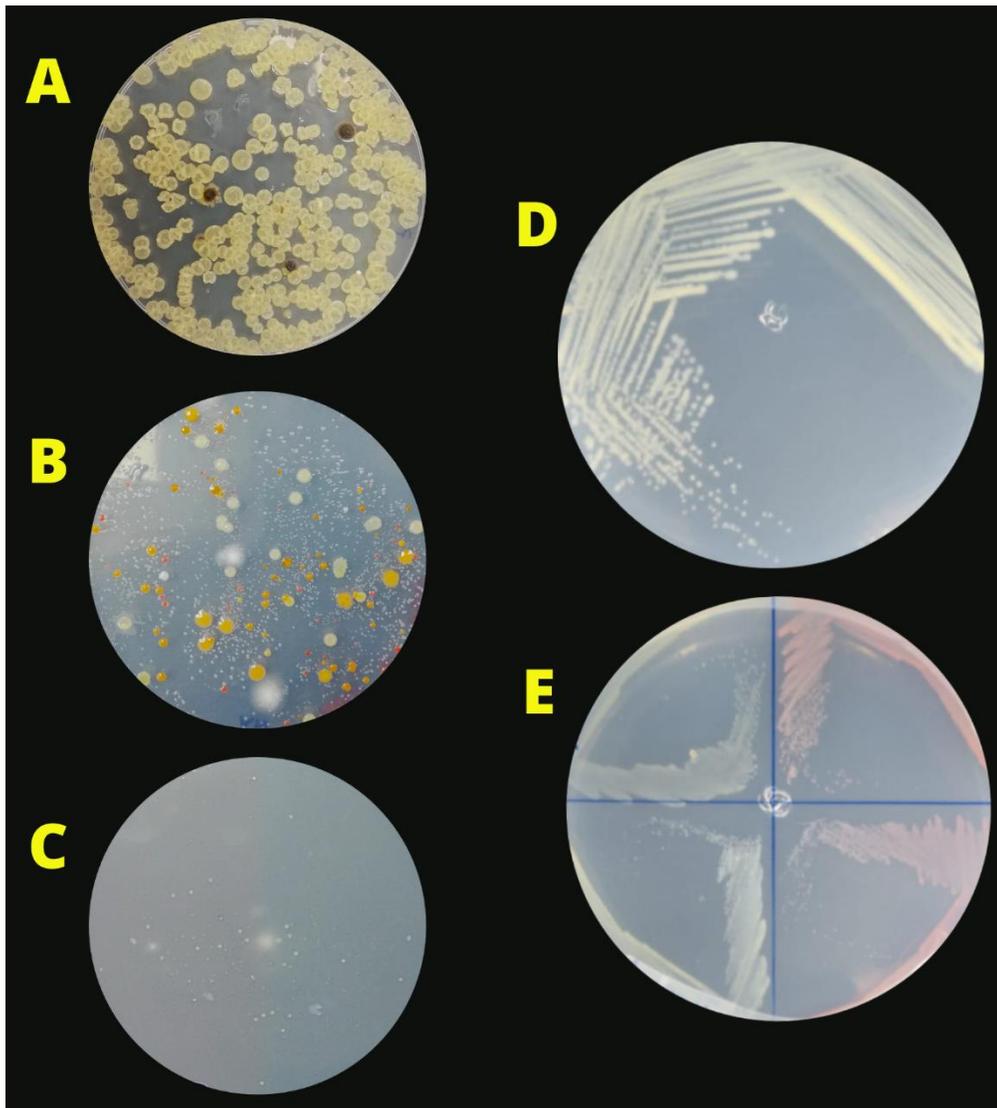


Figura 4. Cultivos primarios en medios de cultivo A) PDA; B) Nutritivo; C) Czapek. D, E) Aislados purificados.

Morfotipos de aislados bacterianos del Complejo Arqueológico Ingapirca

De todos los aislados que se lograron purificar hasta lograr cultivos axénicos, y que fueron capaces de multiplicarse a 12°C, se escogió 10 cepas bacterianas puras para ensayos posteriores, tratando de incluir la mayor diversidad fenotípica posible (Tabla 1 y Figura 4B). La mayoría de estos aislados eran bacterias Gram-negativas.

Tabla 1. Características de bacterias del CAI.					
Aislado No.	Color	Textura	Borde	Tamaño	Gram
IP003.3	Naranja	Brillante	Regular	Pequeño	Coco-gramnegativo
IP001.8.2	Blanco	Brillante	Regular	Pequeño	Coco-gramnegativo
IP004.28	Rosado	Brillante	Regular	Pequeño	Coco-gramnegativo
IP001.5	Amarillo	Brillante	Regular	Pequeño	Bacilo-gramnegativo
IP001.26	Rosado	Opaco	Regular	Pequeño	Coco-grampositivo
IP002.21	Crema	Brillante	Regular	Pequeño	Bacilo-gramnegativo
IP001.23	Blanco	Brillante	Regular	Pequeño	Coco-grampositivo
IP004.5	Blanco	Mucoide	Irregular	Grande	Coco-gramnegativo
IP002.14.1	Crema	Brillante	Regular	Pequeño	Coco-grampositivo

Psicrotolerancia de los aislados bacterianos seleccionados

Pese a que todos los aislados escogidos fueron capaces de multiplicarse a 12 °C, su crecimiento en medio agar nutritivo a otras temperaturas fue muy variable (Tabla 2). Por ejemplo, algunos de ellos crecieron mejor a 20 °C, mientras que otros fueron

capaces de crecer mejor incluso por debajo de la temperatura a la que fueron aislados, es decir, a 4 °C.

Por otro lado, se observó claramente diferencias en la pigmentación de las colonias bacterianas en función de la temperatura de cultivo (Figura 5). Particularmente interesante fue la observación de que los aislados IP001.8.2, IP001.23 e IP002.14.1 presentan el fenómeno de “swarming” o de expansión de colonia a temperaturas superiores a los 12°C, lo cual causó una clara deformación de la forma de sus colonias.

Tabla 2. Crecimiento bacteriano a diferentes temperaturas en medio Agar Nutritivo.

Aislado No.	4°C	12°C	20°C	30°C
IP003.3	++	+++	+++	+
IP001.8.2	+	++	+++	+++
IP004.28	+++	++	++	++
IP001.5	+	+	+++	++
IP001.26	++	++	+++	++
IP002.21	++	++	+++	+++
IP001.23	++	++	+++	++
IP004.5	++	++	+++	++
IP002.14.1	+	++	+++	++++

(-) sin crecimiento; una cruz (+) poco crecimiento, dos cruces (++) medio crecimiento y a partir de tres cruces (+++) abundante crecimiento.

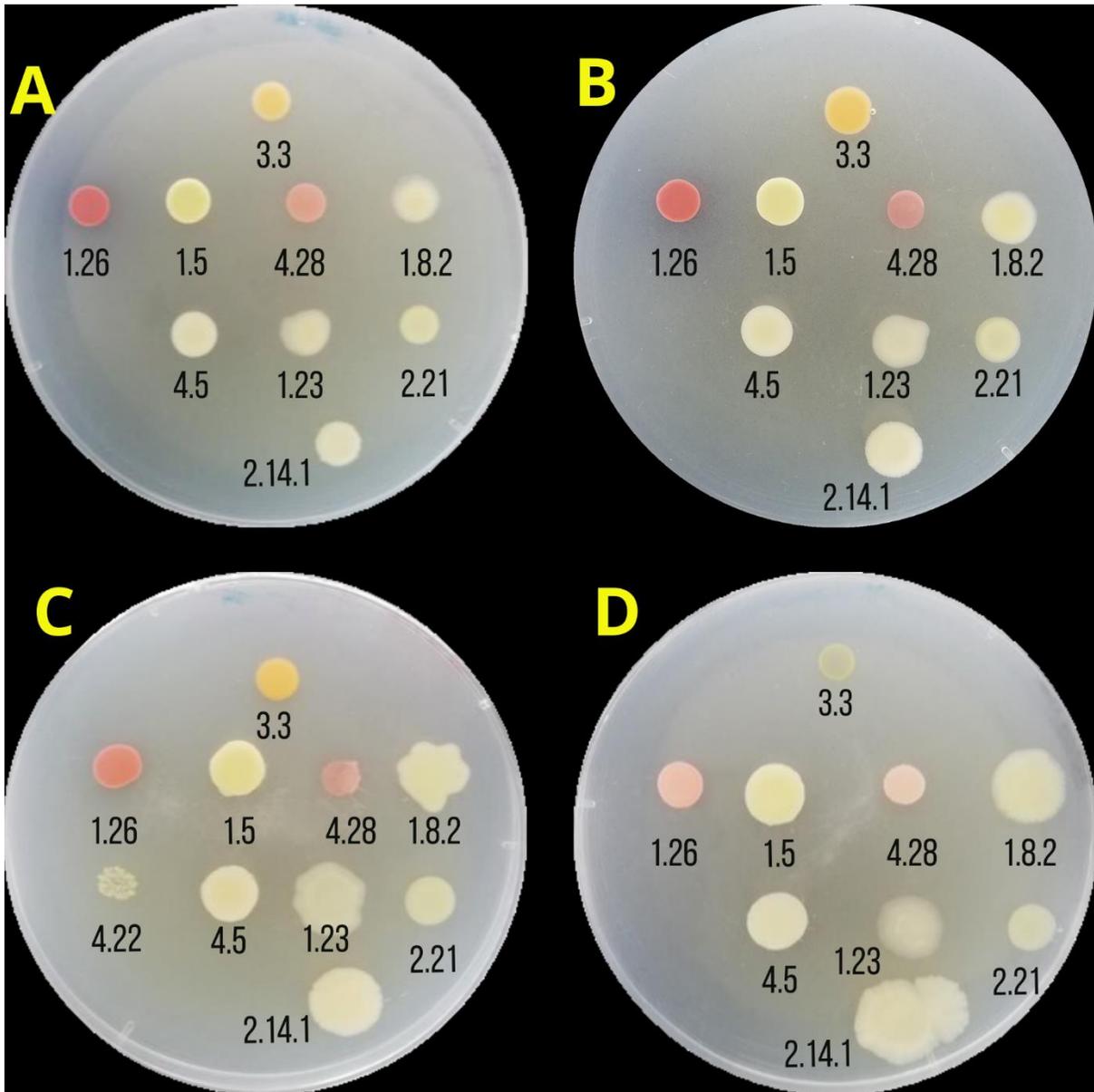


Figura 5. Crecimiento de aislados bacterianos puros en medio agar nutritivo; **A)** 4°C; **B)** 12°C; **C)** 20°C; **D)** 30°C.

Disolución de minerales inorgánicos poco solubles

Pese a que todos los aislados seleccionados se multiplicaron en los medios empleados para valorar la capacidad de disolver minerales inorgánicos poco solubles, la mayoría de ellos fueron incapaces de disolver el fosfato de calcio y el carbonato de calcio con los que se suplementó el medio NBRI, a 20 °C (Tabla 3 y Figura 6). Solo dos de los diez aislados evaluados (IP002.21 e IP001.23) formaron un halo de disolución similar en los medios de cultivo NBRI(P) y NBRI(C), mientras que un aislado (IP001.8.2) solo fue capaz de disolver el carbonato.

Tabla 3. Biolixiviación bacteriana determinada en medios NBRIP y NBRIC

Aislado No.	NBRIP Crecimiento a 20°C	Halo de disolución	NBRIC Crecimiento a 20°C	Halo de disolución
IP003.3	+	-	+	-
IP001.8.2	++	-	++	**
IP004.28	-	-	-	-
IP001.5	++	-	++	-
IP001.26	-	-	-	-
IP002.21	+++	*	+	***
IP001.23	+++	*	++	***
IP004.5	+	-	++	-
IP004.22	+	-	-	-
IP002.14.1	-	-	-	-

Crecimiento bacteriano: (-) sin crecimiento; (+) poco crecimiento; (++) crecimiento medio; (+++) crecimiento abundante.

Diámetro de los halos de disolución: (-) sin halo; (*) 1 mm; (**) >2 mm; (***) >=3 mm.

