



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE BIOFARMACIA

**DIVERSIDAD DE BACTERIAS HETERÓTROFAS QUE
PARTICIPAN EN EL PROCESO DE BIODETERIORO DEL
COMPLEJO ARQUEOLÓGICO INGAPIRCA.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE QUÍMICO/A FARMACEUTAS.**

AUTORES: JAQUELINE GABRIELA LANDI LANDI

MARCO VINICIO TAPIA SOTAMBA

DIRECTOR: DR. LUIS ANDRES YARZÁBAL RODRIGUEZ

CUENCA - ECUADOR

2022

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE BIOFARMACIA

**DIVERSIDAD DE BACTERIAS HETERÓTROFAS QUE
PARTICIPAN EN EL PROCESO DE BIODETERIORO DEL
COMPLEJO ARQUEOLÓGICO INGAPIRCA.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE QUÍMICO/A FARMACEUTAS.**

AUTORES: JAQUELINE GABRIELA LANDI LANDI

MARCO VINICIO TAPIA SOTAMBA

DIRECTOR: DR. LUIS ANDRES YARZÁBAL RODRIGUEZ

CUENCA - ECUADOR

2022

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Yo, **Marco Vinicio Tapia Sotamba** portador de la cédula de ciudadanía N° **010606799-4**. Declaro ser el autor de la obra: **“Diversidad de bacterias heterótrofas que participan en procesos de biodeterioro del Complejo Arqueológico Ingapirca”**, 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, **04 de julio del 2022**



Marco Vinicio Tapia Sotamba

C.I. **01010101010**



Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Jaqueline Gabriela Landi Landi portadora de la cédula de ciudadanía N° **0106415391**. Declaro ser el autor de la obra: **“Diversidad de bacterias heterótrofas que participan en procesos de biodeterioro del Complejo Arqueológico Ingapirca”**, 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, **04 de julio de 2022**

Jaqueline Gabriela Landi Landi

C.I. 0106415391

CERTIFICACIÓN:

Certifico que el presente trabajo de titulación denominado “**DIVERSIDAD DE BACTERIAS HETERÓTROFAS QUE PARTICIPAN EN PROCESOS DE BIODETERIORO DEL COMPLEJO ARQUEOLÓGICO INGAPIRCA**”, realizado por **LANDI LANDI JAQUELINE GABRIELA y TAPIA SOTAMBA MARCO VINICIO**, ha sido revisado y orientado durante su ejecución bajo el asesoramiento permanente de mi persona en calidad de Tutor, 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 Junio 2022**



Firmado electrónicamente por:
**LUIS ANDRES
YARZABAL
RODRIGUEZ**

Luis Andrés Yarzabal Rodríguez

RESUMEN

Introducción: Existen varias formas en que los microorganismos pueden afectar el estado de los materiales que forman parte de la construcción de los edificios o los monumentos arqueológicos expuestos al ambiente exterior, ocasionando su desgaste. Los primeros cambios obvios probablemente sean la decoloración o pigmentación de las superficies; sin embargo, otros cambios más notorios y profundos ocurren posteriormente. Estos cambios afectan la estructura mineral de las rocas, causando su destrucción paulatina.

Objetivo: Identificar y caracterizar a bacterias heterótrofas que contribuyen con el biodeterioro del monumento principal (“Castillo” o “Elipse”) del Complejo Arqueológico Ingapirca.

Metodología: Estudio de tipo observacional, donde se obtuvieron y cultivaron muestras del Complejo Ingapirca. Se emplearon técnicas de Biología Molecular y Microbiología para aislar e identificar las bacterias y sus características morfológicas y fisiológicas. Finalmente, se identificaron y clasificaron las cepas bacterianas por métodos bio-informáticos.

Resultados: Se reactivaron y purificaron cepas bacterianas que causan biodeterioro en el monumento principal del Complejo Arqueológico Ingapirca. La mayoría de las 12 cepas bacterianas mostraron capacidad de biolixiviación. Se constató crecimiento bacteriano a diferentes temperaturas, encontrándose tanto bacterias psicrotolerantes como mesófilas. Los 12 aislados que se identificaron corresponden a especies del género *Pseudomonas*. A partir de los hallazgos obtenidos se podrán orientar estrategias para la contención y manejo del biodeterioro de este monumento.

Palabras clave: Biodeterioro, microorganismos, psicrotolerancia, biolixiviación, monumentos arqueológicos.

ABSTRACT

Introduction: There are several forms in which microorganisms may affect the state of materials that form part of buildings or archaeological sites, which are exposed outdoors, causing their decay. The first noticeable and apparent changes are probably the fading or pigmentation of their surfaces; however, other changes, more noticeable and more serious, occur later. These changes alter the mineral structure of the rocks, causing their progressive breakdown.

Objective: To identify and determine heterotrophic bacteria contributing to the biodeterioration of the main structure ("Castillo" or "Elipse") of the Ingapirca Archaeological Complex.

Methodology: Observational study, where samples were obtained and harvested from the Ingapirca Complex. Molecular Biology and Microbiology techniques were used to isolate and identify the bacteria and their morphological and physiological characteristics. Finally, the bacterial strains were identified and classified following bioinformatics methods.

Results: Bacterial strains that cause biodeterioration in the leading site of the Ingapirca Archaeological Complex were reactivated and purified. Most of the 12 bacterial strains showed bioleaching capability. Bacterial outgrowth was recorded at different temperatures, with both micro-tolerant and mesophilic bacteria. The 12 isolates identified corresponded to species of the genus *Pseudomonas*. Based on the findings of this study, strategies for the restraint and handling of the biodeterioration of this historic monument will be able to be directed.

Keywords: Biodeterioration, microorganisms, psicro-tolerance, bioleaching, archaeological monuments.

ÍNDICE

Contenido

DEDICATORIA	1
AGRADECIMIENTOS:	3
I. INTRODUCCIÓN	4
CAPÍTULO I	5
PLANTEAMIENTO TEÓRICO.	5
I.1.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.	6
JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	7
I.2.1.- PREGUNTA CIENTÍFICA:.....	9
I.3.- OBJETIVOS	10
I.3.1.-Objetivo General:.....	10
I.3.2.-Objetivos Específicos:	10
I.4.- MARCO TEÓRICO	11
CAPÍTULO II	17
METODOLOGÍA.....	17
II.1.- Diseño de investigación.	18
II.2.- Población y muestra.	18
II.2.1 Muestreo y muestra:	18
II.4.- Definición y clasificación de las variables	18
OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	19
II.5.- Procedimientos, técnicas e instrumentos para la obtención de datos.	19
II.5.1.- Procedimientos estadísticos y análisis de datos	20

II.5.2. Procedimiento para la obtención y estudio de las muestras	20
II.6.- Aspectos éticos	22
CAPÍTULO III	23
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
III.1. Reactivación y purificación de los aislados bacterianos que colonizan las rocas del Castillo del Complejo Arqueológico Ingapirca.	24
III.2. Capacidad lixivante de los aislados bacterianos obtenidos.	27
III.3. Caracterización de los aislados bacterianos que disuelven minerales desde el punto de vista morfológico y fisiológico.....	29
III.4. Amplificación por PCR del gen que codifica para el ARNr 16S en cada uno de los genomas de los aislados obtenidos.	31
IV.1.- CONCLUSIONES	40
IV.2.- RECOMENDACIONES.....	41
BIBLIOGRAFÍA	42
ANEXOS	50

DEDICATORIA.

A mi Dios, que ha sido la fortaleza en cada momento duro que he vivido, este trabajo dedico a todas aquellas personas quienes me apoyaron, a mi padre que está en el cielo, solo agradecimientos por dejarme la mejor herencia del mundo, sus enseñanzas.

A mi madre pues ella fue el principal cimiento para la construcción de mi vida profesional, sentó en mi las bases de responsabilidad y deseos de superación, en ella tengo el espejo en el cual me quiero reflejar pues sus virtudes infinitas y su gran corazón me llevan a admirarla cada día más.

A mis hermanas por estar ahí apoyándome incondicionalmente gracias no sólo por ser parte fundamental de este gran logro, sino también por todos aquellos momentos bonitos que pasamos a lo largo de todo este proceso.

A mis abuelos, tíos y primos quienes me han acompañado y apoyado en esta etapa de mi vida.

A mi amiga Gina te considero mi hermana, gracias por ser parte de este proceso y estar en cada paso del camino, creíste en mi no tengo como agradecerte por ser incondicional.

A mi amigo ,compañero y colega de tesis Marco gracias por acompañarme durante el camino, han sido momentos muy duros pero tu valentía y coraje nos impulso a seguir cada día.

Jaqueline Landi

DEDICATORIA

La motivación permite al ser humano llegar al éxito, el éxito es lo que llena de vida y sabiduría, la vida no sería la misma si no hubiera una familia

Con mucho cariño y gratitud a cada uno de los lectores, dedico esta tesis a mis amados padres, en especial a mi madre Susy Sotamba, que con esfuerzo y valentía me motivaron y me dieron el impulso para seguir adelante con mi vida y con el éxito personal, sin contar con su lucha diaria para que me sienta motivado a seguir el camino justo de la vida.

A mis hermanos Jaime y Samantha que, con sus charlas y el apoyo constante, me brindaron el motivo para estudiar y culminar satisfactoriamente mi carrera profesional.

A mi amada esposa Adriana Castillo y a mi querido hijo Ismael, ellos son el lazo infinito de sabiduría y ternura que me permite continuar con el mayor logro de la vida. “formar una familia”

A mi compañera de tesis Jaqueline Landi, por ser la persona más honesta y colaboradora que se pueda tener en esta vida, te agradezco el permitirme formar parte de tu formación académica y culminar con éxito nuestro trabajo de investigación.

A cada uno de mis familiares, amigos y compañeros de universidad que me brindaron su cálida cortesía y sus enseñanzas lo que me permite ahora finalizar con éxito mi formación profesional.

Marco Tapia

AGRADECIMIENTOS:

Nuestros sinceros agradecimientos para cada una de nuestras familias por el apoyo incondicional, comprensión y motivación constante para culminar exitosamente un capítulo más de nuestras vidas profesionales

A la universidad Católica de Cuenca por darnos la oportunidad de fortalecer y desarrollar conocimientos adquiridos en cada una de sus aulas.

A nuestros profesores quienes nos brindaron sus enseñanzas y nos apoyaron durante nuestra formación profesional, a nuestros compañeros y amigos muy estimados.

A nuestro director de tesis, Dr. Luis Andrés Yarzabal Rodríguez por permitirnos participar durante el proceso de investigación, por su dedicación e interés al tema desarrollado. A la Dra. Lenys Buela Salazar, por todo el apoyo prestado durante la realización de este trabajo de tesis y el conocimiento transmitido. Agradecemos igualmente a la Dra. Diana Peláez por el apoyo que nos brindó en el transcurso del trabajo experimental.

Y finalizamos con un gran Gracias Dios por iluminarnos, darnos paciencia y por no permitirnos que perdamos la fe en nosotros mismo.

I. INTRODUCCIÓN

Entre los microorganismos causantes de “biodeterioro” están las bacterias. Éstas proliferan cuando las condiciones ambientales son favorables (por ejemplo, aumento de la humedad, buena disponibilidad de nutrientes, temperaturas óptimas, etc.); su desarrollo es evidente cuando se forman costras negras, pátinas marrones y exfoliación, principalmente en las superficies de los monumentos de naturaleza calcárea. Las bacterias intervienen en la meteorización de las rocas, ya que producen ácidos inorgánicos (nitrítico o sulfúrico) y orgánicos (oxálico, cítrico, glucónico, etc.), que ocasionan la solubilización del calcio, degradan los carbonatos, los aluminatos y silicatos (1).

Las bacterias son organismos unicelulares, procariotas, con metabolismo autótrofo o heterótrofo. Sus requerimientos nutricionales y ecológicos son complejos, pero aún así pueden desarrollarse en zonas rocosas. La formación de costras negras, pátinas marrones y la exfoliación de rocas son indicadores de la presencia de microorganismos (2).

Por ser microorganismos de rápida multiplicación, las bacterias pueden invadir fácilmente la superficie de las rocas, tanto en ambientes naturales como en monumentos, y afectarlas por la formación de pátinas de varios colores. La colonización bacteriana en las rocas se ve favorecida por diferentes factores como la humedad, la presencia de nutrientes, la luz solar y demás condiciones medioambientales que facilitan su multiplicación (3).

Hay varias formas en que las bacterias pueden afectar el estado de los materiales que forman parte de la estructura de los monumentos, ocasionando el desgaste de los edificios expuestos al ambiente exterior. Los primeros cambios obvios probablemente sean la decoloración o pigmentación de las superficies; sin embargo, otros cambios más notorios y profundos ocurren posteriormente. Estos cambios afectan la estructura mineral de las rocas, causando su destrucción paulatina (4).

