

**DIAGNÓSTICO DE BIODETERIORO DE LA COLECCIÓN DE ANATOMÍA
DE LA UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA Y EVALUACIÓN DE UN
MÉTODO PARA SU CONTROL.**



LINA PAOLA ROJAS HERNÁNDEZ

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito parcial para optar por el título de
MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.
MAYO DE 2019**

**DIAGNÓSTICO DE BIODETERIORO DE LA COLECCIÓN DE ANATOMÍA
DE LA UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA Y EVALUACIÓN DE UN
MÉTODO PARA SU CONTROL.**

LINA PAOLA ROJAS HERNANDEZ

María Camila Patiño Ramírez

Directora

María Ximena Rodríguez Bocanegra

Codirectora

Luz Stella Villalba Corredor

Jurado

Concepción Judith Puerta Bula, Ph.D.

Decana

Facultad de Ciencias

Marcela Franco Correa, Ph.D.

Directora

Carrera de Microbiología Industrial

NOTA DE ADVERTENCIA

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1996

RESUMEN

El Museo de Anatomía ubicado en la Facultad de Medicina de la Universidad Militar Nueva Granada cuenta con ejemplares anatómicos como extremidades superiores, inferiores y rostros conservados por la técnica de disección que, por las condiciones de humedad y sistemas de ventilación en mal funcionamiento, generan un ambiente propicio para el proceso de colonización y biodeterioro de las piezas. La presencia de indicadores de crecimiento de microorganismos en los ejemplares alerta y motiva la realización del presente trabajo que buscó contribuir a controlar esta situación mediante la realización de un diagnóstico desde el punto de vista microbiológico para poder establecer el estado y nivel de biodeterioro de las piezas disecadas, la identificación de los agentes causantes del biodeterioro y un posible tratamiento de control. Se busca que los resultados del estudio aporten a la recuperación de las piezas afectadas.

Se realizaron inspecciones visuales y un reconocimiento de la colección, una descripción de los indicadores de biodeterioro en cada pieza para posteriormente clasificarlas según el nivel de biodeterioro en: incipiente, bajo, medio y avanzado. La mayoría de las piezas diagnosticadas se encuentran en nivel incipiente y bajo. Para la identificación de los agentes causales de biodeterioro, se tomaron muestras de los indicadores, que mediante seguimiento de claves taxonómicas se llegaron a identificar los géneros *Penicillium*, *Cladosporium*, y micelio estéril. Finalmente, para el tratamiento y control del biodeterioro se seleccionó la evaluación del etanol por su rápida evaporación, economía y fácil acceso para los encargados del mantenimiento del museo. Para evaluar el efecto del etanol a concentraciones del 90%, 85% y 80% frente a *Penicillium* sp., se siguieron dos metodologías: peso seco y recuentos por tiempo de contacto. Los resultados del estudio mostraron que la concentración de etanol con mayor efecto biocida es del 80%. Se recomienda su uso para las labores de tratamiento y recuperación de las piezas de la colección.

1. INTRODUCCION

El Museo de Anatomía ubicado en la Facultad de Medicina de la Universidad Militar Nueva Granada cuenta con ejemplares anatómicos como extremidades superiores, inferiores y rostros. Estas piezas pueden ser de origen sintético, elaboradas a partir de materiales como plásticos y yesos, o de origen natural como las piezas biológicas conservadas en diferentes soluciones como formol o aquellas conservadas por la técnica de disección. Estas últimas, almacenadas sin ninguna protección o urna, se encuentran expuestas al ambiente y a los agentes causantes de biodeterioro, por lo que fueron las piezas seleccionadas para el presente estudio.

El biodeterioro de estas piezas puede conllevar a su destrucción y pérdida, lo que afectaría la formación académica de los estudiantes de medicina de la Universidad Militar Nueva Granada, ya que este espacio es usado con fines de docencia. Si el deterioro causa la pérdida de alguna de las piezas, no es posible llevar a cabo el reemplazo de las piezas de origen humano, ya que son consideradas patrimonio científico de la institución. Este tipo de cortes que consisten en partes del cuerpo humano conservados por la técnica de disección ya no está permitido realizarlos por cuestiones legales que intervienen con los derechos humanos (1), por lo que conllevaría a la pérdida de la memoria del museo que se ha construido con trabajos académicos de los alumnos de medicina de años anteriores.