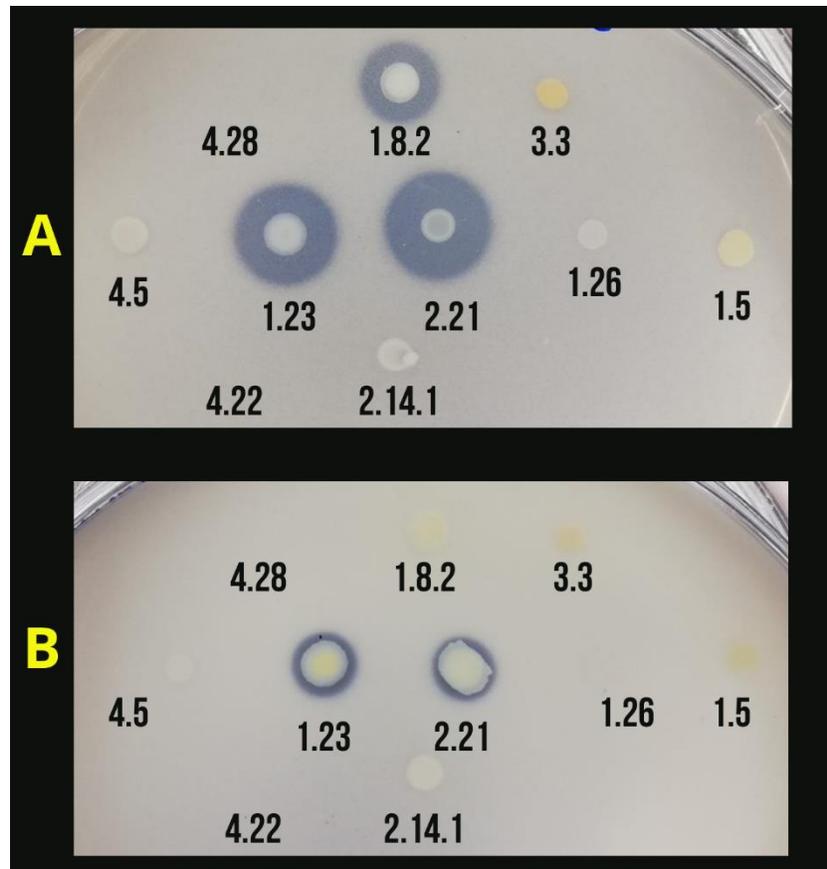


Figura 6. Crecimiento bacteriano y disolución de minerales inorgánicos *in vitro*. a) Medio NBRIP; b) Medio NBRIC

Optimización de reacciones de PCR para amplificación del gen 16S rDNA

Con el fin de establecer las condiciones óptimas de amplificación del marcador molecular 16S rDNA, llevamos a cabo una serie de pruebas preliminares. En la primera de ellas se trabajó con ADN extraído de algunas de las bacterias de CAI (2.21; 3.3; 1.23). Los resultados obtenidos muestran varias bandas de ADN (Figura 7A). Esto sugiere que se amplificaron regiones inespecíficas del genoma. En virtud de este resultado, decidimos estandarizar la reacción de PCR, modificando primero el par de primers empleados (27f-YM y 1492 R), y usando ADN genómico de una cepa de colección (*E. coli*). Como puede verse en la Figura 7B, esto permitió obtener sólo una banda, de la longitud esperada (aproximadamente 1500 pb). De igual forma, variamos la dilución de este ADN que se utilizó como blanco de amplificación

(“ADN diana” o “ADN molde”), diluyendo la solución original 1/10, 1/100 y 1/500 con agua destilada estéril; con ese cambio se observó claramente que usando el ADN genómico a una dilución de 1/500 se obtienen resultados óptimos, resultando una única banda de amplificación perfectamente diferenciada (Figura 7B). Combinando los valores óptimos de ambas variables logramos amplificar el gen que codifica al ARNr 16S a partir del ADN genómico de todos los aislados seleccionados (Figura 7C).

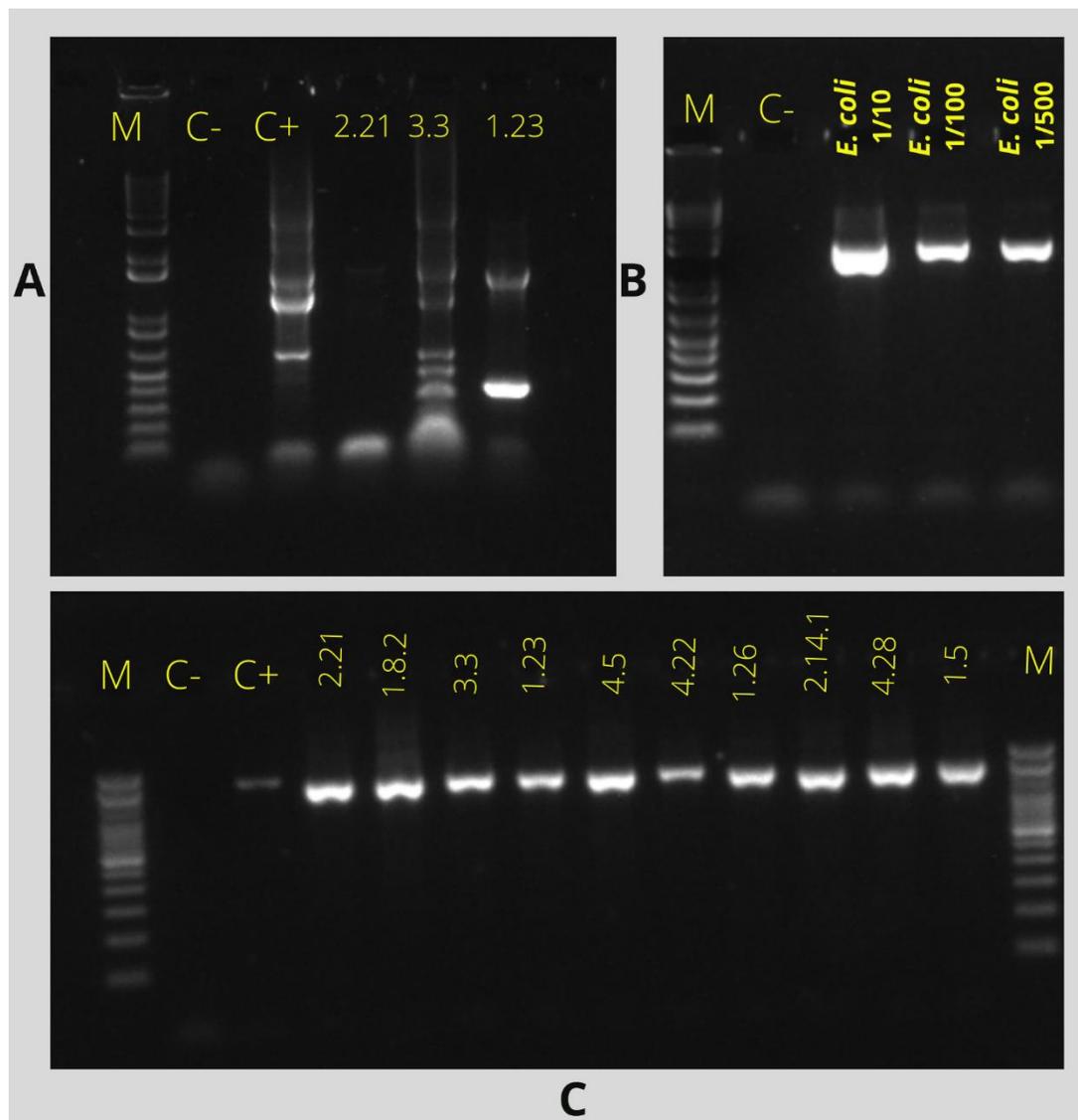


Figura 7. Resultados de la amplificación del gen 16s ADNr. **A)** Primer intento de amplificación por PCR (M: Marcadores de longitud molecular, C+: control positivo, C-: control negativo, ADN de aislados 2.21, 3.3, 1.23); **B)** Segunda estandarización PCR empleando la dilución de ADN de *E.coli* ATCC 25922 y nuevos primers (M:

marcadores de longitud molecular; C-: control negativo); **C**) Amplificación región 16s ADN a partir de ADN genómico de bacterias del Complejo Arqueológico Ingapirca con dilución 1/500 (M: marcadores de longitud molecular, C-: control negativo, C+: control positivo).

Secuenciación de ADN y análisis de secuencias nucleotídicas

Los fragmentos de amplificación (“amplicones”) fueron secuenciados exitosamente por la empresa coreana MacroGen Inc (Anexos 1). A partir de dichas secuencias, y una vez verificada la ausencia de contaminación con otros aislados mediante observación de los electroferogramas (Anexos 2), se realizó el análisis de similitud con las secuencias de ADNr 16S depositadas en GenBank, mediante empleo del programa Blast-N (43). Los resultados de dicho análisis se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Identificación molecular de aislados bacterianos seleccionados del Complejo Arqueológico Ingapirca

Código de aislado	Especie filogenéticamente más cercana /Código de acceso a GenBank	% de identidad	Longitud secuencia (pb)	% de cobertura
IP003.3	<i>Sphingomonas faeni</i> / MW960264.1	98.21%	1011	100%
IP004.5	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i> / KR085846.1	100%	1005	100%
IP004.22	<i>Frondehabitans peucedani</i> / MW507699.1	99.13%	1084	100%
IP001.8.2	<i>Frigoribacterium faeni</i> / NR_026511.1	99.79	959	99%
IP001.26	<i>Arthrobacter agilis</i> / KF924209.1	99.54%	1130	99%
IP002.14.1	<i>[Brevibacterium] frigoritolerans</i> / MK240438.1	98.16%	925	99%
IP004.28	<i>Arthrobacter bussei</i> / MN080869.1	99.90%	1079	100%
IP002.21	<i>Pseudomonas lutea</i> / MK883054.1	99.63%	1137	100%
IP001.5	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> / KF358248.1	97.83%	1139	99%
IP001.23	<i>Pseudomonas koreensis</i> / MT634604.1	96.64%	1093	92%

Como se puede ver en la Tabla 4, la mayoría de las cepas aisladas están filogenéticamente relacionadas con especies de Actinobacterias pertenecientes a los géneros *Arthrobacter*, *Frigoribacterium*, *Frondehabitans* y *Brevibacterium*. Tan

solo dos cepas pertenecen a las clases alfa (*Sphingomonas*) y gamma (*Pseudomonas*) del filum Proteobacteria.

Las secuencias nucleotídicas fueron analizadas empleando la plataforma estadística Mega X. Ello nos permitió alinear las secuencias mediante el programa Muscle (44) y generar un cladograma, que se presenta en la Figura 8. En el mismo se evidencian las relaciones evolutivas entre las cepas bacterianas seleccionadas.

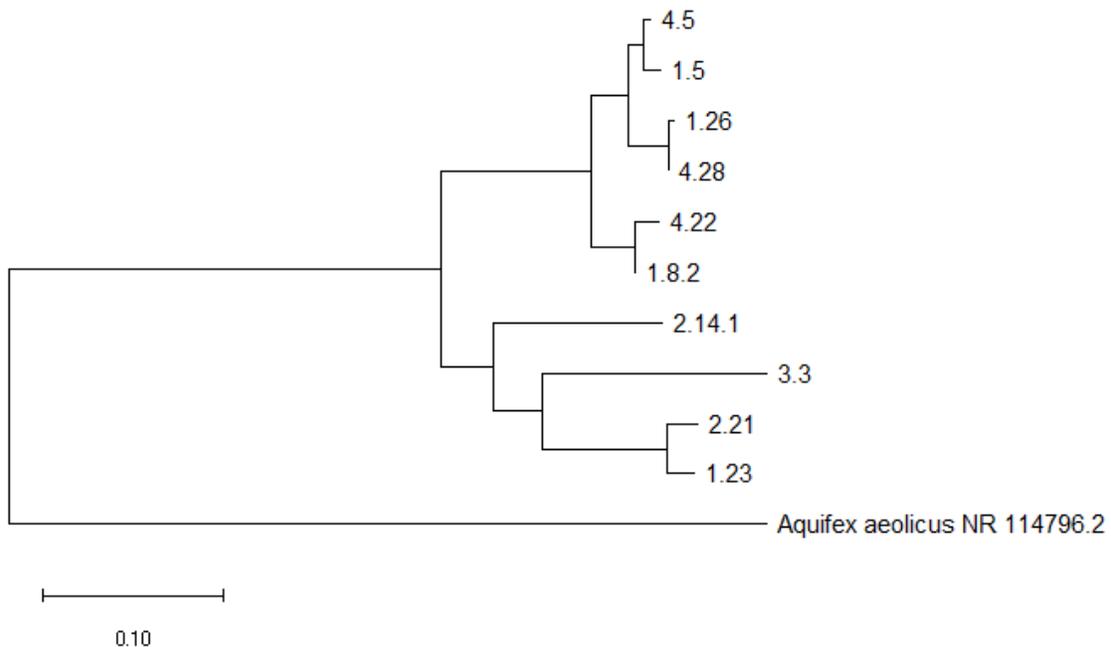


Figura 8. Cladograma de secuencias nucleotídicas de los aislados bacterianos del complejo arqueológico Ingapirca.

Discusión

El biodeterioro de monumentos arqueológicos en zonas de alta montaña, causado por microorganismos psicotolerantes, prácticamente no ha sido estudiado hasta la fecha. Por tal razón, en el presente estudio, nos hemos planteado conocer las características fenotípicas de los microorganismos –en particular las bacterias- que son responsables de dicho proceso. Los resultados obtenidos confirman que las rocas del monumento principal del Complejo Arqueológico de Ingapirca están

colonizadas en forma abundante por diversas especies bacterianas, algunas de las cuales son capaces de multiplicarse a bajas temperaturas. Por otro lado, hemos demostrado que algunas de estas bacterias disuelven activamente sustratos minerales, lo cual podría explicar –en parte- el extenso grado de deterioro del material pétreo. Hasta donde hemos podido revisar, se trata del primer trabajo en su estilo en la región andina que evalúa el biodeterioro de sustratos minerales a tal altitud, y uno de los pocos que se han realizado a nivel mundial (1,33,45).

La abundancia y diversidad de especies bacterianas que hemos podido poner en evidencia no es un hecho totalmente inesperado. En efecto, estudios realizados en diferentes sitios del mundo, mencionan haber identificado varios microorganismos como agentes causales del biodeterioro de monumentos arqueológicos. Este es el caso de México, en donde un grupo de investigadores estudió las superficies rocosas de algunos templos Mayas e identificaron a varios géneros de hongos y bacterias que colonizan las rocas y causan el biodeterioro de las mismas; o el de España e Italia, donde varias de las tumbas de importantes civilizaciones antiguas, se encuentran revestidas por comunidades de microorganismos que fueron identificados por procedimientos de investigación similares a los llevados a cabo por nosotros (11,17,45).

Sin embargo, a diferencia de lo que se ha hecho hasta la fecha, es la primera vez que se consideran parámetros fisiológicos microbianos, tales como la temperatura óptima de crecimiento. Esto se debe a que los trabajos que se han realizado previamente han estado centrados, de manera mayoritaria, en monumentos que se encuentran en regiones húmedas y calurosas, como las selvas centroamericanas o asiáticas (17,15,21,33). En estos ambientes se suelen encontrar microorganismos mesófilos, cuyas temperaturas óptimas de crecimiento raramente son inferiores a los 20 °C. Por el contrario, en regiones con climas fríos, como los que prevalecen en las alturas de las montañas andinas, generalmente se encuentran microorganismos adaptados a dichas condiciones. Destacan los psicrófilos y los

psicrotolerantes, capaces de multiplicarse activamente por debajo de los 10 °C y los 20 °C, respectivamente (3,7,34). Estos microorganismos son capaces de catalizar, de manera directa o indirecta, procesos como la lixiviación de sustratos minerales inorgánicos; esto, a su vez, ocurre en el origen natural de los suelos, pero también en el biodeterioro de monumentos construidos a base de estos mismos minerales (9).