CAPÍTULO I
PLANTEAMIENTO TEÓRICO.

I.1.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.

El desarrollo de biopelículas sobre la superficie de los monumentos o edificios puede tener efectos tanto estéticos como estructurales. De hecho, las áreas cubiertas por biopelículas absorben más luz solar, lo que aumenta el estrés físico en la superficie de las rocas que conduce a su expansión y contracción intermitentes. Por otra parte, el oscurecimiento de la superficie de las piedras disminuye su albedo (la capacidad de reflejar la luz incidente), por lo que estas experimentan mayores tensiones no solo a través de los ciclos de calentamiento/enfriamiento, sino también de humedecimiento / secado (5).

Gaylarde y colaboradores refieren que los microorganismos endolíticos, es decir aquellos capaces de crecer en el interior de sustratos rocosos o pétreos, inducen la degradación de los minerales que contienen sílice a través de diferentes mecanismos, citando los casos de varios edificios históricos en América Latina (6).

Son cuatro bacterias capaces de colonizar sustratos pétreos: actinomicetos, cianobacterias, bacterias nitrificantes y oxidantes de sulfuro (7). A diferencia de los hongos, el deterioro producido por bacterias a estas estructuras solo es de naturaleza química (8), y se debe principalmente a la acidificación del sustrato, pulverizándolo, provocando su exfoliación y solubilizando sus minerales constituyentes. De igual manera, el crecimiento bacteriano abundante produce cambios en el color y la textura de los monumentos (9).

La actividad de las bacterias heterótrofas depende de la cantidad de materia orgánica disponible, que proviene de la deposición de partículas traídas por el viento, que del polvo, la tierra y los productos intermediarios y finales del metabolismo de otros organismos y microorganismos (10).

Por todo esto, es importante diseñar estrategias de conservación efectivas para prevenir el biodeterioro de los monumentos desde un punto de vista histórico y patrimonial. Para ello, es necesario saber qué microorganismos están presentes en las superficies, qué tipo de fuentes de energía utilizan y qué efectos causan, no solo sobre los sustratos minerales en sí mismos, sino también en la promoción de una mayor colonización por parte de otros microorganismos, líquenes, musgos, plantas vasculares, insectos y animales (10).

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Significado o importancia de la solución del problema

Conservar los monumentos arqueológicos es de vital importancia para la memoria histórica de los países. Por lo tanto, estudiar a los microorganismos que provocan el biodeterioro de estas construcciones con valor patrimonial es fundamental. Las investigaciones de este tipo realizadas en América Latina se han limitado a zonas selváticas y principalmente tropicales, pero no a las regiones montañosas del páramo andino. Por tal razón, es muy escaso el conocimiento sobre el biodeterioro, causado por microorganismos, de monumentos arqueológicos situados en las alturas de los Andes Tropicales, caracterizados por temperaturas bajas, elevada radiación UV y climas cambiantes.

Aporte: teórico, metodológico, práctico; novedad

Por las razones anteriormente mencionadas, y teniendo en cuenta que el Complejo Arqueológico Ingapirca es uno de los más importantes en el Ecuador, nos propusimos llevar a cabo esta investigación para identificar algunas de las bacterias heterótrofas que colonizan la superficie de los bloques de roca (Andesita verde) con la que fue construido su monumento principal, provocando su biodeterioro. Con la información obtenida se podrá contribuir, posteriormente, al diseño de estrategias de conservación gubernamental (11).

El proyecto reviste interés científico, puesto que los resultados obtenidos serán susceptibles de ser publicados en revistas de impacto a nivel internacional, apoyando así la producción científica de la entidad universitaria. Igualmente, como se trata de un monumento tan emblemático, el proyecto impulsará a la Universidad Católica de Cuenca a ser reconocida por la comunidad.

La difusión de esta actividad por los medios de comunicación, le dará realce al Instituto Nacional del Patrimonio Cultural, que contará con datos e insumos para la elaboración de estrategias para la preservación de este patrimonio arqueológico.

Beneficios: humanos, ambientales, económicos, educativos y de formación profesional

Los beneficiarios directos de este trabajo de tesis son:

En primer lugar, los estudiantes, tesistas de pregrado, quienes fungirán como colaboradores en las labores de investigación, y que se verán beneficiados en su formación académica.

También se verá beneficiado el personal profesional a cargo de este proyecto (Docentes/investigadores pertenecientes a la Carrera de Bioquímica y Farmacia de la Unidad de Salud y Bienestar; Carrera de Ingeniería Ambiental y Arquitectura de la Unidad de Ingeniería, Industria y Construcción; Centro de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología - CIITT), quienes participarán de manera directa en las distintas actividades y serán apoyados en sus labores por los tesistas.

Instituciones: La Universidad Católica de Cuenca a la que pertenecen los tesistas y docentes, se beneficiará con la difusión de los resultados que pueden ser publicados.

Entre los beneficiarios indirectos destacan:

Población de Ingapirca: será la beneficiaria directa de cualquier iniciativa que permita la conservación del monumento que es una fuente de empleo directo e indirecto, que contribuirá a implementar estrategias de conservación por muchos años más.

Población de Ecuador: estudios como este son de vital importancia para la protección, conservación y restauración de monumentos afectados, contribuyendo así la conservación de este patrimonio por muchos años más, revistiendo de interés científico.

I.2.1.- PREGUNTA CIENTÍFICA:

¿Cuáles son las bacterias heterótrofas, cultivables, que participan en los procesos de biodeterioro del sustrato pétreo (Andesita) con el que fue construido el monumento principal del Complejo Arqueológico Ingapirca y qué tipo de daño pueden provocar?

I.3.- OBJETIVOS

I.3.1.-Objetivo General:

Identificar y caracterizar a bacterias heterótrofas que contribuyen con el biodeterioro del monumento principal (“Castillo” o “Elipse”) del Complejo Arqueológico Ingapirca

I.3.2.-Objetivos Específicos:

- Reactivar y purificar aislados bacterianos que colonizan las rocas del Castillo del Complejo Arqueológico Ingapirca.
- Determinar *in vitro* la capacidad lixivante de estos aislados bacterianos.
- Caracterizar los aislados bacterianos que disuelven minerales desde el punto de vista morfológico y fisiológico.
- Amplificar por PCR el gen que codifica para el ARNr 16S en cada uno de los genomas de estos aislados seleccionados.
- Identificar filogenéticamente a este grupo de aislados a partir de la información obtenida mediante la secuenciación y análisis del gen 16S rDNA.

I.4.- MARCO TEÓRICO

I.4.1. Biodeterioro

Todos los materiales pétreos, tanto naturales como artificiales, sufren un envejecimiento natural asociado a un deterioro progresivo, que altera sus características estéticas y estructurales originales. El biodeterioro, término acuñado por Hueck, es "cualquier cambio indeseable en las propiedades de un material causado por las actividades vitales de los organismos" (12).

Los organismos que atacan los materiales pétreos pueden ser de dos tipos diferentes: i) organismos *autótrofos* (bacterias, algas, líquenes, musgos y plantas vasculares), capaces de alimentarse a sí mismos utilizando sólo sustancias inorgánicas simples, una fuente de energía (como la luz solar –*fotótrofos*- o ciertos minerales reducidos -*quimótrofos*) y una fuente de carbono como el CO₂ atmosférico; y ii) organismos *heterótrofos* (bacterias, hongos, protozoos), que consumen sustancias orgánicas producidas por otros organismos para su metabolismo, utilizando el sustrato de piedra solo como soporte para su crecimiento (13).

La actividad de las bacterias heterótrofas sobre las piedras se rige por la disponibilidad de materia orgánica adecuada. Se trata de microorganismos que utilizan sustratos orgánicos como fuente de carbono y energía, que son transformados en biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos). La mayoría de las piedras contienen suficiente materia orgánica que proviene de la deposición de partículas transportadas por el aire, o de los productos del metabolismo de otros organismos autótrofos (capaces de fijar el CO₂ atmosférico) y fototróficos (capaces de utilizar la luz solar como fuente de energía). Estas sustancias orgánicas permiten mantener el crecimiento y la actividad de grandes poblaciones de bacterias (14).

El proceso de reciclaje de los minerales (rocas, piedras) es parte fundamental de los ciclos biogeoquímicos naturales: esto es lo que ocurre cuando la roca es deteriorada y transformada en varios elementos esenciales, como nitrógeno, carbono o azufre, a

través de procesos químicos y físicos. La exposición a la intemperie, a la humedad, al viento y a la precipitación (lluvia, granizo, nieve) aumenta los efectos de biodeterioro; por esa razón, principalmente, los edificios y las obras de arte expuestas al aire libre sufren este proceso (12).

El biodeterioro rara vez es causado por un solo grupo de organismos y esto depende de las complejas interacciones entre los diferentes grupos que coexisten en un mismo ambiente. El daño causado por los microorganismos también está estrechamente relacionado con su capacidad de adherirse al sustrato; esto se debe al material características y técnicas de adhesión del mismo (15).

Por lo tanto, el biodeterioro es un problema de difícil solución en el campo de la conservación de estructuras a base de materiales pétreos. Aunque las piedras se consideran entre los materiales más duraderos, son igualmente afectadas, sobre todo en su superficie. De hecho, un gran porcentaje de los monumentos del mundo está construido de piedra (1).

Otra característica de los microorganismos –y particularmente de las bacterias heterótrofas- es su gran capacidad para adaptarse a diversas condiciones ambientales y de prosperar en cada parte de la biosfera, como en el suelo o en la superficie de las rocas. Desde las biopelículas que se forman a nivel superficial, los microorganismos pueden penetrar hacia el interior del sustrato, y convertirse así en organismos “endolíticos”. Se han detectado muchos microorganismos que crecen de esta manera, con la consiguiente degradación química y física del mineral; esto incluye organismos fotótrofos, otras bacterias autótrofas y quimioheterótrofas, hongos y líquenes. En su mayoría, estos organismos se asocian con ambientes adversos, con temperaturas extremas y secas; de hecho, la endolitotrofia puede considerarse un mecanismo de supervivencia microbiano en tales condiciones (1).

Los organismos endolíticos alteran la estructura de la piedra de forma mecánica (penetración activa por parte de las estructuras vivas, como las hifas) y mediante la

producción de ácidos orgánicos e inorgánicos (16), así como por la disolución y” movilización” de iones como el hierro, el fósforo y el manganeso de las rocas (17).

Por ejemplo, en la Provincia de Misiones (Argentina), las construcciones a base de arenisca tienen una capa externa enriquecida en Fe y Mn, producida por estos procesos biogénicos (18), mientras que las fachadas de las iglesias en la ciudad de Río de Janeiro, Brasil, contienen cianobacterias filamentosas endolíticas incrustadas con neogypsum, redepositadas después de la disolución de la corteza deteriorada (14).

El yeso es una de las sales más dañinas para la estructura de las rocas. Es ligeramente soluble en agua, pero a valores de pH más altos, se vuelve aún menos soluble; así el yeso solubilizado por la noche por los ácidos bacterianos y fúngicos en la superficie de la piedra o cerca de la superficie se volverá a depositar más tarde como neogypsum alrededor de las células fototróficas endolíticas. A medida que se repiten estos ciclos de solubilización y reprecipitación, las partículas de yeso se vuelven más grandes y densas, alterando aún más la estructura de la piedra y aumentando la posibilidad de desconchado (14).

I.4.2. Efectos del cambio climático sobre el biodeterioro

La identificación del clima como un factor importante en la colonización microbiana de las estructuras construidas tiene importantes implicaciones para los futuros problemas de biodeterioro y su control (19). En las áreas que probablemente experimenten más alteraciones climáticas, podría ocurrir un cambio, pasando de condiciones “bioprotectoras” a provocar biodeterioro: por ejemplo, el aumento de la temperatura, debido al calentamiento global, podría permitir el desarrollo de microorganismos en regiones en las que anteriormente no podían hacerlo. Considerando que las áreas con mayor estrés biológico (como aquellas que están sujetas a la disminución de las precipitaciones) mostrarían tasas reducidas de formación de biopelículas, lo cual

podría ocasionar la aparición de comunidades microbianas formadas por organismos con mayor resistencia a los diferentes tipos de estrés y una disminución concomitante del biodeterioro (20).

Matos et al indican que en zonas donde ocurren transformaciones producto de impactos o agentes mecánicos no podrían producir un cambio neto en el crecimiento de la biopelícula, basándose en el hecho de que los organismos oportunistas, que llegan rápidamente después de cualquier perturbación, son capaces de utilizar materiales fácilmente disponibles como nutrientes y vivir endolíticamente, es más probable que causen deterioro (20).