Recientemente se ha determinado que las piezas del museo que están conservadas por la técnica de disección se encuentran en una situación de emergencia por las condiciones locativas actuales, como la presencia de filtraciones de humedad en los muros, la falla en el sistema de ventilación y filtración de aire y la entrada de material particulado producto de obras y construcciones que se llevan a cabo en la Facultad. Estas condiciones generan un ambiente propicio para el proceso de colonización y biodeterioro de las piezas.

Una inspección visual por parte de los funcionarios del museo reveló la presencia de indicadores de crecimiento de microorganismos, siendo esta la señal de alarma y motivo de la realización del presente trabajo que buscó contribuir al control de la situación mediante la realización de un diagnóstico desde el punto de vista microbiológico para poder establecer el estado de las piezas disecadas, la identificación de los agentes causantes del biodeterioro y

un posible tratamiento de control. Se busca que los resultados del estudio aporten a la recuperación de las piezas afectadas.

A partir de este problema de estudio se plantearon las siguientes preguntas de investigación: ¿Cuál es el nivel de biodeterioro de la colección del Museo de Anatomía de la Universidad Militar Nueva Granada cuyas piezas fueron conservadas por la técnica de disección? ¿Cuáles son los microorganismos causantes del biodeterioro de la colección del Museo de Anatomía de la Universidad Militar Nueva Granada? ¿Cuál es el efecto del etanol sobre los microorganismos causantes del biodeterioro en la colección del Museo de Anatomía de la Universidad Militar Nueva Granada?

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Marco conceptual

El Museo de Anatomía de la Universidad Militar Nueva Granada surgió gracias a la idea del Doctor Fabricio Guillen y otros doctores que en colaboración con los estudiantes de la Facultad de Medicina de la Universidad y con trabajos académicos de conservación de piezas biológicas humanas realizados por los estudiantes, adaptaron una habitación del edificio de la Facultad de Medicina, ubicado en la Tv 3 # 49 02 (Bogotá D.C.), con el fin de tener un espacio exclusivamente de docencia dedicado al aprendizaje de la anatomía del cuerpo humano (2).

En la actualidad, el museo cuenta con una diversidad de piezas de colección entre las que se destacan las de origen sintético, otras de origen biológico conservadas en diferentes soluciones y otras de origen biológico disecadas expuestas al ambiente. Sin embargo, las condiciones ambientales del museo no son apropiadas para garantizar la preservación de la colección pues este presenta una elevada humedad y no cuenta con un sistema de aire acondicionado que permita mantener la temperatura estable, lo cual puede conducir al deterioro de las piezas del museo (2,3).

La técnica de disección utilizada para la conservación de las piezas de interés del museo es un método de conservación en la que se combinan las técnicas naturales y artificiales para la preservación del cuerpo humano. La parte de conservación natural consiste en la

deseccación de la pieza por medio de calor o frío seco para posteriormente por una técnica artificial, aplicarle a la pieza una solución fijadora a base de resina y alcohol para generar una capa protectora sobre el ejemplar (4).

El deterioro hace referencia a la aparición progresiva de daños sobre un objeto conllevando a la alteración de sus propiedades físicas y químicas, y es causado por la acción de contaminantes, luz, plagas, alta humedad y temperaturas no adecuadas (3,5). En el caso de la humedad y la temperatura, estas pueden inducir tres tipos de deterioro sobre la colección como lo son 1) cambios dimensionales como deformación, rotura de las fibras, delaminación, pérdida de material de superficie y agrietamiento, 2) reacciones químicas como corrosión, cristalización y desintegración, y 3) biodeterioro relacionado con el crecimiento y actividad biológica de organismos sobre la superficie de la pieza (3).