Uno de los mecanismos causantes del biodeterioro es la producción y secreción de ácidos orgánicos, producto del metabolismo microbiano. De hecho, ciertas bacterias que se asocian ampliamente con el biodeterioro, obtienen energía a través de la oxidación directa de la glucosa, lo cual genera como resultado la producción de grandes cantidades de ácido glucónico. Este compuesto es capaz de cambiar el pH de las soluciones, volviéndolas ácida, lo cual causa a su vez la disolución de compuestos poco solubles como los fosfatos, carbonatos y otros (27). Entre este grupo de bacterias que producen ácido glucónico se encuentran las *Pseudomonas*, y su presencia en la superficie de las rocas del monumento principal de Ingapirca podría explicar, en parte, su deterioro (46,47,48).

Por otra parte, y como ya se expuso en la sección de resultados, varios de los aislados bacterianos considerados en este trabajo son psicrotolerantes. Se trata de microorganismos que son capaces de multiplicarse activamente a temperaturas por debajo de los 20 °C, y alcanzar densidades microbianas elevadas. Esta característica les confiere la capacidad de colonizar ambientes fríos, donde participan en todo tipo de procesos y de interacciones ecológicas (49). Las temperaturas bajas obligan a las bacterias a adaptarse a través de la modificación de sus propiedades de replicación, crecimiento, expresión de genes y de proteínas; se supone que esto lo hacen con la finalidad de sus probabilidades de supervivencia frente a las condiciones externas adversas. Algunos estudios relacionan el crecimiento y adaptación microbiana a bajas temperaturas, con varios mecanismos como la disminución de las interacciones internas de las proteínas (es decir, un aumento de su “flexibilidad” molecular), el aumento del contenido de ácidos grasos

no saturados en su membrana, la expresión de ciertos genes, producción de exopolisacáridos y disminución de la pigmentación bacteriana, etc. En el caso de las modificaciones de la membrana celular, se trata de mecanismos que permiten a las bacterias aumentar la fluidez de la misma, con la finalidad de poder replicarse y obtener nutrientes, sin la demanda de mucha energía y aprovechando las fuentes de energía disponibles en su entorno (49,50,51,52).

Entre los resultados que llamaron nuestra atención destacan las diferencias observadas en relación con la producción de pigmentos a diferentes temperaturas. Como ya hemos dicho, algunos autores han señalado que esto se debe a un mecanismo de adaptación a las condiciones externas (temperatura, humedad, luz); es decir, cuando los microorganismos se enfrentan a temperaturas bajas, puede variar la pigmentación, pese a que algunos pigmentos en especial los carotenos le brindan protección a la bacteria frente al daño que causa la radiación UV en su ADN. Sin embargo, se ha sugerido que las variaciones de la pigmentación también pueden deberse a que los pigmentos modulan la rigidez de la membrana, favoreciendo su fluidez a bajas temperaturas (49,50,53,54).

Otro resultado interesante fue la observación de la variación de la morfología de las colonias en función de la temperatura de crecimiento. Esta variación, que se manifestó generalmente por encima de los 20 °C, como proyecciones amorfas de las colonias hacia su periferia, normalmente se asocia con el fenómeno de “swarming” (50,51). Se trata de una propiedad que ciertas bacterias han adquirido durante su evolución, aparentemente como una forma de obtener nutrientes suficientes para su crecimiento y multiplicación. Es decir, este fenómeno se manifiesta fundamentalmente como un mecanismo de supervivencia (55,56).

Los resultados de esta investigación muestran que varias de las especies bacterianas identificadas coinciden con los resultados de trabajos anteriores,

relacionados con el biodeterioro de monumentos arqueológicos. Por ejemplo, en uno de ellos, realizado en el Valle histórico Paulista (São Paulo, Brasil), se identificaron Actinobacterias y Proteobacterias pertenecientes a los géneros *Arthrobacter* y *Sphigonomas*, respectivamente. Pese a que se emplearon métodos metagenómicos para su identificación, llama la atención la coincidencia (57).

De igual manera, en un estudio efectuado en Granada (España) sobre el biodeterioro de la fuente de los Leones de Alhambra, se emplearon técnicas de biología convencional y molecular. Esto permitió; encontrar una gran variedad de microorganismos entre los cuales se encuentran especies del grupo de las Proteobacterias, tales como *Pseudomonas* y *Sphigonomas*, similares a algunos de los aislados encontrados en el complejo Ingapirca (58).

Con los resultados analizados se puede asociar a las Proteobacterias con los procesos de biodeterioro, ya que en varias investigaciones se han encontrado bacterias de este grupo como organismos colonizadores de las estructuras de monumentos. De allí que sea interesante estudiarlas con mayor profundidad, por presentar reincidencia de dichos microorganismos en monumentos arqueológicos de importancia cultural.

En síntesis, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que las bacterias heterótrofas, psicotolerantes, que colonizan la superficie de las rocas con las que está construido el monumento principal del Complejo Arqueológico de Ingapirca, tienen la capacidad de disolver minerales a bajas temperaturas. Esto podría ser una de las causas del biodeterioro que se evidencia en este monumento, y contribuye a comprender los mecanismos microbianos que podrían estar causando el proceso de biodeterioro de dichas rocas. Se trata de información potencialmente relevante, que será útil al momento de definir estrategias de restauración y protección de este y otros monumentos.

CAPÍTULO IV
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

IV.1.- CONCLUSIONES

- Se aisló un grupo de bacterias heterótrofas, cultivables y psicotolerantes, que colonizan la superficie de las rocas con las que se construyó el monumento principal del Complejo Arqueológico Ingapirca.
- Se caracterizó los aislados bacterianos psicotolerantes cultivables, que colonizan las rocas del CAI. Así se determinó que estas bacterias poseen diversidad de fenotipos y de características fisiológicas interesantes como la psicotolerancia.
- Algunos de estos aislados fueron capaces de disolver sustratos minerales relativamente insolubles, lo cual se asoció con la producción de ácidos orgánicos.
- Se identificó, por medio de métodos moleculares, a los aislados puros cultivados a partir de las muestras de las superficies de rocas del Complejo Arqueológico Ingapirca.
- Se determinó que las bacterias procedentes del Complejo Arqueológico Ingapirca están relacionadas desde el punto de vista filogenético.

IV.2.- RECOMENDACIONES

- Informar a las autoridades responsables del cuidado del Complejo Arqueológico Ingapirca, que varias de las bacterias presentes en las superficies de las rocas tienen la capacidad de disolver compuestos minerales poco solubles, lo que es de vital importancia por estar asociado con la meteorización de las rocas.
- Comunicar a la comunidad científica la capacidad de psicrotolerancia que presentan los aislados de las rocas del Complejo Arqueológico Ingapirca, propiedad que es de interés por los nuevos compuestos que se pueden sintetizar a partir de bacterias psicrotolerantes.
- Recomendar que los estudiantes e investigadores de la Universidad Católica de Cuenca y de otras instituciones, hagan uso del banco de bacterias aisladas del complejo arqueológico Ingapirca. Son bacterias psicrotolerantes, característica que es de importancia en la industria (farmacéutica, ambiental, etc.) por la producción de enzimas y compuestos estables a bajas temperaturas. Además, algunas de las bacterias producen pigmentos que también merecen ser estudiados, por tratarse de compuestos químicos o principios activos que pueden ser de utilidad en distintas áreas como nuevos fármacos, en agricultura, biotecnología y más.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hueck HJP. The biodeterioration of materials. International Biodeterioration & Biodegradation. 2001.
2. Koeste RJ, Warscheid T, Nieto F. Biodeterioration: Risk Factor and Their Management. Saving Our Architectural. 1997.
3. Labus M, Bochen J. Sandstone degradation: an experimental study of accelerated weathering. Environmental Earth Sciences. 2012 Abril.
4. Borrego-Alonso S. Los biocidas vegetales en el control del biodeterioro del patrimonio documental. Perspectivas e impacto. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2015 Enero.
5. Cultura INdPy. Instituto Nacional de Patrimonio y Cultura. [Online].; 2017 [cited 2021 Mayo 02. Available from: <https://www.patrimoniocultural.gob.ec/complejo-arqueologico-ingapirca/>.
6. Enza Di Carlo GBaFP. Biodeterioration. In Barresi FP-G, editor. Biotechnology and conservation of cultural heritage. Palermo: Springer; 2017. p. 2-98.
7. Agnes Mihajlovski DS,B,ByDM. An overview of techniques for the characterization and quantification of microbial colonization on stone monuments. Ann Microbiol. 2015.
8. Sameño Puerto M. El biodeterioro en edificios del patrimonio cultural: metodología de evaluación de tratamientos biocidas. Deposito de Investigación Universidad Sevilla. 2018 Diciembre.
9. Gu JD. Microbial colonization of polymeric materials for space applications and mechanisms of biodeterioration: A review. International Biodeterioration & Biodegradation. 2007;; p. 170-179.

10. Herraiz MD. Caracterización de comunidades microbianas en tumbas etruscas y romanas. Repositorio de Universidad de Sevilla. 2015 Mayo.
11. A.Videl H, Guiamet PS, Saravia SGGd. Biodeterioro de materiales estructurales de sitios arqueológicos de la civilización maya. Revista del Museo de La Plata. 2003 Sep 01.
12. Soto DM, Battistoni PB, Guiamet PS. ESTUDIO DEL BIODETERIORO DE LA CERÁMICA ARQUEOLÓGICA DEL VALLE DE ANTINACO CENTRAL, LA RIOJA, ARGENTINA. Revista Electronica Investigación Joven. 2016; 3.
13. Lemus-Espinoza D, Maniscalchi-Badaoui MT, Quereguan R, Morales. BIODETERIORO DEL MONUMENTO RELIGIOSO ARQUITECTÓNICO “SAN ANTONIO DE PADUA”, CLARINES, ANZOÁTEGUI, VENEZUELA. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente. 2012 Junio-enero; 24: p. 98-102.
14. Galindo-Alcázar O, Medina-Jaritz NB, Garduño-Solórzano G, Olvera-Ramírez R. Cianobacterias y microalgas de biopelículas superficiales de la zona arqueológica de Malinalco, México. Scielo. 2018 enero.
15. Aguilera LP, Zapata JN, Cruz EDI. Aislamiento e identificación de microorganismos en biopelículas provenientes del Castillo de Chapultepec, Ciudad de México. Nexa revista científica. 2011 diciembre.
16. Rios Adl. Biodegradation and conservation of historic sanctuary of Machu Pichu. In the XVI internacional biodeterioration and biodegradation symposium; 2014; Polonia. p. 58.
17. Email SSM, Ibrahim SE. Characterization and Management of Fungal Deterioration of Ancient Limestone at Different Sites Along Egypt. Revista egipcia de microbiología. 2018;; p. 177-191.

18. Cappitelli F, Principi M P, Pedrazzani R, Toniolo L, Sorlini C. Bacterial and fungal deterioration of the Milan Cathedral marble treated with protective synthetic resins. *Science of the Total Environment*. 2007.
19. CASTRO RDT, LOPEZ ALB. ENFOQUE QUÍMICO DEL DETERIORO Y BIODETERIORO DE ROCAS CALCÁREAS CONFORMANTES DE MONUMENTOS PATRIMONIALES DE IMPORTANCIA HISTÓRICA Y CULTURAL. *Revista Luna Azul*. 2013 Enero.
20. Th.Warscheida , J.Braams. Biodeterioration of stone: a review. In Th.Warscheida , J.Braams. *Biodeterioration of Cultural Property 2, Part 2.*; 2000. p. 343-368.
21. Sterflinger K, Piñar G. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art — tilting at windmills? *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013 Octubre.
22. Gamboa Osorio: J.P. LG, A. NI, J. NE, B. N. LOS LÍQUENES Y LA DEGRADACIÓN/CONSERVACIÓN DEL PATRIMONIO ARQUITECTÓNICO. *Revista de Biología, UVIGO*. 2016;: p. 76-87.
23. Ascaso C, Wierzechos , Rios SEdl, Rodrigues JD. In situ evaluation of the biodeteriorating action of microorganisms and the effects of biocides on carbonate rock of the Jeronimos Monastery (Lisbon). *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2002 Enero; 49: p. 1-12.
24. Alquiza DMJPy, Zubia DVY. Universidad de Guanajuato. [Online].; 2015 [cited 2021 06 09. Available from: <https://www.ugto.mx/eugreka/contribuciones/104-los-liquenes>.

25. Arp DJ, Sayavedra-Soto LA, Hommes NG. Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Archives of Microbiology* volume. 2002 Octubre;: p. 200-250.
26. Ramírez D. N, Serrano R. JA, Sandoval T. H. Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2006 Septiembre; 37.
27. Prieto-Correal GC, Prada-Salcedo LD, Cuervo C, Correa MF. Evaluación de la producción de ácidos orgánicos por *Streptomyces* spp. y solubilización de tres fuentes de fósforo por la cepa T3A. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 2015 Junio; XVII: p. 111-121.
28. Ortega-Morales BO. Cyanobacterial diversity and ecology on historic monuments in Latin America. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2006 Abril-Junio; 48: p. 188-195.
29. Crispim CA, Gaylarde CC. Cyanobacteria and Biodeterioration of Cultural Heritage: A Review. *Microbial Ecology*. 2005 Enero;: p. 1-9.
30. Erica Mejía LOJO. Microorganismos Hierro–Azufre Oxidantes Una Alternativa Biotecnológica. *Revista CINTEX*. 2014.; 19: p. 63-77.
31. Laiz L, Pañar G, Lubitz W. The colonisation of building materials by microorganisms as revealed by culturing and molecular methods. *Molecular Biology and Cultural Heritage*. 2017.
32. Tiano P. Biodeterioration of Stone Monuments a Worldwide Issue. *The Open Conference Proceedings Journal*. 2016; 7.