Es obvio que el cambio climático puede incidir sobre el crecimiento bacteriano, pues el aumento de la temperatura y de las precipitaciones indudablemente provoca alteraciones en la formación de biopelículas (21). La disponibilidad de agua en la superficie de las rocas puede ser el factor más importante para la formación de este tipo de estructuras (22).

Por ejemplo, Miller et al (23) encontraron altos valores de absorción de agua por capilaridad y porosidad abierta de varios tipos de piedra caliza. Esto aumenta la permeabilidad de estas rocas facilitando la colonización por microorganismos, provocando el posterior biodeterioro de las mismas por la acción de estos microorganismos (23).

Prieto et al (24) consideran que los niveles de CO₂ también son importantes para la colonización de edificios de granito, pero mostraron que los efectos del aumento de los niveles fueron contrarrestados por una mayor disponibilidad de agua (24)

La subsiguiente alteración de la superficie a través de la meteorización favorecería la continuación de la colonización por organismos ruderales (los primeros en colonizar las áreas perturbadas). Por el contrario, las especies tolerantes al estrés deberían conducir a un menor deterioro porque no permiten la colonización de nuevas especies

potencialmente más agresivas. Las bacterias en muchas ocasiones pueden sobrevivir a la mayoría de los tipos de estrés y, de hecho, se han reactivado a partir de cultivos de laboratorio secados al aire después de 20 años de almacenamiento a temperatura ambiente. Pueden llegar a ser incluso más importantes como agentes de la degradación de la piedra en el futuro (3).

I.4.3. Control del Biodeterioro

Para controlar el biodeterioro de las edificaciones pétreas lo primero es conocer los microorganismos causantes del mismo. Esto es fundamental para diseñar estrategias de prevención y control y poder emplear los tratamientos más adecuados (25).

En general, el control de los procesos de biodeterioro se basa en la remoción mecánica de las biopelículas y biocostras que están formadas por comunidades de microorganismos. También se utilizan sustancias biocidas, de diferente naturaleza química, para controlar e inhibir el crecimiento de estos microorganismos (26). Sin embargo, estas estrategias de control y prevención no son del todo adecuadas y, en ocasiones, puede promover un mayor deterioro de las rocas. Es por ello que en las últimas décadas se están explorando nuevas estrategias de control y prevención (27).

Aunque generalmente los microorganismos han sido asociados con efectos negativos, es decir, favoreciendo el biodeterioro, la biocorrosión o biomineralización, algunos mecanismos metabólicos se pueden aprovechar para aumentar la estabilidad de las estructuras pétreas (27).

Por ejemplo, se sabe que especies del género *Bacillus* favorecen la precipitación de la calcita convirtiendo la urea en amoníaco y dióxido de carbono. En piedra caliza, mostrando la capacidad en cepas de *Bacillus sphaericus* y *Bacillus lentus* los resultados demuestran que las cepas de *B. sphaericus* eran las que más producían agregados cristalinos, y la cepa de *B. lentus* en menor cantidad. Dick y colaboradores (28).

En edificaciones de piedra caliza se ha corroborado que las sales de carbono producidos por la acción de las bacterias influyen en la absorción de agua. En algunos casos, las bacterias se han transformado de agentes destructivos a protagonistas de la solución del problema, ya que algunos investigadores han utilizado estas bacterias reductoras de sulfato y anaeróbicas, como *Desulfovibrio desulfuricans* y *D. vulgaris* manipuladas genéticamente, para emplearlas en la eliminación de las costras de sulfato negro que se forman en la parte externa de este tipo de edificaciones (29).

En las dos últimas décadas, gracias a los avances tecnológicos, nuevos materiales y productos salen al mercado: en comparación con los antiguos derivados naturales, los restauradores y los conservadores prefieren productos sintéticos, con propiedades físicas y mecánicas más estables durante el tiempo. En particular, la industria química proporciona un gran número de productos sintéticos, utilizados en el campo agrícola para evitar de cierto modo el ataque biológico, como herbicidas y fungicidas (30).

Estos productos han sido adoptados por restauradores con muy buenos resultados en el control del biodeterioro; sin embargo, a menudo, los operadores ignoran su posible toxicidad para la salud y ambiente, especialmente en espacios interiores, donde los residuos químicos se concentran sin dispersarse (31).

Recientemente, los investigadores han comprendido la toxicidad de muchos productos sintéticos, ampliamente utilizados en la restauración del patrimonio cultural. En este contexto, la biología, biotecnología y la “química verde” tienen un gran potencial para la conservación y restauración del patrimonio cultural. Hay dos enfoques en este campo: el desarrollo de polímeros a partir de fuentes renovables, como sustitutos de materiales de base petroquímica; y la aplicación de microorganismos competitivos para contrastar el crecimiento de la colonia y acción dañina (31).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

II.1.- Diseño de investigación.

Enfoque: El enfoque de la investigación es cuantitativo.

Diseño de Investigación: Descriptivo

Nivel de investigación: Básico-orientado

Tipo de Investigación:

Por el ámbito: De campo

Por la técnica: Observacional

Por la temporalidad: Transversal actual.

II.2.- Población y muestra.

La selección de las cepas bacterianas que se incluyeron en este estudio fue a conveniencia, dependiendo de la disponibilidad en la colección de microorganismos almacenada a -20°C.

II.2.1 Muestreo y muestra:

El muestreo para el aislamiento de cepas bacterianas tuvo en cuenta la recolección de muestras representativas de todas las fachadas del monumento principal del Complejo Arqueológico de Ingapirca. Las muestras colectadas en cada una de las diferentes fachadas, se combinaron en muestras compuestas representativas de cada una de dichas fachadas.

Criterios de selección: Se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de selección:

- **Criterios de inclusión:** Muestras que aportaron bacterias heterótrofas cultivables.
- **Criterios de exclusión:** Muestras contaminadas.

II.4.- Definición y clasificación de las variables

Variables Cuantitativas: Porcentajes de identidad con secuencias nucleotídicas almacenadas en bases de datos.

Variables Cualitativas: Morfología celular; Tipo de pared celular (respuesta frente a la tinción de Gram); Clasificación taxonómica de las bacterias; Ubicación filogenética

de las cepas identificadas; tipo de respuesta fisiológica frente a la temperatura de crecimiento; capacidad para disolver fosfatos y carbonatos inorgánicos.

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variables	Definición	Clasificación	Indicador	Escala
Cantidad de morfotipos de colonias bacterianas	Cantidad de colonias de bacterias con morfologías diferentes que crecen en medio de cultivo agarizado en placas de Petri	Cuantitativa continua	Número de morfotipos diferentes/muestra de roca	De razón
Morfología celular	Aspecto de las células bajo el microscopio óptico con aumento de 100X	Cualitativa nominal	Bacilos Cocos Espirilos Coco-bacilos	Nominal
Tipo de pared celular	Composición y estructura de la pared celular y respuesta de las células bacterianas frente a la tinción de Gram	Cualitativa nominal	Gram positivas Gram negativas	Nominal
Clasificación taxonómica	Género al que pertenece la cepa bacteriana según la clasificación taxonómica	Cualitativa nominal	-Actinomicetos -Nitrificantes -Cianobacterias -Otras	Nominal
Ubicación filogenética de las cepas	Relaciones evolutivas con respecto a otras especies de bacterias, por análisis bioinformático de secuencias nucleotídicas del gen 16S rDNA	Cualitativa nominal	Lado al que pertenece cada cepa bacteriana	Nominal
Respuesta fisiológica a la temperatura	Aumento poblacional a diferentes temperaturas de cultivo	Cualitativa nominal	-Mesófila -Psicrotolerante -Psicrófila	Nominal
Capacidad para disolver fosfatos inorgánicos (lixiviar) in vitro	Disolución de tri-fosfato de calcio en medio agarizado NBRIP, por formación de halo transparente debido a la producción de ácidos orgánicos	Cualitativa nominal	Presencia (disuelve) o ausencia (no disuelve) de halo de disolución	Nominal
Color de pigmento sintetizado	Coloración producida por las bacterias	Cualitativa nominal	Color (amarillo, naranja, rojo, crema, etc.)	Nominal

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

La información obtenida fue recogida en una base de datos, creada en Microsoft Excel versión 2016. Para su análisis se utilizó estadística descriptiva.

II.5.1.- Procedimientos estadísticos y análisis de datos

Para el análisis se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 20. Los resultados se presentan en fotografías, frecuencias y porcentajes, mediante tablas y gráficos. También se empleó la herramienta BLAST-N y la plataforma Mega X para el análisis de las secuencias nucleotídicas (32).

II.5.2. Procedimiento para la obtención y estudio de las muestras

Aislamiento y cultivo de microorganismos:

En etapas anteriores a este trabajo, las muestras de la superficie de las rocas fueron colectadas en distintos puntos del monumento dependiendo de sus características visibles (coloración, estado de conservación, evidencia de presencia de microorganismos). Para ello se empleó la técnica no invasiva ni abrasiva del hisopado: con la ayuda de hisopos estériles humedecidos en solución salina estéril, se frotaron áreas de 10 cm².

Las muestras así colectadas fueron transportadas al laboratorio en tubos de plástico (tipo Falcon) conteniendo solución salina estéril. Luego fueron homogenizadas por agitación fuerte (vórtex), diluidas en serie e inoculadas en diferentes medios de cultivo (medio de Czapek, Agar Nutritivo, y Agar Papa Dextrosa) e incubadas durante varios días a diferentes temperaturas, hasta aparición de colonias. Una vez reaisladas, las cepas fueron almacenadas a -20 °C en medio de conservación.

Reactivación y purificación de cepas:

Las cepas bacterianas, previamente aisladas y mantenidas en medio de conservación, reactivadas mediante cultivo en medio agar nutritivo (diluido a ¼ de su concentración normal), en cabina de flujo laminar. Las placas inoculadas fueron incubadas a temperatura ambiente hasta la aparición de colonias, las cuales serán purificadas por repiques sucesivos en el mismo medio, hasta observación de colonias de fenotipo único (cultivos axénicos o puros). Estas cepas puras fueron las empleadas para las etapas posteriores del proyecto.

Determinación de la morfología de las células (tinción de Gram):

El método se basó en la visualización mediante microscopía del color que adquieren las células luego de la tinción: las bacterias Gram positivas adquieren una coloración azul-violeta, mientras que las Gram negativas una coloración rosada. Según la forma pueden ser cocos (esferas), bacilos (cilindros finos) cocobacilos, o espirilos. Algunas especies pueden estar organizadas en racimos o en cadenas dispersas.

Caracterización fisiológica:

En condiciones adecuadas de concentración y tipo de nutrientes, temperatura y pH, las poblaciones bacterianas aumentan de densidad (“crecen”) hasta alcanzar un valor crítico; esto sucede por fisión binaria de las células, aumentando progresivamente la densidad celular. La multiplicación es constante y en progresión logarítmica, el tiempo necesario para que una bacteria se duplique se denomina tiempo de generación. La tasa de crecimiento o el rendimiento de la biomasa a diferentes temperaturas de cultivo permite distinguir entre bacterias mesófilas (aquellas que crecen entre 20 y 40°C), bacterias psicrotolerantes o euripsicrófilas (aquellas que pueden multiplicarse activamente por debajo de los 20°C) y psicrófilas o stenopsicrófilas (aquellas que pueden multiplicarse activamente por debajo de 10 °C).

Para valorar este parámetro, las cepas puras se cultivaron en Agar Nutritivo (diluido ¼), medio Czapek, medio PDA, y se incubaron a diferentes temperaturas (4°C, 12°C, 20°C, 30°C) para determinar la temperatura óptima de crecimiento.

Ensayos de lixiviación in vitro en medios NBRIP y NBRIC:

La capacidad de disolver minerales inorgánicos se determinó mediante cultivo en medio NBRIC o en medio NBRIP, suplementado con fosfato de tri-calcio o con carbonato de calcio (24). Esto permitió identificar los aislados que poseen esa capacidad mediante la visualización de halos de disolución, rasgo que se asocia a la capacidad de biodeteriorar (lixiviar) materiales rocosos.

Identificación molecular de aislados bacterianos:

Con el fin de identificar las especies presentes en las distintas muestras o aquellas que sean capaces de multiplicarse en los diferentes medios de cultivo, se realizó la identificación molecular, que se basa en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región 16S y su posterior secuenciación y análisis.

Amplificación del gen 16S rDNA

La amplificación del gen 16S rDNA se realizó mediante PCR de un fragmento interno del gen que codifica para el ARN, a partir del ADN genómico de diferentes cepas puras. El ADN genómico de las bacterias fue extraído mediante lisis por ebullición a una temperatura de 100°C; para ello, se resuspendió una colonia bacteriana en 200 µL de agua destilada y se calentó en un baño María durante 10 minutos. El sobrenadante de esta suspensión se usó como fuente de ADN genómico.

Secuenciación y análisis de secuencias con BLAST

Secuenciación: se enviaron los amplicones generados por PCR a la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur) para su secuenciación mediante el método de Sanger automatizado.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las que se encuentran depositadas en las bases de datos de acceso público y gratuito (GenBank, EMBL-EBI) mediante el empleo del algoritmo denominado BLAST-N (33).

II.6.- Aspectos éticos

El proyecto de investigación no presentó conflictos bioéticos. Todo lo contrario, pues el proyecto es de mucha importancia para la comunidad local, ya que, con la preservación del monumento, que es lo que se pretende lograr, como patrimonio histórico y cultural de la nación ecuatoriana.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. Reactivación y purificación de los aislados bacterianos que colonizan las rocas del Castillo del Complejo Arqueológico Ingapirca.

Ingapirca, palabra kichwa que significa ‘muro o pared del inca’, es el nombre con el que se distingue a este yacimiento precolombino del sur andino del Ecuador. El mismo está situado a 3.160 m.s.n.m., en el interior de un paisaje natural único, dentro en una hoya de clima frío y estacional barrida constantemente por el viento que recorre la cordillera sur del Ecuador.

Las muestras fueron colectadas, en etapas previas a este trabajo, a partir de la superficie de las rocas en los distintos puntos del monumento, mediante hisopado por ser un método no abrasivo ni invasivo (Figura 1A, 1B). Estos hisopos se humedecieron en solución salina estéril y luego las muestras colectadas e tubos de plástico se trasladaron al laboratorio, para ser cultivadas e incubadas.

Con el paso del tiempo, el monumento se ha ido deteriorando por factores climáticos (precipitaciones, radiación solar, viento, etc) y factores bióticos, entre los que se cuenta el crecimiento de organismos macroscópicos (líquenes, musgos y plantas vasculares) y microscópicos (hongos, bacterias y algas). (Figuras 1C y 1D)

A



B





C



D

Figura 1. Estado actual del castillo del Complejo Arqueológico de Ingapirca A. Estructura del castillo; B. Superficie de las rocas en las que se tomaron muestras por hisopado; C. Deterioro de los muros del Castillo debido a la formación de pátinas oscuras y D. Colonización de las rocas por organismos macroscópicos.

Recolectadas las muestras a partir de las grietas, manchas, fisuras de las rocas, se procedió al aislamiento primario de microorganismos presentes en el medio rocoso, mediante el hisopado y posterior inoculación y el rastrillo microbiológico en varios medios de cultivo e incubación durante varios días a una temperatura de 12°C. Para hacerlo, se utilizaron los siguientes medios: Agar nutritivo (ya que permite mayor crecimiento y diversidad bacteriana) (Figura 2 A), medio PDA (Figura 2 B) y medio Czapek. (Figura 2 C) .

Esta técnica permitió aislar una gran cantidad de colonias bacterianas, que presentaron una amplia diversidad morfológica. Partiendo de los aislados primarios, se logró obtener cepas puras, mediante repiques sucesivos en medios agarizados.

Las cepas bacterianas puras se reactivaron mediante cultivo en medio agar nutritivo (diluido a $\frac{1}{4}$ de su concentración normal), en cabina de flujo laminar, y fueron incubadas a temperatura ambiente hasta que aparecieron las colonias. Las colonias se purificaron con repiques sucesivos en el mismo medio, hasta que se constataron colonias de fenotipo único (cultivos puros). Se reactivaron un total de 12 cepas bacterianas puras (Figura 2 D y 2 E).

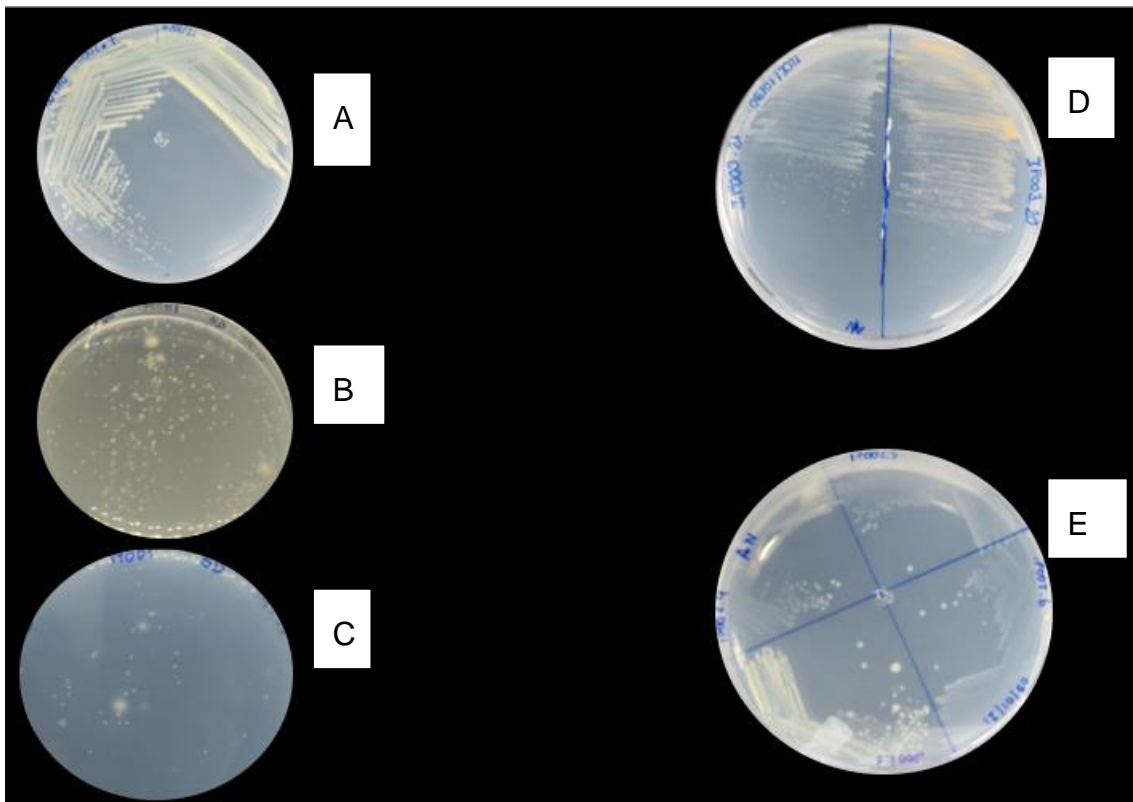


Figura 2. Placas de los cultivos primarios en diferentes medios de cultivos agarizados. A. Agar Nutritivo, B Agar PDA, C Agar Czapeck , D,E, Aislados purificados.

III.2. Capacidad lixiviante de los aislados bacterianos obtenidos.

El estudio de la capacidad para disolver el fosfato de calcio –a 20°C y en medio NBRIP- permitió determinar que los aislados se pueden dividir en cuatro grandes grupos (Tabla 1): aquellos que no disuelven NBRIP (3.15); aislados que tienen la capacidad de disolver NBRIP con baja eficiencia (4.19); aislados que tienen una capacidad media de disolver NBRIP (1.4,4.25, 1.11, 4.16, 2.14.2 y 2.3.2); y, por último, aislados que son altamente eficientes en disolver fosfatos inorgánicos (1.7, 3.5, 2.4 y 2.19.2).

En relación con la disolución del carbonato de calcio –determinado en medio NBRIC- los aislados se pueden dividir en 3 grupos (Tabla 1): aislados que tienen baja capacidad de disolver carbonatos (4.19); aislados con capacidad intermedia de disolución (3.5); aislados con capacidad de disolver carbonatos con una elevada eficiencia (1.4, 1.7, 4.25, 3.15, 1.11, 4.16, 2.14.2, 2.4, 2.19.2 y 2.3.2).

En resumen, la mayoría de los aislados disolvieron tanto el fosfato como el carbonato de calcio, mostrando diferencias en cuanto a la eficiencia de disolución de los minerales inorgánicos.

Tabla 1. Capacidad de los aislados bacterianos para disolver el fosfato de calcio (medio NBRIP) y el carbonato de calcio (medio NBRIC) a 20° C.

Aislados	NBRIP (20°C)	Halo de Disolución	NBRIC (20°C)	Halo de Disolución
1.4	+	++	+++	+++
4.25	++	++	+++	+++
1.7	++	+++	+++	+++
3.5	++	+++	++	++
3.15	-	-	+	+++
1.11	++	++	+++	+++
4.16	++	++	++	+++
4.19	+	+	+	+
2.14.2	++	++	++	+++
2.4	++	+++	+++	+++
2.19.2	+	+++	+++	+++
2.3.2	+	++	+++	+++

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

Capacidad de biolixiviación: (-) sin capacidad lixivante (ausencia de halo); (+) poca capacidad lixivante (diámetro de halo ≤ 8 mm); (++) capacidad lixivante media (diámetro de halo ≤ 11 mm); (+++) capacidad lixivante alta (diámetro de halo > 11 mm).

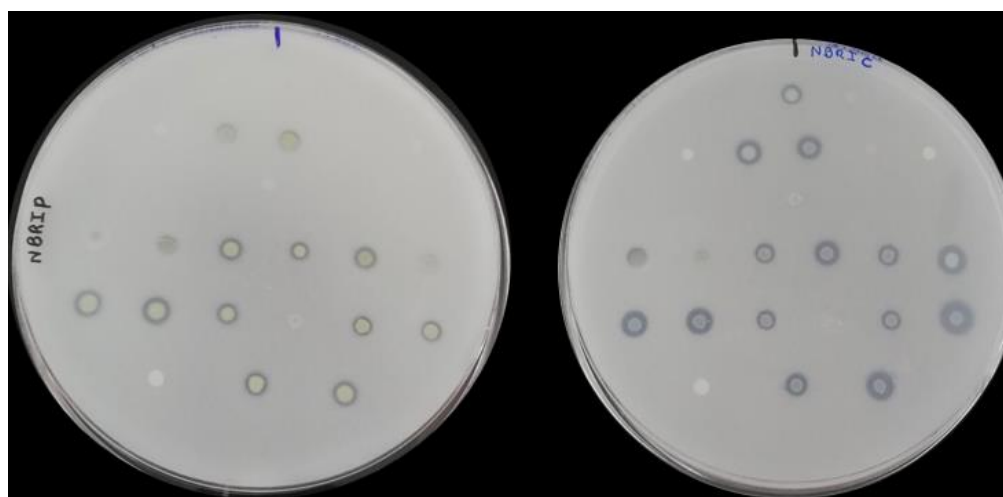


Figura 3. Crecimiento de cepas reactivadas seleccionadas y disolución de minerales inorgánicos 20°C, (Fotografía ilustrativa). A.) Agar NBRIP y B.) Agar NBRIC

III.3. Caracterización de los aislados bacterianos que disuelven minerales desde el punto de vista morfológico y fisiológico.

En total, logramos distinguir seis morfotipos de aislados bacterianos: nueve aislados cuyas colonias son amarillas y tres aislados cuyas colonias son color crema. Por otra parte, las colonias presentaron diferentes texturas, predominando la textura brillante (nueve aislados); de los aislados restantes, uno es de colonia opaca y dos presentan aspecto mucoide. Finalmente, en cuanto al tamaño de las colonias, la mayoría de ellas eran pequeñas (9 cepas), dos medianas y una de tamaño grande (cepa 4.19). Desde el punto de vista microscópico, en todos los casos los aislados correspondían a bacilos Gram negativos.

Tabla 2. Características morfológicas de los aislados bacterianos.