33. Perito B, Cavalieri D. Innovative metagenomic approaches for detection of microbial communities involved in biodeterioration of cultural heritage. Conf. Series: Materials Science and Engineering. 2018; 364.
34. Urzú C, Albertano P. [28] Studying phototrophic and heterotrophic microbial communities on stone monuments. In Doyle RJ, editor. Methods in Enzymology.; 2001. p. 340-355.
35. Oña J. LAS BACTERIAS PUEDEN SALVAR AL PLANETA. Artículo Bibliográfico. Quito: UDLA, BIOREMEDIACIÓN; 2015.
36. MARTÍNEZ VA. EVALUACIÓN DEL EXOPOLISÁCARIDO PRODUCIDO POR UNA BACTERIA PSICROTOLERANTE AISLADA DEL NORESTE DE MÉXICO Y SUS POTENCIALES APLICACIONES UNIVERSALES. Repositorio Universidad. 2015.
37. Oliart-Ros RM, Manresa-Presas Á, Sánchez-Otero MG. Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. CienciaUAT. 2016 Diciembre.
38. Bolivar AM, Rojas A, Garcia Lugo P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. Avances en Biomedicina. 2014 Abril; 3(1).
39. Nautiyal CS. Un medio de crecimiento microbiológico eficaz para la detección de microorganismos solubilizadores de fosfato. Cartas de microbiología de FEMS. 1999 Enero.
40. Dilhari A, Sampath A, Gunasekara C, Weerasekara D, Sissons C, McBain A, et al. Evaluation of the impact of six different DNA extraction methods for the representation of the microbial community associated with human chronic wound infections using a gel-based DNA profiling method. Springer. 2017.

41. Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, Olsen GJ. Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008; 74: p. 2461-2470.
42. Information NCfB. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). U. S. National Library of Medicine. .
43. S F Altschul WGWMEWMDJL. Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol*. 1990.
44. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 2004; 32: p. 1792-1797.
45. Dakal TC, Arora PK. Evaluación del potencial de las técnicas moleculares y físicas en el estudio del biodeterioro. *Reseñas en Ciencias Ambientales y Bio / Tecnología*. 2012.
46. Christine C. Gaylarde PMG. A comparative study of the major microbial biomass of biofilms on exteriors of buildings in Europe and Latin America. In *Biodegradation IB&..*; 2005. p. 131-139.
47. X.Ariñoa , A.Gomez-Boleab , C.Saiz-Jimenez. Lichens on ancient mortars. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1997; 40(2): p. 217-224.
48. Pratibha Rawat SDDS, Shankhdhar. An overview of techniques for the characterization and quantification of microbial colonization on stone monuments. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition volume*. 2020; 21(49-68).
49. Pikuta EV, Hoover RB. *Microbial Extremophiles at the Limits of Life*. National Space Sciences and Technology Center/NASA, Astrobiology Laboratory, Huntsville,Alabama, USA. 2007.

50. Pieter De Maayer 1 DACCDAC. Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles. PMID. 2014.
51. 1 MKC. Mechanism of bacterial adaptation to low temperature. Journal of biosciences. 2006.
52. Banerjee A, Gupta P, Nigam V, Bandopadhyay R. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitat of Southern Ocean: Production and partial characterization. Scielo. 2019 Diciembre; 83.
53. Kumar A, Vishwakarma HS, Singh J, ShipraDwivedi , Kumar M. MICROBIAL PIGMENTS: PRODUCTION AND THEIR APPLICATIONS IN VARIOUS INDUSTRIES. INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL, CHEMICAL AND BIOLOGICAL SCIENCES. 2015.
54. Kumar R, Singh D, Swarnkar MK, Singh AK, SanjayKumar. Complete genome sequence of *Arthrobacter alpinus* ERGS4:06, a yellow pigmented bacterium tolerant to cold and radiations isolated from Sikkim Himalaya. Journal of Biotechnology. 2016.
55. Ariel G,RA,BS. Enjambre de bacterias migran por Lévy Walk. Springer. 2015.
56. Petrovskii S, Mashanova A, Jansen VA. Variation in individual walking behavior creates the impression of a Lévy flight. Edited by Alun Lloyd, North Carolina State University. 2010 Octubre.
57. Fazio A|MLF|PPM|TA|SJC|SAMd|FDLA. Metagenómica en la identificación de microorganismos que producen biodeterioro: patrimonio edificado con arquitectura en tierra, Vale Histórico Paulista (São Paulo, Brasil). CICDigital. 2017.

58. Arroyo MISaAMGaVMRaDAMal. Biodeterioration of the Lions Fountain at the Alhambra Palace, Granada (Spain). *Building and Environment*. 2006; 41(12).

ANEXOS



Anexo 1. Secuencias Nucleotídicas

>IP003.3 (1323)

ACGAGCTACACCGTGGTCGCCTGCCTCTCTTGCGAGTTAGCGCAACGCCT
TCGGGTGAATCCAACCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCTG
GGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGCC
TTCATGCTCTCGAGTTGCAGAGAACAATCCGAACTGAGACGGCTTTTGA
GATTAGCTCACACTCGCGTGCTTGCTGCCACTGTCACCGCCATTGTAGC
ACGTGTGTAGCCCAGCGCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCA
CCTTCCTCCGGCTTATCACCGGCGGTTCTTTAAAGTGCCCAACTAAATG
ATGGCAACTAAAGGCGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT
CTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTGCAGGTCCCC
GAAGGGAAGAAATCCATCTCTGGAAGTCGTCCTGCCATGTCAAACGCTGG
TAAGGTTCTGCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTG
CAGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGGCCGTA CTCCCCA
GGCGGATAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACCCAAACACCAAGTGTCCGG
ACAGCTAGTTATCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT
GTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCACCGTCAATACATGTCCAGTCAGC
CGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCCGAATATCTACAAATTTACCTCTACA
CTCGGAATTCCACTGACCTCTCCATGATTCAAGCGATGCAGTCTAAAAAG
GCAATTCCGGAGTTGAGCTCTGGGCTTTCACCTCTTACTTACAAAGCCGC
CAACGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCCAAAAAACGCTTGCTCCCTCCC
TAATAACCGCGGCTGCTGGGCACGGAATTTGCCGGA ACTTATTCTCCCGG
TACTGTCATTATCAACCCCGGGTAAAAAAACTTTTACAACCCTTAAGGC
CTTTTTCAATTCAAGCGGGCATTGTGGGAAAAAGGCTTTTCCCCATGGC

CAAAATCCCCCAAGGTCCCCCCCCGAAAAAATTGGGGGGGGGGTCTAAA
TCCCCTGGGGGGGTGAAAAAACCCCCCTTAAAAAACAAAAAGGGGGGG
GGCGGGGGGGGCCCTTTTCCACACCACCCACCCAAAAACCCCCACCCG
GGGGCCCCCCCCCGGGGGAAAAAATTTTTGGAATAAATTTTCCCCC
CCCCGGGTAAAAAACCTTTTT

>IP004.5 (1288)

GAAACTGGCAGTCACTTCGACAGCTCCCTCCCACAAGGGGTTAGGCCACC
GGCTTCGGGTGTTACCAACTTTTCGTGACTTGACGGGCGGTGTGTACAAGG
CCCGGGAACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACT
CCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACTGAGACCGGCT
TTTTGGGATTAGCTCCACCTCACAGTATCGCAACCCTTTGTACCGGCCAT
TGTAGCATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCCG
TCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCTATGAGTCCCCACC
ATCACGTGCTGGCAACATAGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAA
CCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTAAAC
CGACCGCAAGCGGGGCACCTGTCTCCAGGCGTTACCGGTTTCATGTCAAGC
CTTGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGC
TTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACT
CCCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTACGGCGCGGAAAACGTGGAAT
GTCCCCACACCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATC
TAATCCTGTTCGCTCCCCATGCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTAATGCC
AGAGACCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTTCAC
CGCTACACCAGGAATTCCAGTCTCCCCTACATCACTCTAGTCTGCCCGTA

CCCACCGCAGATCCGGAGTTGAGCCCCGGACTTTCACGGCAGACGCGACA
AACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCGCC
CTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGC
AGGTACCGTCACTTTTCGCTTCTTCCCTACTGAAAGAGGTTTACAACCCGA
AAGGCCGTCATCCCTCAAGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTG
TGCAATATTCCCCACTGGTGCCTCCCTAAGAATCTGGGGCGGGGTTTCAA
TCCCCCGGGGGCGGGCACCCCCTCAGGCGGGGACCCCCGCTTCGCCCTG
GGTAGCCCTTTCCTCCCCACAAGCTGAAAGGGCGGGGGTCTTCCAAA
ACCAAAAAGATTTTCCCCCCCCCGGGGGGAGAAA

>IP004.22 (1533)

AGGCATCGTATCACCTTCGACAGCTCCCTCCACAAGGGTTGGGCCACCGG
CTTCGGGTGTTACCGACTTTCATGACTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC
CGGGAACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCC
GACTTCATGAGGTGCGAGTTGCAGACCTCAATCCGAACTGAGACCGACTTT
TTGGGATTGCTCCACCTCGCGGTATTGCAGCCCTTTGTATCGGCCATTG
TAGCATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATC
CCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCTATGAGTTCCCACCAT
AACGTGCTGGCAACATAGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC
CAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATACCG
ACCTTGCGGGGCGACCATCTCTGGACGTTTCCGGTATATGTCAAGCCTTG
GTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGT
GCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCC
AGGCGGGGAACCTAATGCGTTAGCTGCGACACAGAAACCGTGGAATGGCC

CCTACATCTAGTTCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAAT
CCTGTTTCGCTCCCATGCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAACGGCCCAGAG
ATCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCT
ACACCAGGAATTCCAATCTCCCCTACCGCACTCTAGTCTGCCCGTACCCA
CTGCAGGCTGGGGGGTTGAGCCCCCAGATTTACAGCAGACGCGACAAAC
CGCCTACGAGCTCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTGGCACCCTA
CGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTTTTCTGCTGG
TACCGTCAAGAGCAAGCTCCCTTCTCCCAACTAAAAGAGGTTACAACCCG
AAGGCCGTCGTCCCTCAAGCGGCGTTGCTGCATCAGGCTTTTCGCCATTG
TGCAATATTCCCCCTGCTGCCTCCCCGAAGAAATTGGGGCGGGGCTCAAT
CCCCGTGGGGCGGGTACCCTTTCAGGCGGGGAACCGCCGGCGGGGTGGGG
GAGCCGTTCTCCCCAAAACCGAGAAGGGGGGAGGCCTCCTTGACAAAAT
TTTTCCCCGCGAAAAAACCCCCGGGAAAAACGGGTAAAATCTTTCCCTT
TCAAAACAAGGGGGGTCCGGTTTTCCCTCCCTACCGAAAAGCCTCCTTA
TTGGACTGGGGGGGGGGCGCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAATAATAAAAAAAAAATAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAACCCCCCCCCCTCGTGTCGTGGACGGAAATAGATACC
CCCCCGCACTGCCTTAATTAAGAATTTATGGA

>IP001.8.2 (1315)

CCATCGATCACTTCGACAGCTCCATCCACAAGGGTTAGGCCACTGGCTTC
GGGTGTTACCGACTTTCATGACTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGG
AACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACT
TCATGAGGTTCGAGTTGCAGACCTCAATCCGAACTGAGACCGGCTTTTTGG

GATTCGCTCCACCTTACGGTATCGCAGCCCTTTGTACCGGCCATTGTAGC
ATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCA
CCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCTATGAGTTCCCACCATAACG
TGCTGGCAACATAGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAAC
ATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATACCGACCT
TGCGGGGCGACCATCTCTGGACGTTTCCGGTATATGTCAAGCCTTGGTAA
GGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGG
GCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGC
GGGGA ACTTAATGCGTTAGCTGCGACACGGAGACCGTGGAATGGCCCCCA
CATCTAGTTCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTG
TTCGCTCCCCATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCCAGAGATCT
GCCTTCGCCATCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACAC
CAGGAATTCCAATCTCCCCTACCGCACTCTAGTCTGCCCGTACCCACTGC
AGGCTGGGGGTTGAGCCCCAGATTTACAGCAGACGCGACAAACCGCCT
ACGAGCTCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGACCCTACGTAT
TACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCCGTGCTTTTTCTGCAGGTACCG
TCACTTTCGCTTCTTCCCTACTAAAAGAGGTTTACAACCCGAAAGGCCGT
CATCCCTCAAGCGGCGTTTCTGCATCAGGGTTTTGCCATTGTGCAAAT
TCCCCCTGGTGCCTCCCCTAAGAAGACTGGGGCGTGGTTTCATTCCCCCG
GTGGGCGGGGACCCCTCAGGCGGGGAACCTTCTTTCCCCTGGGGGGGC
CTTTCCTCCCCACCAACTTAAAAGGCGCGGGGTCTCCTCCCTTGACCAAAT
CTTTTCAATCCCAAGCCCGGCGGGGGAAGAAGGGAACCCGGGATAAAACC
CCTTTTTTGGGGTAT

>IP001.26 (1307)

AGGACTGCTGTCACTTCGACGGCTCCTCCCACAAGGGGTTAGGCCACCGG
CTTCGGGTGTTACCAACTTTCGTGACTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC
CGGGAACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCC
AACTTCATGAGGTGAGTTGCAGACCTCAATCCGAACTGAGACCGGCTTT
TTGGGATTAGCTCCACCTCACAGTATCGCAACCCTTTGTACCGGCCATTG
TAGCATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCGTC
CCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCCATGAGTCCCCGGCAT
AACCCGCTGGCAACATGGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC
CAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTAAACCG
GCCACAAGTGGCTGACACATCTCTGCATCATTCCGGTTCATGTCAAGCCT
TGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTT
GTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCC
CCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTACGGCGCGGAAAACGTGGAATGT
CCCCACACCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTA
ATCCTGTTGCTCCCCATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGCCCAG
AGACCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCG
CTACACCAGGAATTCCAGTCTCCCCTACTGCACTCTAGTCTGCCCGTACC
CACCGCAGATCCGGAGTTAAGCCCCGGACTTTCACGGCAGACGCGACAAA
CCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCGCCCT
ACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAG
GTACCGTCACCAACCCAAAAAGCCGGCTTCTTCCCTACTGGAAGAAGGTT
TACAACCCGAAGGCCTTCATCCCTCAAGCGGCGTCGCTTCATCAGGGTTG
CGCCATTGTGCAAATTCCCCCTGCTGCCTCCCGAAGAACTGGGGCGG