AISLADOS	Color	Textura	Tamaño	Tipo
1.4	Crema	Brillante	Pequeña	Bacilo Gram -
4.25	Amarilla	Brillante	Mediana	Bacilo Gram -
1.7	Crema	Brillante	Pequeña	Bacilo Gram -
3.5	Amarilla	Brillante	Pequeña	Bacilo Gram -
3.15	Amarilla	Brillante	Pequeña	Bacilo Gram -
1.11	Amarilla	Mucoide	Pequeña	Bacilo Gram -
4.16	Amarilla	Brillante	Pequeña	Bacilo Gram -
4.19	Crema	Mucoide	Grande	Bacilo Gram -
2.14.2	Amarilla	Opaco	Mediana	Bacilo Gram -
2.4	Amarillo	Brillante	Pequeña	Bacilo Gram -
2.19.2	Amarillo	Brillante	Pequeña	Bacilos Gram -
2.3.2	Amarillo	Brillante	Pequeña	Bacilo Gram -

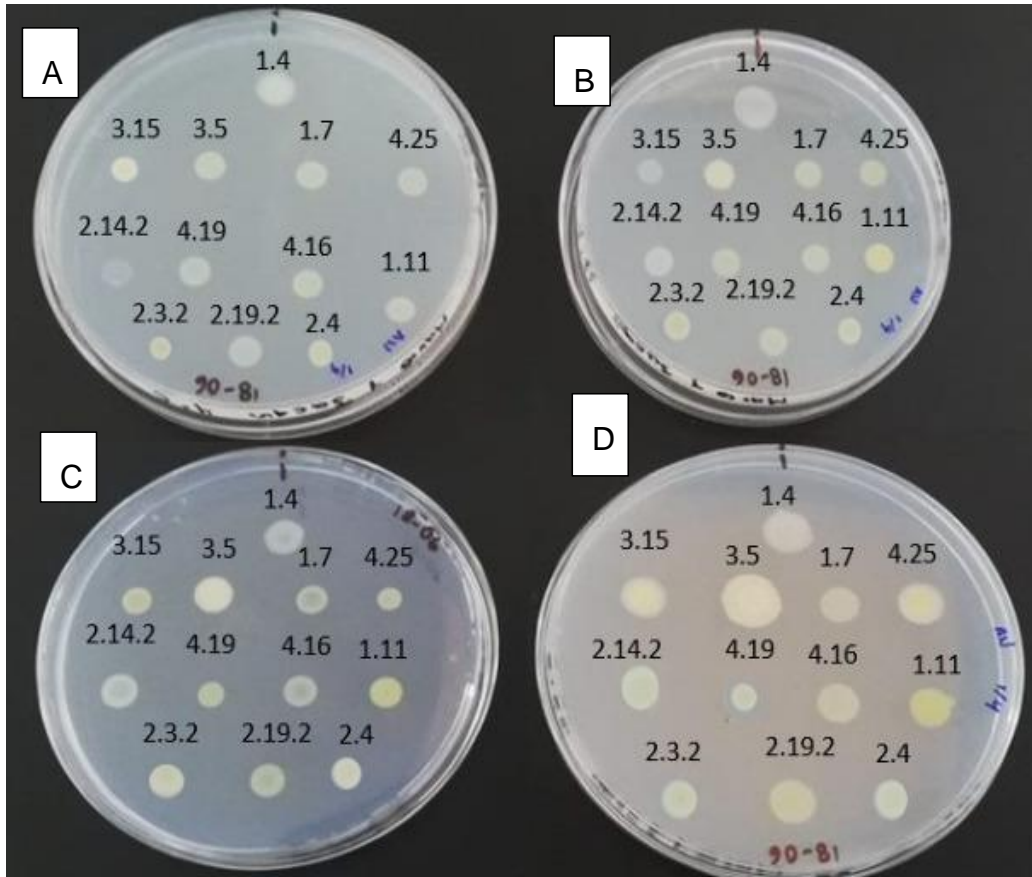


Fig4. Crecimiento de cepas bacterianas en medio Agar Nutritivo a diferentes temperaturas A.) 4°C, B.) 12°C. C.) 20°C, 30°C.

Se constató que todos los aislados bacterianos se multiplicaron a las diferentes temperaturas evaluadas (4°C, 12°C, 20°C y 30°C), aunque con algunas variaciones en este sentido. Los aislados 1.11, 2.4, 2.19.2, y 2.3.2 presentaron crecimiento escaso, aunque evidente, a 4°C, mientras que el resto de los aislados mostró un crecimiento medio.

A 12°C y 20°C la mayoría de los aislados —con excepción del aislado 1.11 que presentó poco crecimiento—, tuvieron un crecimiento medio o alto (ver Tabla 3). Sin embargo, a 30°C la mayoría de los aislados presentaron un crecimiento alto o medio, exceptuando al aislado 4.19, que tuvo poco crecimiento a esa temperatura.

Tabla 3. Crecimiento de los aislados bacterianos a diferentes temperaturas.

AISLADOS	4°C	12°C	20°C	30°C
1.4	++	+++	++	++
4.25	++	++	++	+++
1.7	++	++	++	+++
3.5	++	++	+++	+++
3.15	++	++	++	+++
1.11	+	+	+	++
4.16	++	++	++	++
4.19	++	+++	++	+
2.14.2	++	++	++	+++
2.4	+	++	++	+++
2.19.2	+	++	+++	+++
2.3.2	+	++	++	+++

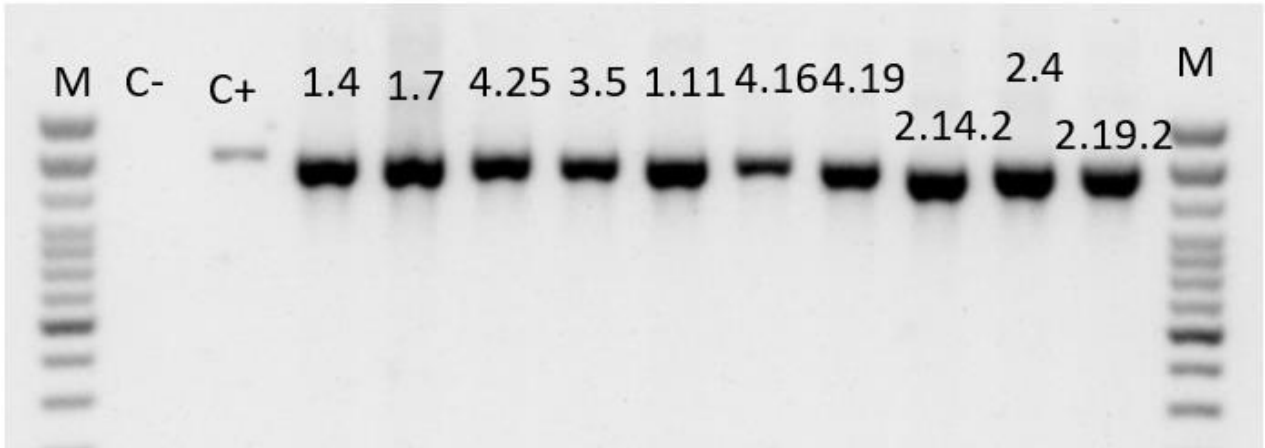
Leyenda: (-) sin crecimiento; (+) poco crecimiento; (++) crecimiento medio; (+++) abundante crecimiento.

III.4. Amplificación por PCR del gen que codifica para el ARNr 16S en cada uno de los genomas de los aislados obtenidos.

Una vez optimizadas las condiciones de amplificación del gen 16S rDNA, a partir del ADN genómico de una cepa de *E. coli*, se llevó a cabo la amplificación de este marcador molecular a partir del ADN genómico de las cepas aisladas en Ingapirca.

Empleando los cebadores 27f-YM y 1492 R, el resultado fue excelente como se muestra en las figuras 5A y 5B, y con el uso del ADN genómico de una cepa de *Escherichia coli* como control positivo. En todos los casos, se observa claramente la amplificación de una banda específica de ADN, de un tamaño aproximado de 1.500 pb.

A



B

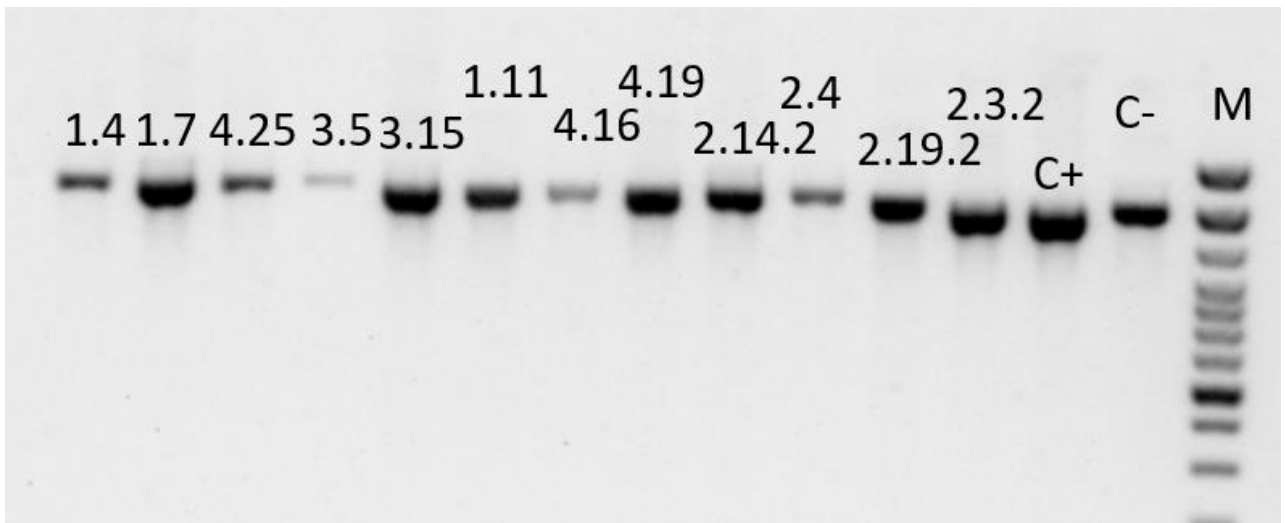


Fig 5. Amplificación del gen 16S ADNr mediante Reaccion en Cadena de la Polimerasa. A y B) Amplificación por PCR del gen 16S rDNA (M: marcadores de longitud molecular , C+ : control positivo ; C- : control negativo, ADN de cepas bacterianas).

III.5. Identificación de los aislados mediante análisis de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para el ARNr 16S.

Los amplicones obtenidos por PCR se enviaron a la empresa Macrogen para su secuenciación mediante el método de Sanger automatizado. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las depositadas en las bases de datos de acceso público y gratuito (GenBank, EMBL-EBI) mediante el empleo del algoritmo BLAST-N.

Se pudo constatar que todas las cepas aisladas pertenecen al género *Pseudomonas* (Tabla 4). La mayoría de ellas son filogenéticamente muy cercanas a la especie *Pseudomonas lutea* (10 cepas), mientras que otras dos lo son de las especies *Pseudomonas reinekei* y *Pseudomonas rhizosphaerae*, respectivamente.

Tabla 4. Identificación molecular de los 12 aislados reactivados, a partir de la secuenciación y análisis del gen 16S rDNA.

Aislados	Especie filogenéticamente más cercana / GenBank, EMBL-EBI)	% de identidad	% de cobertura	Longitud secuenc.(pb)
1,4	<i>Pseudomonas reinekei</i> strain MT1	99.62%	100%	1051
1.7	<i>Pseudomonas lutea</i> strain OK2	99.71%	99%	1054
4,25	<i>Pseudomonas lutea</i> strain OK2	99.90%	100%	1018
3.5	<i>Pseudomonas lutea</i> strain OK2	96.50%	90%	1336
3.15	<i>Pseudomonas lutea</i> strain OK2	96.45%	94%	1320
1.11	<i>Pseudomonas lutea</i> strain OK2	97.41%	84%	1412
4.16	<i>Pseudomonas lutea</i> strain OK2	96.75%	86%	1369
4.19	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> strain IH5	95.99%	85%	1374
2.14.2	<i>Pseudomonas lutea</i> strain OK2	96.43%	88%	1370
2.4	<i>Pseudomonas lutea</i> strain OK2	97.07%	84%	1393
2.19.2	<i>Pseudomonas lutea</i> strain OK2	96.27%	88%	1402
2.3.2	<i>Pseudomonas lutea</i> strain OK2	96.92%	80%	1361

DISCUSIÓN

Los estudios sobre el biodeterioro de monumentos arqueológicos, de gran valor histórico y que se localizan en las zonas altas de las regiones montañosas son escasos (34); por tal razón, toda la información que se genere en torno a este tema será un aporte significativo al conocimiento del mismo. En el presente estudio hemos observado que 12 cepas bacterianas, aisladas originalmente a partir de la superficie de las roas del Castillo del MAI, son capaces de adaptarse a diferentes temperaturas y presentan capacidad biolixivante. Esto indica que las cepas bacterianas capaces de colonizar ambientes fríos pueden deteriorar ciertos minerales, a pesar de que las condiciones ambientales bajo las cuales esto suceda no sean las que, normalmente, consideramos como “idóneas” (alta humedad y temperatura).

Como hemos visto, el biodeterioro de matrices minerales (como las rocas o los sustratos pétreos) es causado por varios grupos de microorganismos y depende de las complejas interacciones que se establecen entre los mismos y el sustrato sobre (o dentro del) el cual son capaces de multiplicarse. El deterioro causado por los microorganismos también está estrechamente relacionado con su capacidad de adherirse al sustrato; esto se debe no solamente al propio material, sino también a las características de los microorganismos y las formas a través de las cuales se adhieren a su superficie (15).