GGTTCAATCCCCGGGGGGGCGGGGACCCTTTAGGGGGGGACCCGCGCTC
GCCCTGGGTGGGCCTTACCCCCCAAAAAGTAAAGGGGGGCGGGTCCTTC
CAAAACAAAAGTTTTCCCCAAAAGGGGGGCGCCCAAAGGCGTATCTGTT
TTAAAAC

>IP002.14.1 (1586)

CAACATTCTGTCACTTAGGCAGGCTGGCTCCATGAAGGTTACCTCACCGA
CTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC
CGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCG
GCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGAAGAATGGCTTTA
TGGGATTCGCTTACCTTCGCAGGTTTGCAGCCCTTTGTACCATCCATTGT
AGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCC
CCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGA
ATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAA
CATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTC
CCCCGAAGGGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACC
TGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAAATTAACCACATGCTCCACCGCTT
GTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCC
CCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGGCGGAAACCC
TCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGAAGTACCAGGGTATCTAA
TCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTGAGTTACAGACCAGA
AAGTCACCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCAGTCTCTACGCATTTACCGCT
ACACATGGAATTCCACATTCCTCTTCTGCACTCATGTTCCCCATTTTTCA
ATGACCCTCCACGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAACGAACT

ACGTGCGCGCGCTTTACCCCAAATAATTACAAGACAAAGCTTGCCCACTA
TAAATAACCCCGCAGTAGAAAATAGTCTTACCTGTGTTATTCTGTTAGG
GTCTCCAAAGGGGAAAAATTGTTATCGGCACTTTCTTTACTTAAATGTAT
ACAAAAAATAATGAGTGCTTGTTGACGGGTAGTTTTACTTACCTGATT
TACTATCTGCGATCCTCTTCACGAATATCCCTAAAAATGATTAGTTTGG
TAGTGTATAATACTAACGATTAACCTCTTTAATTAATTGACAAAATATGT
ATTAAAATTTTTATACTCAATATTATGTAATGGCGGGAGGTCACTCATT
CTTTTTCTAGTAATGATGGAATATATTAACCACTTCATGGCCTCCAACCT
CAAATATTTTTTAACCGCGTTATGTAGAATTATGCTTCCTGCGATCTC
CGCTATTACATTATAATTAATGAGCTGCTCCTTAAATGGTCTCCAAATTT
ATTGAATAAGCTAATACGCGTCATAATAATATTGGGATAATGATTAATA
ATAAACTAATGAATATATTTAACTTTATCATATTATATTTGTGCTCATAT
CCATATTAATGACCAGCATTATTGTAATAATACTAAAATTCTTTATTGT
AATTTATTATAATATTATATATGTGAAATGTTAGAA

>IP004.28 (1304)

AGACTGCGGTCACCTTCGACGGCTCCCTCCCACAAGGGGTTAGGCCACCG
GCTTCGGGTGTTACCAACTTTCGTGACTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGC
CCGGGAACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTC
CAACTTCATGAGGTCGAGTTGCAGACCTCAATCCGAACTGAGACCGGCTT
TTTGGGATTAGCTCCACCTCACAGTATCGCAACCCTTTGTACCGGCCATT
GTAGCATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCGT
CCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCCATGAGTCCCCGGCA
TAACCCGCTGGCAACATGGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC

CCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTAAACC
GGCCACAAGTGGCTGACACATCTCTGCATCATTCCGGTTCATGTCAAGCC
TTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCT
TGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGGCCGTACTC
CCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTACGGCGCGGAAAACGTGGAATG
TCCCCCACACCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCT
AATCCTGTTCGCTCCCCATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGCCCA
GAGACCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTTCACC
GCTACACCAGGAATTCCAGTCTCCCCTACTGCACTCTAGTCTGCCCGTAC
CCACCGCAGATCCGGAGTTAAGCCCCGGACTTTCACGGCAGACGCGACAA
ACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCGCCC
TACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCA
GGTACCGTCACCAACCCAAAAGGCCGGCTTCTTCCCTACTGGAAGAAGGT
TTACAACCCGAAGGCCTTCATCCCTCAAGCGGCGTGCCTTCATCAGGGTT
GGGCCATTGTGCAAAATTCCCCCTGCTGCCTCCCGAAGAGATTGGGGCG
GGGTTCAATCCCCCGGGGGGGCGGGGCCCCCCTCAGGCGGGGAACCCTCC
TCGCCCTGGGTGGGCCTTACCCCCCAAAAAGTAAAGGGCGCGGGTCTCCT
TCCAAAACAAAAGATTTTCCCCAAAAGGGGGGGGCCAAAAGGGTTCCG
TTTA

>IP002.21 (1269)

AAGCTGATCAACCGTGGTACCGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTC
TGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGG
AACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTT

CACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTCTGGG
ATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCA
CGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCAC
CTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCTTAACGT
GCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACA
TCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCC
CGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCATTGGATGTCAAGGCCTGGT
AAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGC
GGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTIONCCCCAG
GCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAAGCTCAAGGCTTCCAA
CGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTG
TTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTCAGTATGAGCCCAGGTGGTC
GCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACAC
AGGAAATTCCACCACCCTCTGCCCTACTCTAGCTTGCCAGTTTTGGATGC
AGTTCCCAGGTTGAGCCCCGGGGATTTACATTCAACTTAACAAACCACCT
ACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCCACCCTCTGTAT
TACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTTCGGTAACG
TCAAAACAGCGAAGTATTAATTAGCTGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGC
TTTACAATCCGAAGAACCTTCTTACACACGCGGCAGGGCTGGATCAGGC
TTTCGCCCATTTGTTCAATATTCCCCCTGGCTGCCTCCCGCAAGAAATCTG
GAACCGGGGTTTCAATTCCCGGTGGACGGAACAACCCCCCAAACAGATT
ACGGAAAGGTCGCCCTGGGGGAACCATTACCCCCCAACAACTTAATCC
CACCTAGGGCCTTTGAAA

>IP001.5 (1255)

TGGA CTGGCGGTC ACTTCGACGGCTCCCCCACAAGGGTTAGGCCACCGG
CTTCGGGTGTTACCAACTTTTCGTGACTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC
CGGGAACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCC
GACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACTGAGACCGGCTTT
TTGGGATTAGCTCCACCTCACAGTATCGCAACCCTTTGTACCGGCCATTG
TAGCATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCGTC
CCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCTATGAGTCCCCGCCAT
AACGCGCTGGCAACATAGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC
CAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTAAACCG
ACCGCAAGCGGGGCACCTGTTTCCAGGTATTACCGGTTTCATGTCAAGCCT
TGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCGCTT
GTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCC
CCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTACGGCGCGGAAAACGTGGAATGT
CCCCACACCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTA
ATCCTGTTGCTCCCCATGCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGCCCAG
AGACCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCG
CTACACCAGGAATTCCAGTCTCCCCTACTGCACTCTAGTCTGCCCGTACC
CACTGCAGAACCGGAGTTGAGCCCCGGTCTTTCACAGCAGACGCGACAAA
CCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCGCCCT
ACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAG
GTACCGTCACTTTTCGCTTCTTCCCTACTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAA
GGCCGTCATCCCTCAAGCGGCGTGCCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTG
CAATATTCCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAATCTGGGGCGGGGTCTCAAT

CCCCAGGGGGGGCGGGCACCTCTCAGGCCGGGTACCCCTCCTCGCCCTG
GTGGGGCCTTACCCACCCACAACTGAAAGGGGGCGCGGGGTCTTCCAA
AAAAA

>IPOO1.23 (1245)

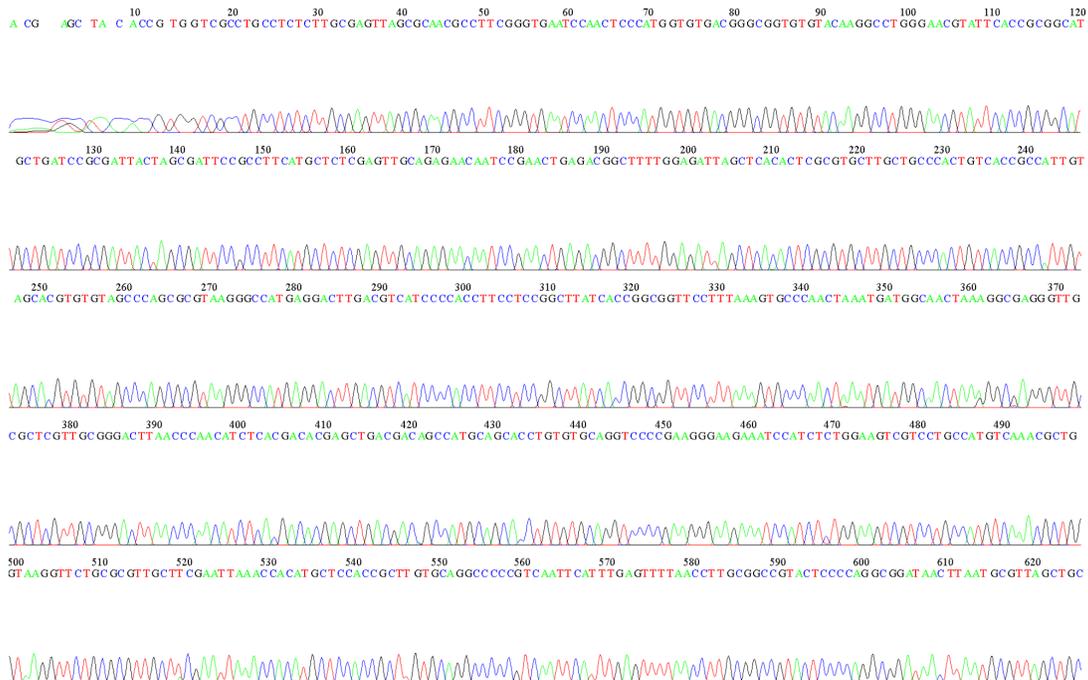
ACATTTTGATCAACCGTGGTACCGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACT
TCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCG
GGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTGCGGATTACTAGCGATTCCGAC
TTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATG
GGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTTTGTACCGACCATTGTAG
CACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCC
ACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCACCATAAC
GTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAA
CATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTT
CCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCATTGGATGTCAAGGCCTG
GTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGT
GCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCC
AGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCC
AACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCC
TGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTCAGTATCAGTCCAGGTGG
TCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTAC
ACAGGAAATTCCACCACCCTCTACCATACTCTAGCTTGCCAGTTTTGGAT
GCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCA ACTTAACAAACCAC
CTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGT

ATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTCGGTAA
 CGTCAAATTGCAGAGTATTAATCTACAACCCTTCCTCCCACTTAAAGT
 GCTTTACAATCCGAAGAACTTCTTACACACGCGGCAGGGCTGGATAAGG
 CTTTCGCCATTGTCCAAAATTCCCCCTGGTGCCTCCCGCAAGAAGACGG
 GACCGGGTGTTAATTTCCCTGGGGACGGATAATCCCCTCCAAAAATTA
 GAAGAGCCGCCCTGGTGGAGCCTTTTCTCCCCACAAAGTTAATC

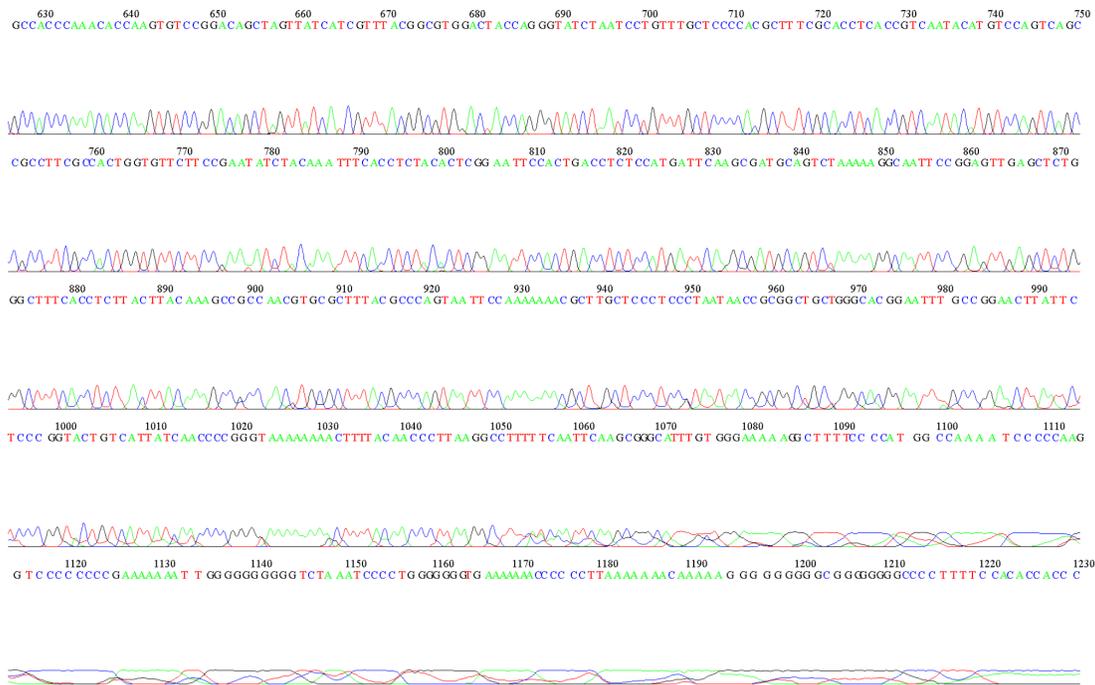
Anexo 2. Electroferograma

3.3

File: 21_1492R.ab1 Run Ended: 2021/4/23 19:24:17 Signal G:727 A:851 C:2169 T:1282
 Sample: 21_1492R Lane: 12 Base spacing: 16.263977 1323 bases in 16142 scans Page 1 of 2