La mayoría de los monumentos del mundo está construido de piedra (1), y aunque estas se consideran entre los materiales más duraderos, son igualmente afectadas por el biodeterioro, sobre todo en su superficie. En general, y con raras excepciones, los sustratos pétreos son porosos y favorecen la adherencia de los microorganismos y su penetración a través de grietas e irregularidades del mismo; esto puede causar una mayor afectación de las rocas, sobre todo por la capacidad de crecimiento y adaptación que tienen las bacterias (35). En tal sentido, Matos et al (20) indican que los organismos oportunistas, que colonizan rápidamente materiales rocosos, son capaces de utilizar compuestos fácilmente disponibles como nutrientes y de vivir endolíticamente, provocando su deterioro (20).

Por su parte, Miller *et al* (23) establecieron una relación entre los altos valores de absorción de agua por capilaridad y porosidad abierta de varios tipos de piedra caliza y el aumento de la permeabilidad de las mismas, características que facilitan su colonización por parte de los microorganismos y su posterior biodeterioro (23). Por otro lado, Prieto *et al* (24) indican que los niveles de CO₂ también son importantes para la colonización de edificios de granito (24).

Todo esto determina que el biodeterioro sea un problema de difícil solución, particularmente en el campo de la conservación de estructuras a base de materiales pétreos.

Los monumentos americanos construidos antes de la conquista muestran un alto nivel de biodeterioro y esto se relaciona con la presencia de bacterias. Un ejemplo de esto son los edificios mayas mexicanos, donde los lugares más expuestos al medio se evidencian decoloraciones grisáceas-negruczas, ocasionadas por bacterias con alta resistencia a la baja humedad y la radiación solar (36).

En nuestro estudio, los aislados bacterianos obtenidos mostraron alta capacidad lixivante, lo que implica un impacto importante en términos de biodeterioro. Cuando estas bacterias secretan ácidos orgánicos, afectan la estructura química del mineral, provocando grietas o incrementando las ya existentes, así como causando otras alteraciones que promueven además un mayor deterioro por la acción de los factores climáticos (37).

El estudio de la morfología y fisiología de los aislados bacterianos permitió conocer las temperaturas a las cuales se produce el crecimiento óptimo de estos microorganismos. Esto es relativamente novedoso en el campo de estudio, pues la mayoría de las investigaciones en este sentido se han desarrollado en monumentos ubicados en zonas tropicales o subtropicales. Las zonas más frías y secas muestran una variabilidad y diversidad mucho menor de especies microbianas que provocan biodeterioro, pero su efecto podría ser tan importante como el de las especies de regiones más cálidas y húmedas (2). En relación con este aspecto, Liu *et al.* (2020) llaman la atención sobre el nivel de degradación de los monumentos de piedra caliza en antiguas ciudades mayas (ubicadas en México), comparado con el de menor

magnitud observado en Mogao y en las Grutas de Maijishan, al oeste de China, una zona fría y árida (13).

Las bacterias mesófilas predominan en los climas cálidos y húmedos, porque se desarrollan mejor a temperaturas que sobrepasan los 25°C (38,13). En la presente investigación, solo una de las cepas bacterianas aisladas presentó este tipo de comportamiento; por el contrario, el resto de las cepas se multiplicaron activamente a temperaturas por debajo de los 20°C (39).

La adaptación evolutiva de los microorganismos a temperaturas bajas o altas a menudo conduce al compromiso de permitirles existir solo en esas condiciones. Sin embargo, los organismos denominados *euritermales* crecen en un amplio rango de temperaturas, a diferencia de lo que sucede con los organismos estenotérmicos, cuyo crecimiento se restringe a un rango estrecho de temperaturas. Por lo tanto, las bacterias euripsicrófilas serían capaces de crecer en un amplio rango de temperaturas, que puede oscilar de 0°C -en la parte inferior- a 20 o 30°C en el límite superior (40).

Los microorganismos aislados de ambientes fríos y capaces de crecer a bajas temperaturas ($\leq 0^{\circ}\text{C}$) generalmente se han clasificado como euripsicrófilos (anteriormente psicrótrofos/psicrotolerantes), ya que esos organismos poseen un rango de crecimiento más amplio ($T_{\text{max}} > 20^{\circ}\text{C}$); aunque en ocasiones son capaces de crecer a muy bajas temperaturas (-15°C), por lo general conservan un crecimiento óptimo a temperaturas superiores a 20°C. Por su parte, los microorganismos estenopsicrófilos (anteriormente denominados “verdaderos psicrófilos”) exhiben rangos de temperaturas óptimas de crecimiento más estrechos ($T_{\text{max}} \sim 20^{\circ}\text{C}$), y por lo general crecen de manera óptima a temperaturas que oscilan entre 5 y 15°C (41).

La gran mayoría de los estudios sobre la adaptación al frío y el crecimiento, especialmente proteomas y transcriptomas, se han centrado en gran medida en euripsicrófilos (42).

Comparativamente, los microorganismos estenopsicrófilos, especialmente bacterias, son menos conocidos. Una característica de este grupo de microorganismos es su

capacidad para aumentar la energía y el metabolismo del carbono a estas temperaturas (43).

Si bien ambos tipos de organismos han sido estudiados por sus propiedades de adaptación al frío, casi ningún estudio ha comparado directamente los dos tipos de psicrófilos (euri- y steno-psicrófilos) para dilucidar sus rasgos adaptativos al frío y comparar y contrastar las diferentes estrategias que caracterizan sus variadas capacidades de crecimiento (43).

La ubicación del Complejo Ingapirca en una zona donde imperan una elevada humedad, bajas temperaturas, y una menor disponibilidad de oxígeno, determina que la colonización microbiana de sus rocas requiera de características y adaptaciones especiales; de allí la importancia de estudiar estos microbios en profundidad, como en el presente trabajo, pues esto permitirá comprender cómo es que este tipo de microorganismos extraen los nutrientes necesarios de estos ecosistemas muy pobres en cuanto a material nutritivo se refiere (oligotróficos) (44,45).

Como hemos visto, en el estudio predominaron las bacterias de coloración amarilla, lo que indica la presencia de pigmentos carotenoides, que brindan protección ante la radiación UV de origen solar, que a estas altitudes es mayor (45).

Las 12 cepas de bacterias heterótrofas reactivadas pertenecen al género *Pseudomonas*, según lo establecido en base al análisis de la secuencia de uno de sus genes ribosomales (16S rDNA). Se trata de un resultado que se relaciona con estudios como el de Saíz y Videla (2002) (46), quienes han mostrado que cepas de esta misma especie son comunes en monumentos arqueológicos de la arquitectura maya. Generalmente, cepas pertenecientes a este género presentan una marcada acción acidificante y también son productoras de biofilms mucilaginosos.

CAPÍTULO IV
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

IV.1.- CONCLUSIONES

- La mayoría de las cepas bacterianas heterótrofas reactivadas disolvieron tanto el fosfato como el carbonato de calcio, mostrando alta capacidad lixivante.
- Se constató crecimiento de estas cepas a diferentes temperaturas, en un rango que varía entre los 4 °C y los 30 °C. La mayoría de las cepas se comportan como psicrotolerantes (o como euripsicrófilas), mientras que una de ellas se comportó como mesófila y otra como stenopsicrófila.
- Los 12 aislados se identificaron mediante métodos moleculares como pertenecientes al género *Pseudomonas*, siendo la especie *Pseudomonas lutea* la más frecuente.
- A partir de los hallazgos obtenidos se podrán orientar estrategias para la restauración y protección de este monumento.

IV.2.- RECOMENDACIONES

- Recalcar la importancia de estudiar el biodeterioro pues se pudo comprobar que estas bacterias tienen alto poder lixivante y se necesita del mayor interés en este aspecto por lo nocivo que puede resultar para el Complejo Ingapirca.
- Divulgar los resultados de este estudio en la comunidad científica relacionada con el biodeterioro de monumentos, como un aporte más a este tipo de investigaciones.
- Continuar los estudios de este tipo en el resto de los monumentos arqueológicos de la región y el país, para conocer el estado del biodeterioro en los mismos y los organismos (microorganismos u otros) responsables.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wierzchos J, Casero MC, Artieda O, Ascaso C. Endolithic microbial habitats as refuges for life in polyextreme environment of the Atacama Desert. *Curr Opin Microbiol.* 2018; 43(124-131) Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29414443/>: p. 124-31.
2. Ortega O, Montero JL, Baptista JA, Beech IB, Sunner J, Gaylarde C. Deterioration and cyanobacterial colonization of cultural heritage stone buildings in polluted and unpolluted tropical and subtropical climates: A meta-analysis. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2019; 3(4) Disponible en: <https://www.mdpi.com/2571-9408/3/4/81/htm>).
3. Pinheiro AC, Mesquita N, Trovão J, Soares F, Tiago I, Coelho C. Limestone biodeterioration: A review on the Portuguese cultural heritage scenario. *J Cult Herit.* 2019; 36(275-285) Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1296207418303820>): p. 275-85.
4. De Turrís A, Ocando L, De Romero MF, Fernández M. ¿Pueden los microorganismos impactar los materiales de construcción? Una revisión. *Gaceta Técnica.* 2013; 10: p. 23-33.
5. Del Mondo A, Pinto G, Carbone DA, Pollio A, De Natale A. Biofilm architecture on different substrates of an *Oculatella subterranea* (Cyanobacteria) strain isolated from Pompeii archaeological site (Italy). *Environ Sci Pollut Res.* 2018; 25(26079–26089) Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-018-2643-5>).
6. Gaylarde C. Influence of Environment on Microbial Colonization of Historic Stone Buildings with Emphasis on Cyanobacteria. *Heritage.* 2020; 3(4) Disponible en: <https://www.mdpi.com/2571-9408/3/4/81>): p. 1469-82.

7. Bruno L, Rugnini L, Spizzichino V, Caneve L, Canini A, Ellwood NT. Biodeterioration of Roman hypogea: the case study of the Catacombs of SS. Marcellino and Pietro(Rome,Italy). *Annal of Microbiology*. 2019; 69(10) Disponible en: <https://annalsmicrobiology.biomedcentral.com/articles/10.1007/s13213-019-01460-z>): p. 1023-32.
8. Abdel TM, Omar AM, Elwkeel FM, Al Abboud MA, Alawlaqi MM. Fungal deterioration of limestone false-door monument. *Heliyon*. 2019; 5(10) Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844019363339>).
9. Sameño M. El biodeterioro en edificios del patrimonio cultural. Metodología de evaluación de tratamientos biocidas. Tesis Doctoral. Sevilla: Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico, Ingeniería Química y Ambiental.Disponible en: <https://repositorio.iaph.es/bitstream/11532/327230/1/Tesis%20sin%20Bloque%20III.pdf>.
10. García G. Biocolonización de patrimonio en piedra: una revisión. Tesis de Grado. Cajicá: Universidad Militar Nueva Granada, Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas.Disponible en: <https://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/handle/10654/38036/Garc%C3%ADaGarz%C3%B3nGinarySof%C3%ADa2021.pdf.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
11. Pandey N, Jain R, Pandey A, Tamta S. Optimisation and characterisation of the orange pigment produced by a cold adapted strain of *Penicillium* sp. (GBPI_P155) isolated from mountain ecosystem. *Mycology*. 2018; 9(2) Dispñible en: DOI: 10.1080/21501203.2017.1423127): p. 81-92.

12. Sanmartin P, Grove R, Carballeira R, Viles H. Impact of colour on the bioreceptivity of granite to the green alga *Apatococcus lobatus*: Laboratory and field testing. *Sci Total Environ.* 2020; 745(25) Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969720347082>).
13. Liu X, Koestler RJ, Warscheid T, Katayama Y, Gu J. Microbial deterioration and sustainable conservation of stone monuments and buildings. *Nat Sustain.* 2020; 1(991–1004) Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41893-020-00602-5>).
14. Gaylarde C, Baptista JA, Ogawa A, Kowalski M, Celikkol S, Beech I. Epilithic and endolithic microorganisms and deterioration on stone church facades subject to urban pollution in a sub-tropical climate. *Biofouling.* 2017; 33(2) Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28054493/>): p. 113-127.
15. Li Q, Zhang B, Yang X, Ge Q. Deterioration-associated microbiome of stone monuments: Structure, variation, and assembly. *Appl Environ Microbiol.* 2018; 84(7) Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29374040/>).
16. Zhang G, Gong C, Gu J, Katayama Y, Someya T, Gu JD. Biochemical reactions and mechanisms involved in the biodeterioration of stone world cultural heritage under the tropical climate conditions. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2019; 143(Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0964830519308340>).
17. Esposito A, Borruso L, Rattray JE, Brusetti L, Ahmed E. Taxonomic and functional insights into rock varnish microbiome using shotgun metagenomics. *FEMS Microbiol Ecol.* 2019; 95(12) Disponible en: <https://academic.oup.com/femsec/article/95/12/fiz180/5626342>).
18. Barrionuevo MR, Hidalgo GE, Gaylarde C. Physical and microbiological analysis of sandstone deterioration in the Argentine Jesuit missions.