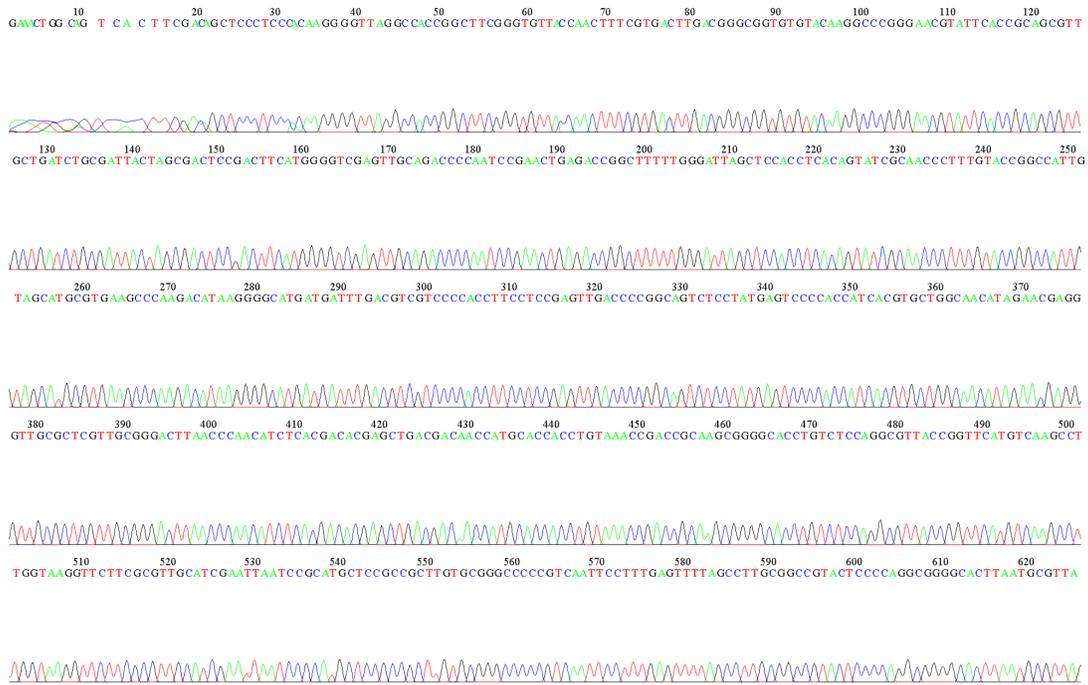


File: 21_1492R.ab1 Run Ended: 2021/4/23 19:24:17 Signal G:727 A:851 C:2169 T:1282
Sample: 21_1492R Lane: 12 Base spacing: 16.263977 1323 bases in 16142 scans Page 2 of 2

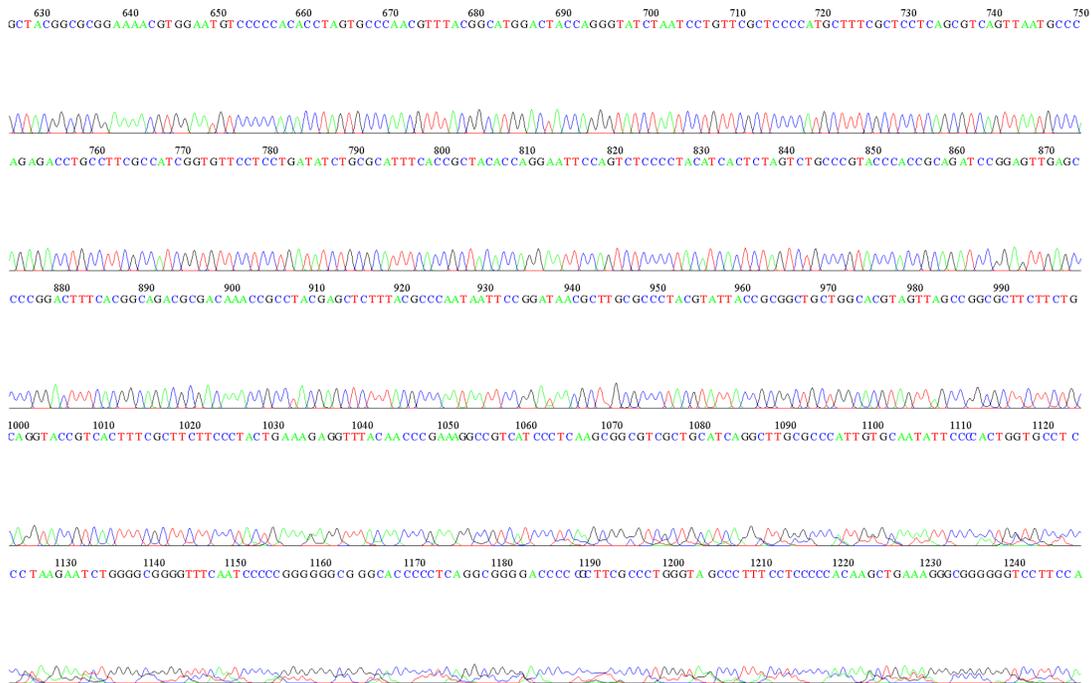


4.5

File: 27_1492R.ab1 Run Ended: 2021/4/23 19:24:17 Signal G:2083 A:2322 C:4972 T:3299
Sample: 27_1492R Lane: 8 Base spacing: 16.139399 1288 bases in 15491 scans Page 1 of 2

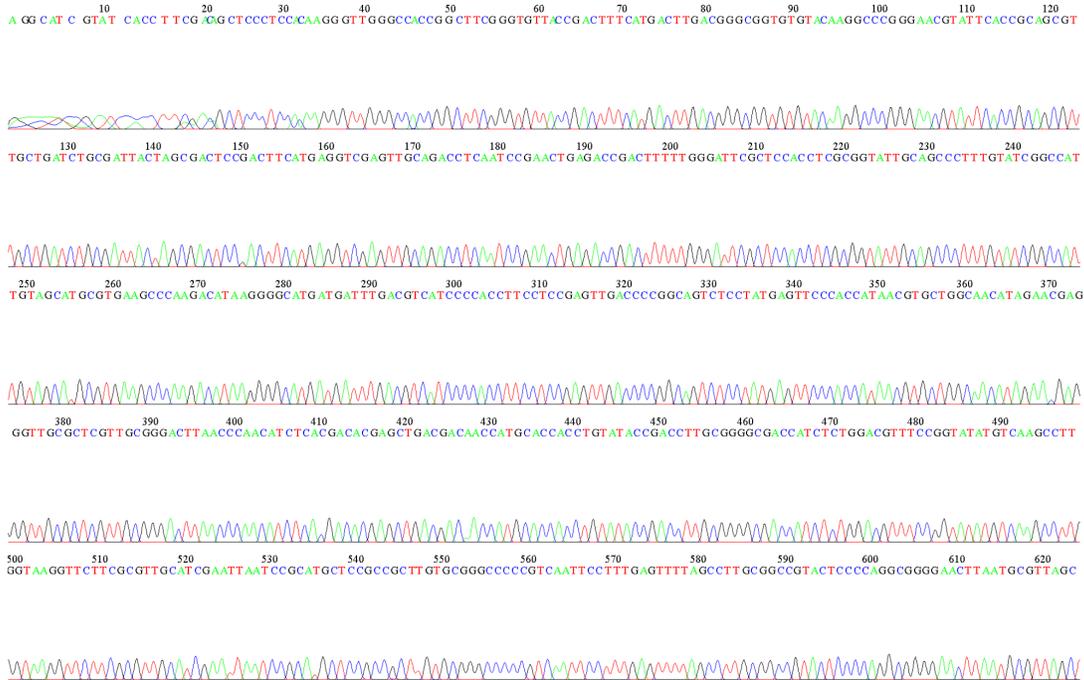


File: 27_1492R.ab1 Run Ended: 2021/4/23 19:24:17 Signal G:2083 A:2322 C:4972 T:3299
Sample: 27_1492R Lane: 8 Base spacing: 16.139399 1288 bases in 15491 scans Page 2 of 2

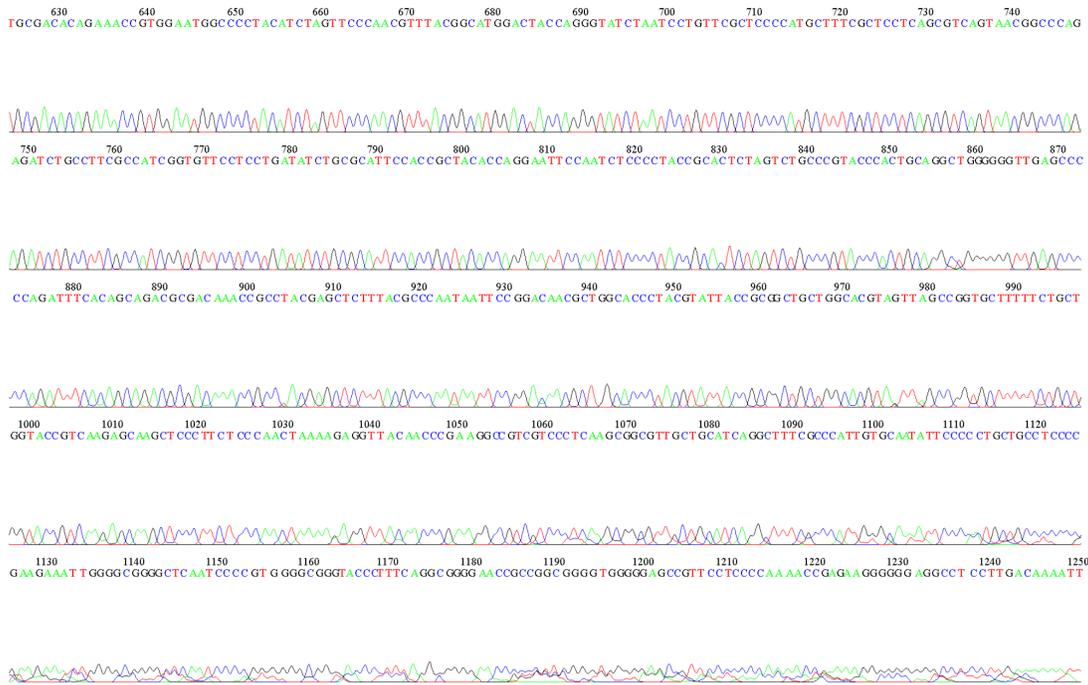


4.22

File: 34_1492R.ab1 Run Ended: 2021/5/26 15:25:19 Signal G:1346 A:1315 C:2867 T:1763
Sample: 34_1492R Lane: 36 Base spacing: 15.020449 1533 bases in 19054 scans Page 1 of 2

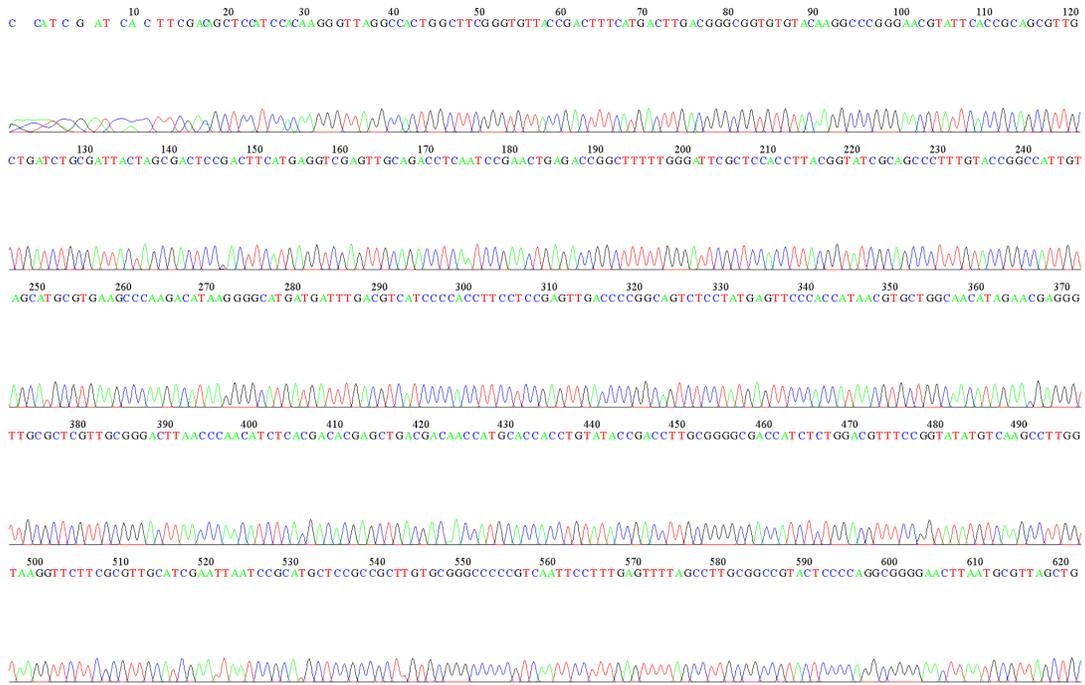


File: 34_1492R.ab1 Run Ended: 2021/5/26 15:25:19 Signal G:1346 A:1315 C:2867 T:1763
Sample: 34_1492R Lane: 36 Base spacing: 15.020449 1533 bases in 19054 scans Page 2 of 2

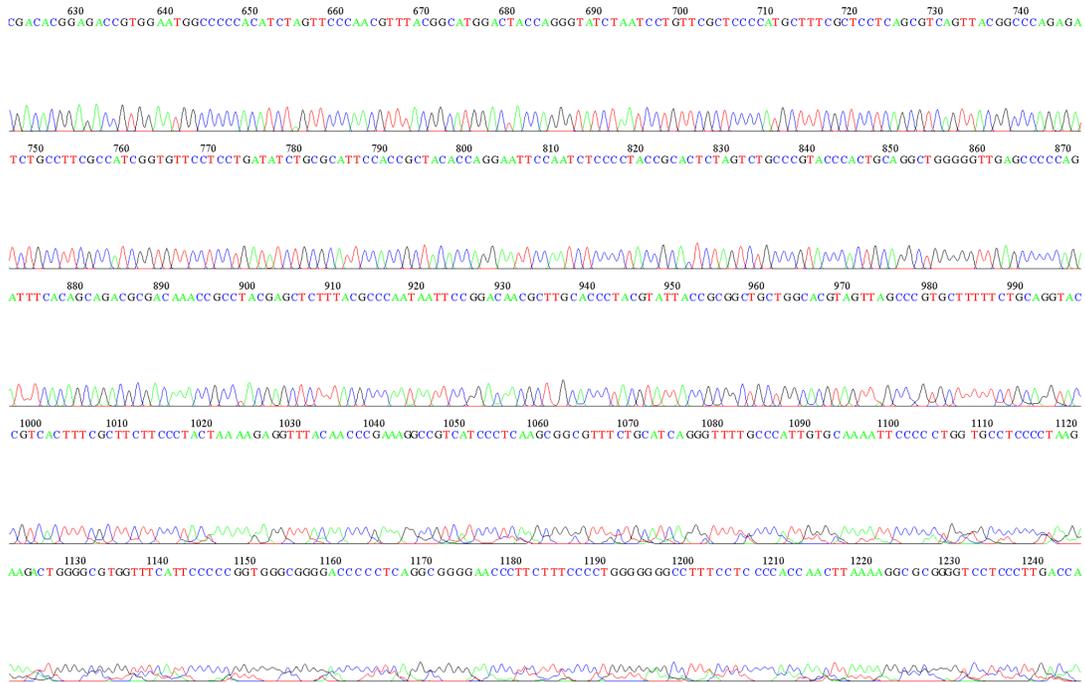


1.8.2

File: 36_1492R.ab1 Run Ended: 2021/4/23 19:24:17 Signal G:2231 A:2707 C:5617 T:3744
 Sample: 36_1492R Lane: 27 Base spacing: 16.120144 1315 bases in 15827 scans Page 1 of 2

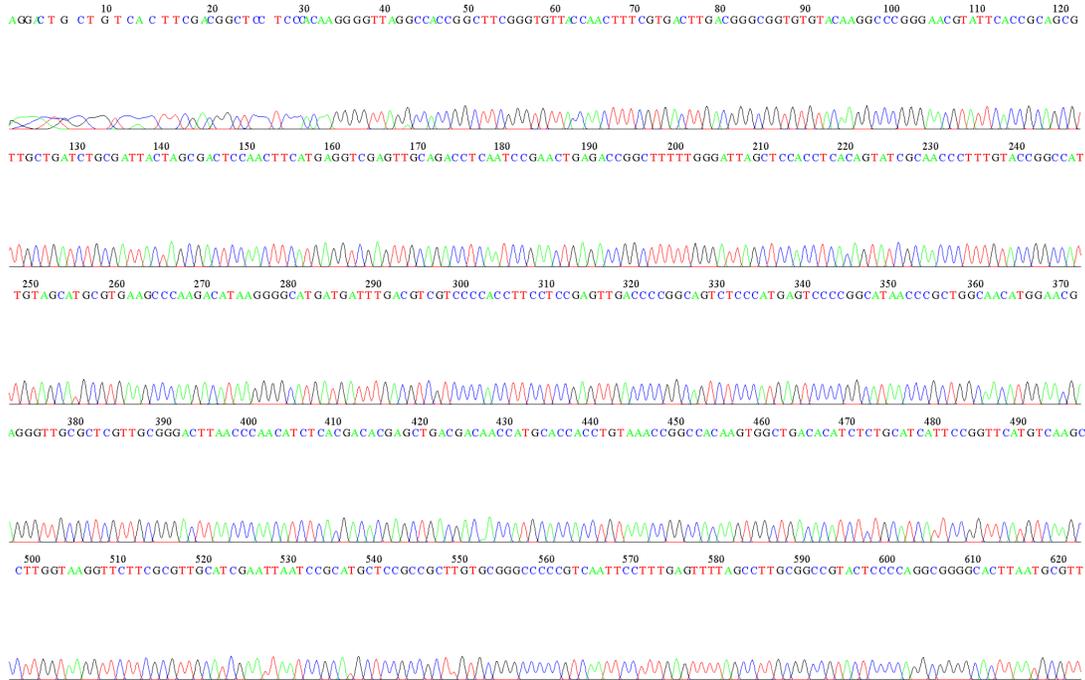


File: 36_1492R.ab1 Run Ended: 2021/4/23 19:24:17 Signal G:2231 A:2707 C:5617 T:3744
 Sample: 36_1492R Lane: 27 Base spacing: 16.120144 1315 bases in 15827 scans Page 2 of 2

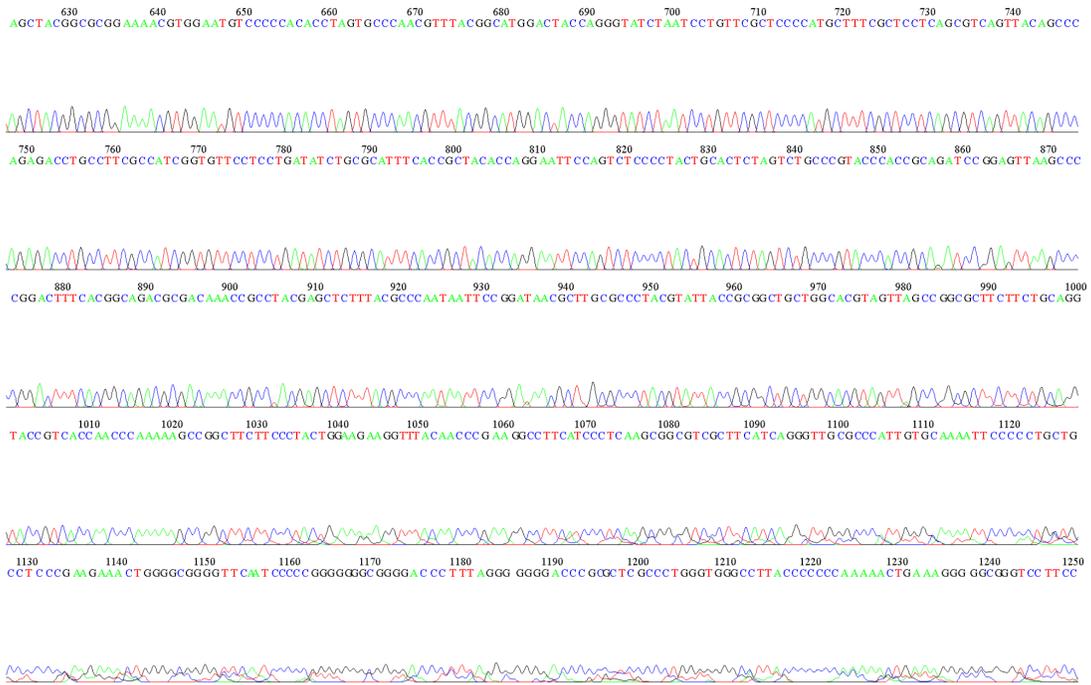


1.26

File: 37_1492R.ab1 Run Ended: 2021/4/23 19:24:17 Signal G:1942 A:2307 C:4888 T:3109
Sample: 37_1492R Lane: 25 Base spacing: 16.11057 1307 bases in 15684 scans Page 1 of 2



File: 37_1492R.ab1 Run Ended: 2021/4/23 19:24:17 Signal G:1942 A:2307 C:4888 T:3109
Sample: 37_1492R Lane: 25 Base spacing: 16.11057 1307 bases in 15684 scans Page 2 of 2



2.14.1



File: 38_1492R.ab1 Run Ended: 2021/5/26 15:25:19 Signal G:613 A:445 C:817 T:529
Sample: 38_1492R Lane: 59 Base spacing: 14.905378 1586 bases in 19246 scans Page 1 of 2

C A CATTG TGTCA CTTAGGCGGCTGCTCCATG AAGGTTACCTCACC GACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTACAAAGGCCGGGAACGTATTCACCGGGCAT

GCTGATCCGC GATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGC GAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGAAGATGGCTTTATGGGATTCGCTTACCTTCGCAGGTTTGCA GCCCTTTGTACCATCCATTG

TAGCACGTGTGTAGCCCAAGGTCAT AAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCCTTCCTCCGGTTTGTACC GGCAGTCACCTTAGAGTGCCECAAGTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTT

GCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCAGACAGAGCTGACGACAACCTGCACCCTGTCACTCTGTCCCCGAAAGGGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCA GAGGATGTCAAGACCT

GGTAAGGTTCTTCGCGTTCCTCAAAATTAACCAACATGCTCCACCGCTTGTGGGGCCCGTCAATTCCCTTTGAGTTTCAAGCCTTGCAGCCGCTTCCCGAGGCGGAGCTTAATGCGTTAGC

TGCAGCACTAAAGGCGGAAACCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGA ACTACAGGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCAAGCCTTTTCGCGCCTCAGTGTCA GTTACA GACCA GA

File: 38_1492R.ab1 Run Ended: 2021/5/26 15:25:19 Signal G:613 A:445 C:817 T:529
Sample: 38_1492R Lane: 59 Base spacing: 14.905378 1586 bases in 19246 scans Page 2 of 2

AAATCAGCTTTCGCGCTGCTGTTCCAGTCTCTACGCATTTCAACCTGACCTGACATGG AATTCCACATTCCTCTTCTGCACTCATGTTCCCAATTTTCAATGACCCCTCCACGGTTGAGCCGGG

GGCTTTTCACTCAGACTTAA CGAATCTGTCGCGGCGCTTACCCCAATTAATTAACAAGCAAAAGCTTGCCTACTATAAAATAACCCCGCA GTAGAAAATAGTCTTACCTGTGTATTCTGTTAGGG

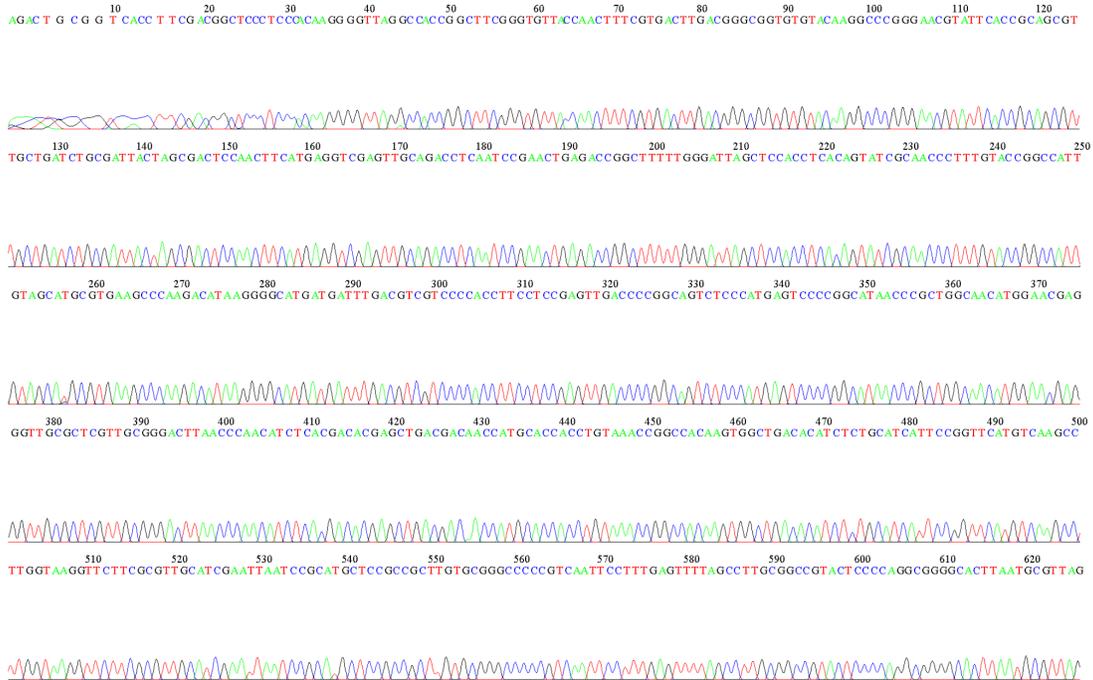
TCTCCAAAAGGGAAAATTGTTATCGCACTTCTTTTACTTAAATGTATACAAA AAAAAA TGAGTCTTGTGACGGGTAGT TTTTAC T TACCTGATTTTACTATCTCGGATCTC TC

TTC ACGATATCCCTAAMATGATTAGTTCGGTGTATTAAC TAAGATTAACCTCTTAAATTAATGAC A A A ATATGTATAAA ATTTTATACTCAATATATGATA TGC GGAAGTCA