Geomicrobiol J. 2016; 1(671-676) Disponible en:
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01490451.2015.1079668>).

19. Meireles A, Vieira KR, Basso SR, Meireles A, Queiroz MI, Queiroz ZL, et al. Heterotrophic cultivation of cyanobacteria: Study of effect of exogenous sources of organic carbon, absolute amount of nutrients, and stirring speed on biomass and lipid productivity. *Front Bioeng Biotechnol.* 2017; 5(Disponible en:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2017.00012/full#:~:text=10.3389%2Ffbioe.2017.00012-,Heterotrophic%20Cultivation%20of%20Cyanobacteria%3A%20Study%20of%20Effect%20of%20Exogenous%20Sources,on%20Biomass%20and%20Lipid%20Product>).
20. Matos P, Vieira J, Rocha B, Branquinho C, Pinho P. Modeling the provision of air-quality regulation ecosystem service provided by urban green spaces using lichens as ecological indicators. *Sci Total Environ.* 2019; 665(Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/330826371_Modeling_the_provision_of_air-quality_regulation_ecosystem_service_provided_by_urban_green_spaces_using_lichens_as_ecological_indicators): p. 521-30.
21. Villa F, Stewart PS, Klapper I, Jacob JM, Cappitelli F. Subaerial biofilms on outdoor stone monuments: Changing the perspective toward an ecological framework. *BioScience.* 2016; 66(4) Disponible en:
<https://academic.oup.com/bioscience/article/66/4/285/2464002>): p. 285-94.
22. Ogawa A, Celikkol S, Gaylarde C, Baptista JA, Beech I. Microbial communities on painted wet and dry external surfaces of a historic fortress in Niteroi, Brazil. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2017; 123(164-173) Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0964830517306297>):
p. 164-73.

23. Miller AZ, Dionisio A, Macedo MF, Saíz C. Primary bioreceptivity of limestones to phototrophic microorganisms: A laboratory-based stone colonization experiment. *Technoheritage*. 2017; 97(Disponible en: <https://digital.csic.es/handle/10261/155200>).
24. Prieto B, Vázquez D, Fuentes E, Durán AG. Response of subaerial biofilms growing on stone-built cultural heritage to changing water regime and CO₂ conditions. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2020; 148(104882) Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0964830519310212>).
25. García AM. Grupo Especializado de Biodeterioro, Biodegradación y Biorremediación. *Sem@foro*. 2018; 66(Disponible en: <https://www.sem microbiologia.org/wp-content/uploads/2021/04/16-Especial-Presentacion.pdf>): p. 35-37.
26. Ascaso C, Wierzchos J, De los Ríos A. Evaluación de tratamientos con láser y biocidas para la eliminación de agentes biológicos que inducen biodeterioro. *Sem@foro*. 2018; 66(Disponible en: <https://www.sem microbiologia.org/wp-content/uploads/2021/04/21-Especial-Laser.pdf>): p. 47-49.
27. Junier P, Joseph E. Microbial biotechnology approaches mitigating the. *Microbial Biotechnology*. 2017; 10(5) Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28771996/>): p. 1145-8.
28. Dick J, De Windt W, De Graef B, Saveyn H, Van der Meeren P, De Belie N, et al. Bio-deposition of calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. *Biodegradation*. 2006; 17(4) Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16491305/>): p. 357-67.

29. Dhama N, Reddy MS, Mukherjee A. Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. *Frontiers in Microbiology*. 2013; 29(Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2013.00314/full>).
30. Li Q, Zhang B, He Z, Yang X. Distribution and diversity of bacteria and fungi colonization in stone monuments analyzed by high-throughput sequencing. *PLoS ONE*. 2016; 11(9) Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0163287>).
31. Becerra J, Zaderenko AP, Gómez MA, Ortiz P. Nanoparticles applied to stone buildings. *Int J Architect Herit*. 2019; 15(9) Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15583058.2019.1672828?journalCode=uarc20>).
32. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 2018; 35(6) Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29722887/>): p. 1547-9.
33. Sequence Read Archive Submissions Staff. Downloading and Accessing Data. NCBI. 2014;(Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56556/>).
34. 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(Disponible en: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/364/1/012074/pdf>).

35. Th.Warscheida , J.Braams. Biodeterioration of stone: a review. En Th.Warscheida , J.Braams. Biodeterioration of Cultural Property 2, Part 2.; 2000. p. 343-368.
36. Ortega BO, Gaylarde C, Anaya A, Chan MJ, De la Rosa SC, Arano D, et al. Orientation affects Trentepohlia-dominated biofilms on Mayan monuments of the Rio Bec style. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2013; 84(351-356) Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096483051200203X>: p. 351-6.
37. Castro RD, López AL. Enfoque químico del deterioro y biodeterioro de rocas calcáreas conformantes de monumentos patrimoniales de importancia histórica y cultural. *Revista Luna Azul.* 2013;(36) Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/luaz/n36/n36a13.pdf>).
38. Mihajlovski A, Seyer D, Benamara H, et al. An overview of techniques for the characterization and quantification of microbial colonization on stone monuments. *Ann Microbiol.* 2015; 65(1243–1255) Disponible en: <https://annalsmicrobiology.biomedcentral.com/articles/10.1007/s13213-014-0956-2>).
39. Martínez V. Evaluación del expolisácarido producido por una bacteria. Tesis de grado. Santiago de Chile. Disponible en: <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/248292>.
40. Bakermans C, Neilson KH. Relationship of Critical Temperature to Macromolecular Synthesis and Growth Yield in *Psychrobacter cryopegella*. *J Bacteriol.* 2004; 186(8) Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC412111/>).
41. Bakermans C, Bergholz P, Rodrigues DF, Vishnivetskaya ta. Genomic and Expression Analyses of Cold-Adapted Microorganisms. *Research Gate.*

- 2011;(Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/236400575_Genomic_and_Expression_Analyses_of_Cold-Adapted_Microorganisms).
42. Rao RP, Reddy BV. Comparative proteome analysis of psychrophilic versus mesophilic bacterial species: Insights into the molecular basis of cold adaptation of proteins. *BMC Genomics*. 2009;(Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2653534/>).
43. Raymond I, Tremblay J, Altusher I, et al. Comparative Transcriptomics of Cold Growth and Adaptive Features of a Eury- and Steno-Psychrophile. *Front. of Microb.* 2018;(Disponible en:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01565/full>).
44. Oliart-Ros RM, Manresa-Presas Á, Sánchez-Otero MG. Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT*. 2016; II(I) Disponible en:
<http://www.scielo.org.mx/pdf/cuat/v11n1/2007-7858-cuat-11-01-00079.pdf>).
45. Kumar R, Singh D, Swarnkar M, Singh A, 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; 220(86-7) Disponbiel en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26806489/>).
46. Saíz C, Videla HA. *Biodeterioro de monumentos de Iberoamerica*. 1st ed. Madrid: CYTED; 2002.

ANEXOS

Anexo 1 . Secuencias Nucleotídicas

IP 1.4

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGACAGGAGC
TTGCTCCTGAATTCAGC

GGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGRTAGTGGGGGACAACGTT
TCGAAAGGAACGCTAAT

ACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCA
GATGAGCCTAGGTCGGA

TTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCT
GAGAGGATGATCAGTCA

CACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGGACAATGGGCGAAA

GCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCAC
TTTAAGTTGGGAGGAAG

GGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGC
TAACTCTGTGCCAGCA

GCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGC
GCGCGTAGGTGGTTTGT

TAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAACCTGA
CAAGCTAGAGTATGGTA

GAGGGTGGTGGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCG

ACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
GATTAGATACCCTGGTAG

TCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGC
GCAGCTAACGCATTAA

GTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGG
GGGCCCGCACAAAGCGGT

GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACA
TCCAATGAACTTTCCAG

AGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC
AGCTCGTGTCTGTGAGAT

GTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTT
ATGGTGGGCACTCTAA

GGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCA
TGGCCCTTACGGCCTGGG

CTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGA
GCTAATCCATAAAACC

GATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCT
AGTAATCGCGAATCAGA

ATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGG
GAGTGGGTTGCACCAG

AAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACT
GGGGTGAAGTCGTAACA

AGGTAGCCGTAGGGGAACCTGC

IP 1.7

TAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCA
AGTCGAGCGGATGAAGG

GAGCTTGCTCCCTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGC
CTGGTAGTGGGGGACAA

CGTCTCGAAAGGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGA
CCTTCGGGCCTTGCGCT

ATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAG
GCGACGATCCGTAAGT

GTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGG

AATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAA
GGTCTTCGGATTGTAAA

GCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGCTAATTAATACTTCGCTGTTTTGACGTT
ACCGACAGAATAAGCA

CCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTA

AAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGAATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCT
GGGAAGTGCATCCAAAA

CTGGCAAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATAGGAA

GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGGCTCATACTGACACTGAGGTGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAA

CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTG
GAAGCCTTGAGCTTTTA

GTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT
AAAAGTCAAATGAATTG

ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAGGCCTT

GACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGAC
AGGTGCTGCATGGCTGT

CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTT
GTCCTTAGTTACCAGC

ACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAAGTCA

TCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGG
GTTGCCAAGCCGCGAGG

TGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGA
CTGCGTGAAGTCGGAAT

CGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC
ACACCGCCCGTCACAC

CATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTT
ACCACGGTGTGATTCAT

GACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGNGGCTGGATCA
CCTCCTTA

IP 4.25

TAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCA
AGTCGAGCGGATGAAGG

GAGCTTGCTCCCTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGC
CTGGTAGTGGGGGACAA

CGTCTCGAAAGGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGA
CCTTCGGGCCTTGCGCT

ATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAG
GCGACGATCCGTAAGT

GTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGG

AATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAA
GGTCTTCGGATTGTAAA

GCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGCTAATTAATACTTCGCTGTTTTGACGTT
ACCGACAGAATAAGCA

CCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTA

AAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGAATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCT
GGGAAGTGCATCCAAAA

CTGGCAAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATAGGAA

GGAACACCAGTGGCGAAGGGCGACCACCTGGGCTCATACTGACACTGAGGTGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAA

CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTG
GAAGCCTTGAGCTTTTA

GTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT
AAAAGTCAAATGAATTG

ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAGGCCTT

GACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGAC
AGGTGCTGCATGGCTGT

CGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTT
GTCCTTAGTTACCAGC

ACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAAGTCA

TCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGG
GTTGCCAAGCCGCGAGG

TGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGA
CTGCGTGAAGTCGGAAT

CGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC
ACACCGCCCGTCACAC

CATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTT
ACCACGGTGTGATTCAT

GACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGNGGCTGGATCA
CCTCCTTA

IP 3.5

TAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCA
AGTCGAGCGGATGAAGG

GAGCTTGCTCCCTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGC
CTGGTAGTGGGGGACAA

CGTCTCGAAAGGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGA
CCTTCGGGCCTTGCGCT

ATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAG
GCGACGATCCGTAAGT

GTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGG

AATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAA
GGTCTTCGGATTGTAAA

GCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGCTAATTAATACTTCGCTGTTTTGACGTT
ACCGACAGAATAAGCA

CCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTA

AAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGAATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCT
GGGAAGTGCATCCAAAA

CTGGCAAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATAGGAA

GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGGCTCATACTGACACTGAGGTGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAA

CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTG
GAAGCCTTGAGCTTTTA

GTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT
AAAAGTCAAATGAATTG

ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAGGCCTT

GACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGAC
AGGTGCTGCATGGCTGT

CGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTT
GTCCTTAGTTACCAGC

ACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAAGTCA

TCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGGTACAGAGG
GTTGCCAAGCCGCGAGG

TGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGA
CTGCGTGAAGTCGGAAT

CGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC
ACACCGCCCGTCACAC

CATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTT
ACCACGGTGTGATTCAT

GACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGNGGCTGGATCA
CCTCCTTA

IP 3.15

TAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCA
AGTCGAGCGGATGAAGG

GAGCTTGCTCCCTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGC
CTGGTAGTGGGGGACAA

CGTCTCGAAAGGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGA
CCTTCGGGCCTTGCGCT

ATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAG
GCGACGATCCGTAAGT

GTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGG

AATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAA
GGTCTTCGGATTGTAAA

GCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGCTAATTAATACTTCGCTGTTTTGACGTT
ACCGACAGAATAAGCA

CCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTA

AAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGAATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCT
GGGAACTGCATCCAAAA

CTGGCAAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATAGGAA

GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGGCTCATACTGACACTGAGGTGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAA

CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTG
GAAGCCTTGAGCTTTTA

GTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT
AAAACCTCAAATGAATTG

ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAGGCCTT

GACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGAC
AGGTGCTGCATGGCTGT

CGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTT
GTCCTTAGTTACCAGC

ACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAAGTCA

TCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGG
GTTGCCAAGCCGCGAGG

TGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGA
CTGCGTGAAGTCGGAAT

CGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC
ACACCGCCCGTCACAC

CATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTT
ACCACGGTGTGATTCAT

GACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGNGGCTGGATCA
CCTCCTTA

IP 1.11

TAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCA
AGTCGAGCGGATGAAGG

GAGCTTGCTCCCTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGC
CTGGTAGTGGGGGACAA

CGTCTCGAAAGGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGA
CCTTCGGGCCTTGCGCT

ATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAG
GCGACGATCCGTAAGT

GTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGG

AATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAA
GGTCTTCGGATTGTAAA

GCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGCTAATTAATACTTCGCTGTTTTGACGTT
ACCGACAGAATAAGCA

CCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTA

AAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGAATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCT
GGGAAGTGCATCCAAAA

CTGGCAAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATAGGAA

GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGGCTCATACTGACACTGAGGTGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAA

CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTG
GAAGCCTTGAGCTTTTA

GTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT
AAAAGTCAAATGAATTG

ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAGGCCTT
GACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGAC
AGGTGCTGCATGGCTGT
CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTT
GTCCTTAGTTACCAGC
ACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAAGTCA
TCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGG
GTTGCCAAGCCGCGAGG
TGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGA
CTGCGTGAAGTCGGAAT
CGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC
ACACCGCCCGTCACAC
CATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTT
ACCACGGTGTGATTCAT
GACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGNGGCTGGATCA
CCTCCTTA

IP 4.16

TAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCA
AGTCGAGCGGTTGAAGG

AAGCTTGCTTCCTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGC
CTGGTAGTGGGGGACAA

CGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGA
CCTTCGGGCCTTGCGCT

ATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAG
GCGACGATCCGTAAGT

GTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGNGGGG

AATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAA
GGTCTTCGGATTGTAAA

GCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCGAATACCTTGCTGTTTTGACGTT
ACCGACAGAATAAGCA

CCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTA

AAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGAATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCT
GGGAAGTGCATCCAAAA

CTGGCAAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATAGGAA

GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGGCTCATACTGACACTGAGGTGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAA

CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTG
GGAGTCTTGAAGTCTTA

GTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT
AAAAGTCAAATGAATTG

ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAGGCCTT

GACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGAC
AGGTGCTGCATGGCTGT

CGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTT
GTCCTTAGTTACCAGC

ACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG
GGGATGACGTCAAGTCA

TCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGGTACAGAGG
GTCGCCAAACCGCGAGG

TGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGA
CTGCGTGAAGTCGGAAT

CGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC
ACACCGCCCGTCACAC

CATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTT
ACCACGGTGTGATTCAT

GACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGTGGCTGGATCA
CCTCCTTA

IP 4.19

TAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCA
AGTCGAGCGGATGAAGG

GAGCTTGCTCCCTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGC
CTGGTAGTGGGGGACAA

CGTCTCGAAAGGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGA
CCTTCGGGCCTTGCGCT

ATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAG
GCGACGATCCGTAAGT

GTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGG

AATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAA
GGTCTTCGGATTGTAAA

GCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGCTAATTAATACTTCGCTGTTTTGACGTT
ACCGACAGAATAAGCA

CCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTA

AAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGAATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCT
GGGAAGTGCATCCAAAA

CTGGCAAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATAGGAA

GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGGCTCATACTGACACTGAGGTGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAA

CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTG
GAAGCCTTGAGCTTTTA

GTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT
AAAAGTCAAATGAATTG

ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAGGCCTT

GACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGAC
AGGTGCTGCATGGCTGT

CGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTT
GTCCTTAGTTACCAGC

ACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAAGTCA

TCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGG
GTTGCCAAGCCGCGAGG

TGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGA
CTGCGTGAAGTCGGAAT

CGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC
ACACCGCCCGTCACAC

CATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTT
ACCACGGTGTGATTCAT

GACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGNGGCTGGATCA
CCTCCTTA

IP 2.14.2

TAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCA
AGTCGAGCGGATGAAGG

GAGCTTGCTCCCTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGC
CTGGTAGTGGGGGACAA

CGTCTCGAAAGGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGA
CCTTCGGGCCTTGCGCT

ATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAG
GCGACGATCCGTAAGT

GTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGG

AATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAA
GGTCTTCGGATTGTAAA

GCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGCTAATTAATACTTCGCTGTTTTGACGTT
ACCGACAGAATAAGCA

CCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTA

AAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGAATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCT
GGGAAGTGCATCCAAAA

CTGGCAAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATAGGAA

GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGGCTCATACTGACACTGAGGTGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAA

CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTG
GAAGCCTTGAGCTTTTA

GTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT
AAAAGTCAAATGAATTG

ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAGGCCTT

GACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGAC
AGGTGCTGCATGGCTGT

CGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTT
GTCCTTAGTTACCAGC

ACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAAGTCA

TCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGGTACAGAGG
GTTGCCAAGCCGCGAGG

TGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGA
CTGCGTGAAGTCGGAAT

CGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC
ACACCGCCCGTCACAC

CATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTT
ACCACGGTGTGATTCAT

GACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGNGGCTGGATCA
CCTCCTTA

IP 2.4

TAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCA
AGTCGAGCGGATGAAGG

GAGCTTGCTCCCTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGC
CTGGTAGTGGGGGACAA

CGTCTCGAAAGGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGA
CCTTCGGGCCTTGCGCT

ATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAG
GCGACGATCCGTAAGT

GTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGG

AATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAA
GGTCTTCGGATTGTAAA

GCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGCTAATTAATACTTCGCTGTTTTGACGTT
ACCGACAGAATAAGCA

CCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTA

AAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGAATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCT
GGGAAGTGCATCCAAAA

CTGGCAAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATAGGAA

GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGGCTCATACTGACACTGAGGTGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAA

CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTG
GAAGCCTTGAGCTTTTA

GTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT
AAAAGTCAAATGAATTG

ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAGGCCTT

GACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGAC
AGGTGCTGCATGGCTGT

CGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTT
GTCCTTAGTTACCAGC

ACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAAGTCA

TCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGGTACAGAGG
GTTGCCAAGCCGCGAGG

TGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGA
CTGCGTGAAGTCGGAAT

CGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC
ACACCGCCCGTCACAC

CATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTT
ACCACGGTGTGATTCAT

GACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGNGGCTGGATCA
CCTCCTTA

IP 2.19.2

TAGAGTTTGTATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCA
AGTCGAGCGGATGAAGG

GAGCTTGCTCCCTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGC
CTGGTAGTGGGGGACAA

CGTCTCGAAAGGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGA
CCTTCGGGCCTTGCGCT

ATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAG
GCGACGATCCGTAAGT

GTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGG

AATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAA
GGTCTTCGGATTGTAAA

GCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGCTAATTAATACTTCGCTGTTTTGACGTT
ACCGACAGAATAAGCA

CCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTA

AAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGAATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCT
GGGAAGTGCATCCAAAA

CTGGCAAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATAGGAA

GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGGCTCATACTGACACTGAGGTGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAA

CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTG
GAAGCCTTGAGCTTTTA

GTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT
AAAAGTCAAATGAATTG

ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAGGCCTT

GACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGAC
AGGTGCTGCATGGCTGT

CGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTT
GTCCTTAGTTACCAGC

ACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAAGTCA

TCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGG
GTTGCCAAGCCGCGAGG

TGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGA
CTGCGTGAAGTCGGAAT

CGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC
ACACCGCCCGTCACAC

CATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTT
ACCACGGTGTGATTCAT

GACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGNGGCTGGATCA
CCTCCTTA

IP 2.3.2

TAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCA
AGTCGAGCGGATGAAGG

GAGCTTGCTCCCTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGC
CTGGTAGTGGGGGACAA

CGTCTCGAAAGGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGA
CCTTCGGGCCTTGCGCT

ATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAG
GCGACGATCCGTAAGT

GTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGG

AATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAA
GGTCTTCGGATTGTAAA

GCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGCTAATTAATACTTCGCTGTTTTGACGTT
ACCGACAGAATAAGCA

CCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTA

AAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGAATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCT
GGGAAGTGCATCCAAAA

CTGGCAAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATAGGAA

GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGGCTCATACTGACACTGAGGTGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAA

CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTG
GAAGCCTTGAGCTTTTA

GTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT
AAAAGTCAAATGAATTG

ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA
GAACCTTACCAGGCCTT

GACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGAC
AGGTGCTGCATGGCTGT

CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTT
GTCCTTAGTTACCAGC

ACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAAGTCA

TCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAGAGG
GTTGCCAAGCCGCGAGG

TGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGA
CTGCGTGAAGTCGGAAT

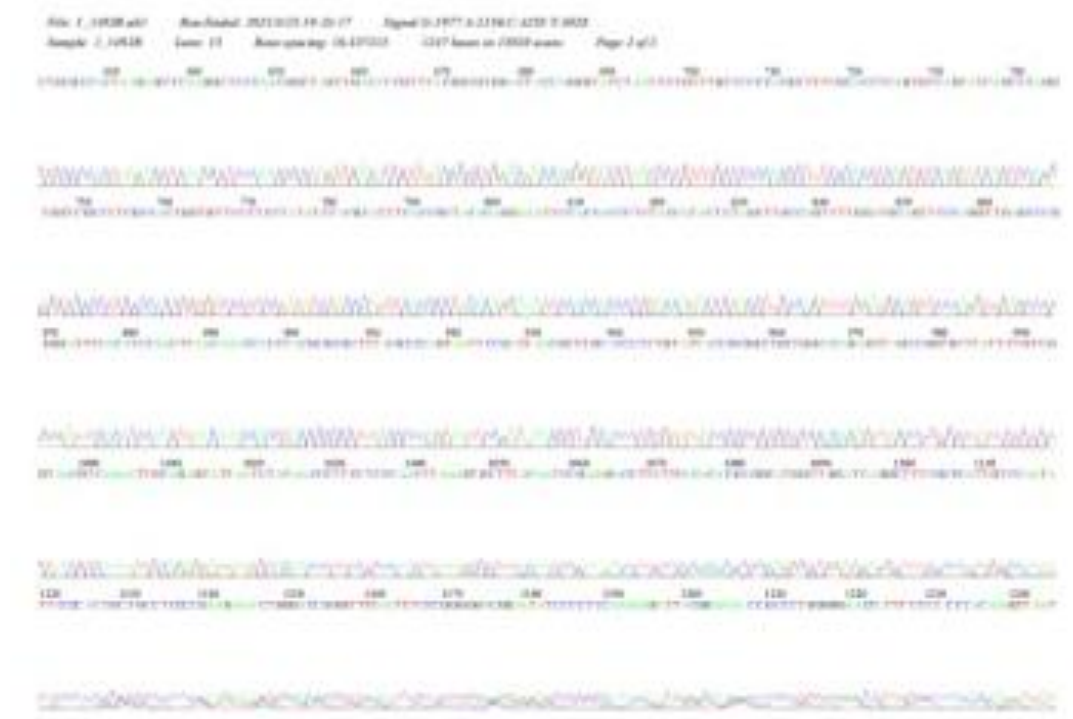
CGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC
ACACCGCCCGTCACAC

CATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTT
ACCACGGTGTGATTCAT

GACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGNGGCTGGATCA
CCTCCTTA

ANEXO 2 Electroferograma

IP 1.4



IP 3.5



IP 3.15



IP 2.14.2



IP 2.4



ANEXOS REQUERIDOS

Anexo 1. Autorización de realización de la investigación en la entidad de Salud u otra institución (Anexo 3.1)

Anexo 2 . Autorización para subir al repositorio digital (Anexo A)

Anexo 3. Documento Antiplagio. (Otorgado por secretaria)

ANEXOS REQUERIDOS



Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Jaqueline Gabriela Landi Landi portadora de la cédula de ciudadanía N° **0106415391**. Declaro ser el autor de la obra: **“Diversidad de bacterias heterótrofas que participan en procesos de biodeterioro del Complejo Arqueológico Ingapirca”**, 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, **04 de julio de 2022**

Jaqueline Gabriela Landi Landi

C.I. 0106415391

Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Yo, **Marco Vinicio Tapia Sotamba** portador de la cédula de ciudadanía N° **010606799-4**. Declaro ser el autor de la obra: **“Diversidad de bacterias heterótrofas que participan en procesos de biodeterioro del Complejo Arqueológico Ingapirca”**, 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, **04 de julio del 2022**



Marco Vinicio Tapia Sotamba

C.I. **01010101010**