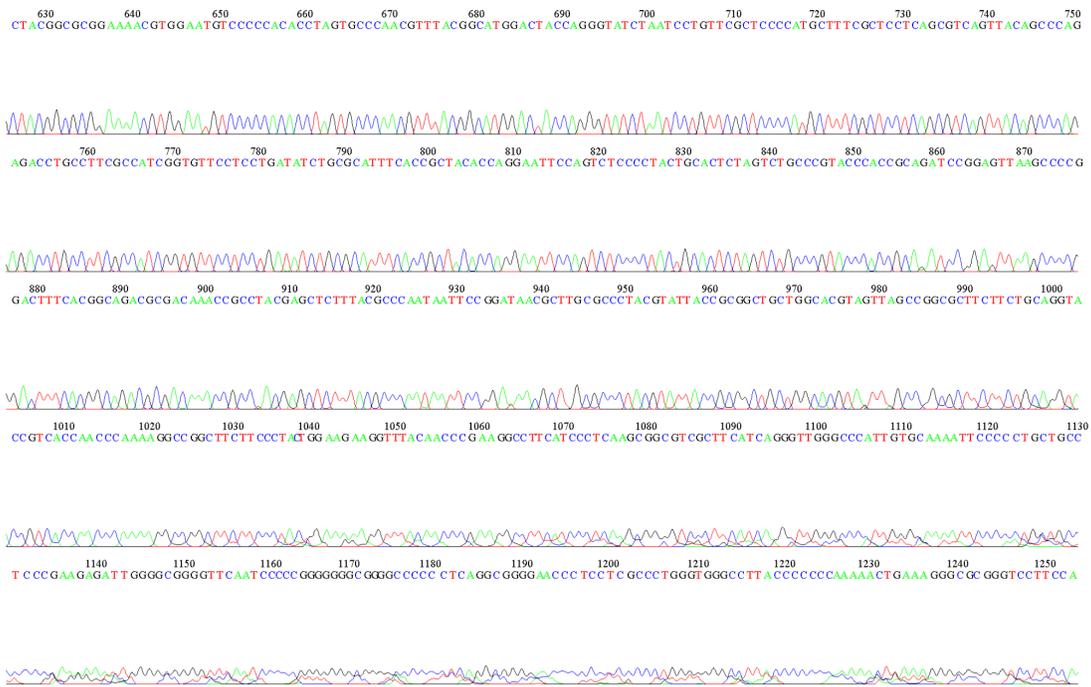
TTC ACGATATCCCTAAMATGATTAGTTCGGTGTATTAAC TAAGATTAACCTCTTAAATTAATGAC A A A ATATGTATAAA ATTTTATACTCAATATATGATA TGC GGAAGTCA

4,28

File: 38_1492R.ab1 Run Ended: 2021/4/23 19:24:17 Signal G:1855 A:2228 C:4932 T:3068
Sample: 38_1492R Lane: 23 Base spacing: 16.14356 1304 bases in 15620 scans Page 1 of 2



File: 38_1492R.ab1 Run Ended: 2021/4/23 19:24:17 Signal G:1855 A:2228 C:4932 T:3068
Sample: 38_1492R Lane: 23 Base spacing: 16.14356 1304 bases in 15620 scans Page 2 of 2



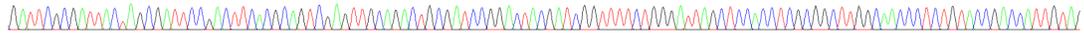
2.21

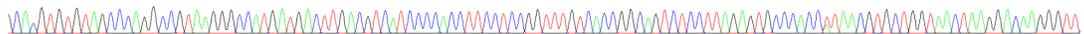
File: 4_1492R.ab1 Run Ended: 2021/4/23 19:24:17 Signal G:1995 A:2170 C:4366 T:3047
 Sample: 4_1492R Lane: 11 Base spacing: 16.241365 1269 bases in 15284 scans Page 1 of 2



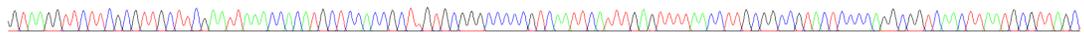
A AG 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
 A AG CTG ATCA CCG TG GT ACCGT CCTCCG AAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCACCCCACTCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCAACCGCACATTCT


 GATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTACGCGAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTCTGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCCTCTGTACCAGACCATTGTA


 GCACGTGTGTAGCCAGGCCGTAAAGGCCATGATGACTTACGCTCATCCCCACTTCTCCGGTTTTGTCACCGGCAAGTCTCCTTAGAGTGCACACTTAACTGCTGCTAACTAAAGCAAGGGTT

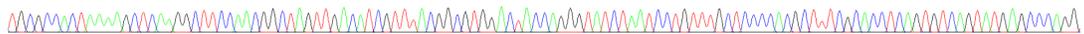

 GCGCTCGTTACGGCACTTAACCCAACTCTCACGACAGAGCTGACGACAGCCATGCGACCACTGTCTCAATGTTCCGAAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCATTGGATGTCAAGGCCCTG


 GTAAAGTTCCTTCCGCTTGAATTAAACCAATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCGTCAATTCTTTGAGTTTTAACTTGGCGCCGTACTCCCAAGCCGGTCAACTTAATGCGTTAGC



File: 4_1492R.ab1 Run Ended: 2021/4/23 19:24:17 Signal G:1995 A:2170 C:4366 T:3047
 Sample: 4_1492R Lane: 11 Base spacing: 16.241365 1269 bases in 15284 scans Page 2 of 2

TGGCCCACTAAAAGCTCAAGGCTTCCAAAGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTCACAGGGTATCTAATCCTGTTTCTCCCAAGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATGAGCCCAAG


 TGGTCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCCATATCTACGCATTTCCCGCTACACAGGAATCCACCACTCTGCCCTACTCTAGCTTGGCAGTTTTGGATGCAGTTCACAGTTGAGCCCG


 GGGATTTACATTCACCTTAAACAAACCACTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACTGCTTGAACCTCTGTAATACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGTCTTCTGTCTC

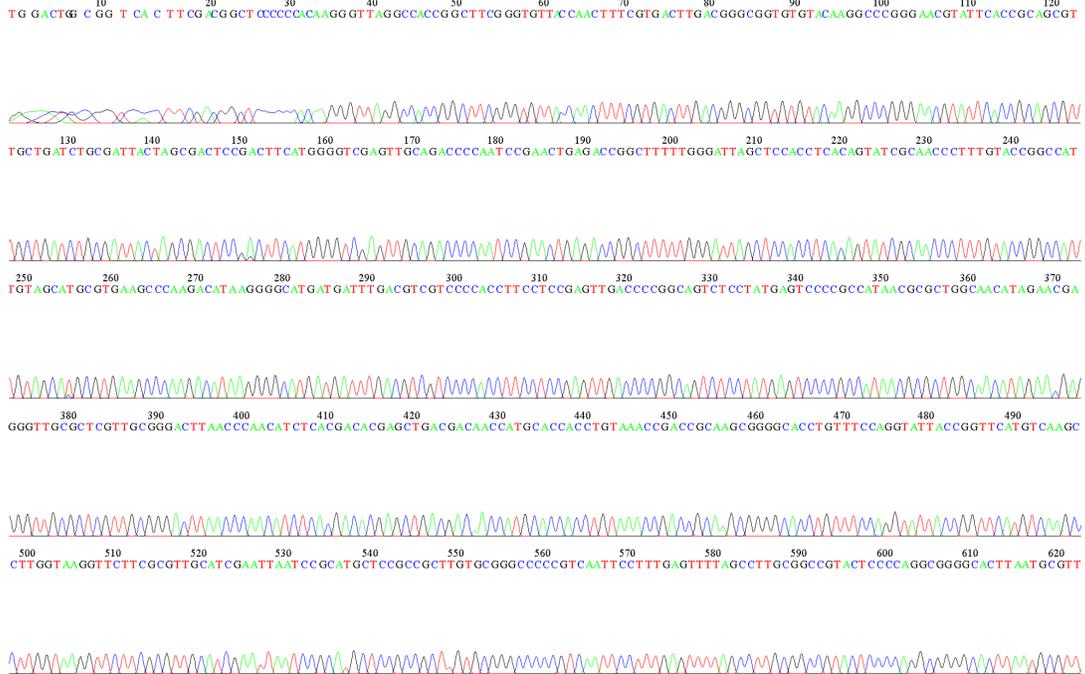

 GGTAACTGCAAAAACAGCGAAGTATTAAATTAGCTGCCCTTCTCCAACTTAAAGTGTGTTTACAACTCGAAGAACCTTCTTCCACACACGCGGCAAGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTTCTCAA


 TATTCCCCCTGGCTGCCCTCCCGAAGAACTCTGGACCGGGTTTCAAATCCCGGTGGACGGAAACAACCCGCCAAACAGATTACGGAAAGGTGGCCCTGGGGGAAACCATTAACCCCCCAACAACTTA

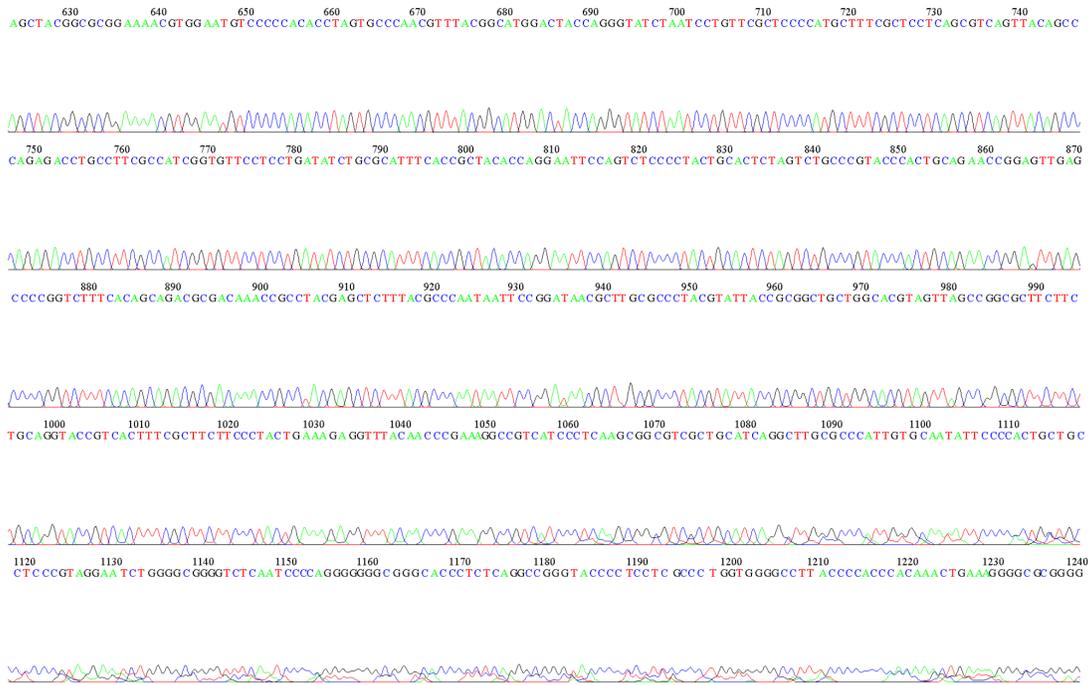


1.5

File: 40_1492R.ab1 Run Ended: 2021/4/23 19:24:17 Signal G:1904 A:2033 C:4294 T:2639
Sample: 40_1492R Lane: 19 Base spacing: 16.342659 1255 bases in 15167 scans Page 1 of 2



File: 40_1492R.ab1 Run Ended: 2021/4/23 19:24:17 Signal G:1904 A:2033 C:4294 T:2639
Sample: 40_1492R Lane: 19 Base spacing: 16.342659 1255 bases in 15167 scans Page 2 of 2



1.23

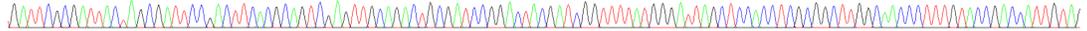


File: 7_1492R.ab1 Run Ended: 2021/4/23 19:24:17 Signal G:1877 A:2471 C:5461 T:3916
Sample: 7_1492R Lane: 7 Base spacing: 16.276794 1245 bases in 14986 scans Page 1 of 2

ACT TTTG ATGA CCG TGG T ACCGT CCTCCG AAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCACCACCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGG AACGTATTCACCGCAGACATTCT



GATT CGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAGACCCTTTGTACCGACCATTGTA



GCACGTGTGTAGCCCAAGCCGTAAAGGGCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCAACCAATACGTGCTGGTAACCTAAGGACAAGGGTT



GCCTGTACGGGACTTAACCAACATCTCACGACGAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAGTTCATTGGATGTCAGGGCTG



GTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAATTAAACCACATGCTCCACCCTTGTGCGGGCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCGTACTCCCAAGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCT



File: 7_1492R.ab1 Run Ended: 2021/4/23 19:24:17 Signal G:1877 A:2471 C:5461 T:3916
Sample: 7_1492R Lane: 7 Base spacing: 16.276794 1245 bases in 14986 scans Page 2 of 2

630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740
GCGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTCAAGTCAAGTCCAGGT

750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870
GGTCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCCTATATCTACGCATTTCAACGCTACACAGGAAATCCACCACCCTCTACCATACTCTAGCTTGCAGTTTTGGATGCAGTTCCCAAGTTGAGCCCGG

880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990
GGATTTCAATCCAACTTAAACAAACACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAAATCCGATTAACGCTTGCACCCCTGTGTAATACC GCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCCTATTCTGTCTCGGT

1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
AACGTCAAAATTCAGAGTATTAACTACAAACCTTCTCCCACTTAAAGTGTCTTACAATCCGAA GAACCTTCTTACACACGCGGCA GGGCTGGATAA GCTTTTCGCCATTGTCCAAAATT

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240
CCCCCTGGTGCC TCCCGAAGAGC GGGACC GGGTGTAAATTTCCCTGGGACGGATAAATCCCTCCAA AAAATTAAGAAAGAGCCCGCTGGTGAAGCC TTTTCTCCCCACAAAATTAAATC

1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400

ANEXOS REQUERIDOS



Alisson Samantha Torres Medina portadora de la cédula de ciudadanía N° **0706160355**. En calidad de autora y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación **“AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS HETERÓTROFAS Y PSICROTOLERANTES QUE COLONIZAN EL MONUMENTO PRINCIPAL DEL COMPLEJO ARQUEOLÓGICO INGAPIRCA (CAÑAR, ECUADOR)”** de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de éste trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, **22 de septiembre de 2021**

Alisson Samantha Torres Medina

C.I. 0706160355