El biodeterioro se entiende como los cambios indeseables en las propiedades de un material causados por la actividad vital de algunos organismos (6). Existen diferentes organismos a los que se les puede atribuir el deterioro, como hongos, bacterias e insectos (7). La importancia de los hongos como agentes causantes del biodeterioro radica en que presentan resistencia a condiciones adversas, así como a bajos a_w , además de una gran diversidad enzimática que les proporciona las herramientas y condiciones para colonizar el material al que estén adheridos (8).

Existen diferentes estrategias de control de biodeterioro, como el uso de métodos químicos (biocidas), físicos (atmosferas anóxicas) y biológicos (feromonas); los biocidas de síntesis química usados con mayor frecuencia en trabajos publicados sobre biodeterioro son el formaldehído, los compuestos de amonio cuaternario, la isotiazolinona y el etanol (9). Para la elección del biocida a utilizar se debe tener en cuenta la tolerancia del soporte a ser tratado. En el caso del etanol, se ha comprobado que es uno de los tratamientos más efectivos y moderadamente tóxicos entre los diferentes biocidas ya mencionados. La efectividad del etanol como tratamiento para control del biodeterioro depende del soporte en el que se hará su uso, además del microorganismo a tratar. Para esta investigación se eligió el etanol como la sustancia para controlar el deterioro por las razones ya mencionadas, así como por su rápida evaporación, economía y fácil acceso para los encargados del mantenimiento del museo (10,11).

Como ya se mencionó, la efectividad del tratamiento de biodeterioro usando etanol depende del agente causal del problema, pues diferentes especies fúngicas presentan diferentes susceptibilidades frente a este compuesto. Según el grado de inhibición del microorganismo causado por el etanol se pueden distinguir tres efectos posibles: 1) que la inhibición sea nula o menor al 20%, por lo cual el etanol no ejerce ningún efecto sobre el hongo, 2) que la inhibición sea moderada, entre el 20 y 95%, por lo cual se ejerce un efecto fungistático, y 3) que la inhibición sea mayor al 95%, ejerciéndose un efecto fungicida (12,13).

2.2 Antecedentes

En el Museo de Anatomía de la Universidad Militar Nueva Granada se observó la aparición de estructuras presuntivas compatibles con micelio fúngico sobre las piezas de la colección de origen biológico disecadas y almacenadas al aire libre (2). Estas estructuras resultaron ser similares a las reportadas en diferentes casos de biodeterioro fúngico como en el caso del Archivo Histórico del Museo de La Plata, Argentina, donde diversos libros se vieron afectados por el crecimiento de hongos como *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. (14), o como en el Museo Zoológico de la Universidad de Punjab, India y el Museo ShenZhen, China, donde fósiles y especímenes animales presentaron biodeterioro causado por hongos de los géneros *Aspergillus*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Penicillium* y *Neurospora* (15-16). En todos estos casos mencionados, se utilizaron tanto técnicas moleculares como descripciones morfológicas y uso de claves taxonómicas, como la de Barnett y Hunter (17), para determinar la identidad de los hongos cuyo crecimiento se observaba sobre las piezas de los museos.

Con relación al etanol como agente biocida en el control del biodeterioro, su efecto varía según la especie del hongo a controlar, pues si bien Rogawansamy *et al.* (18) demostraron que este alcohol en una concentración del 70% no tiene ningún efecto sobre el crecimiento de *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus fumigatus*, Bundgaard *et al.* (13) demostraron que el etanol a esta misma concentración si puede ejercer una actividad fungicida sobre *Penicillium discolor*, *Penicillium nalgiovense*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*, entre otros.

No se han encontrado reportes con estudios sobre biodeterioro de colecciones con partes de cuerpo humano, por lo que el enfoque que se le ha dado a este estudio ha tomado muchos elementos de los tratamientos aplicados a colecciones de historia natural por las similitudes en los materiales.

2.3.OBJETIVOS

- Determinar el nivel de biodeterioro de las piezas conservadas por la técnica de disección de la colección del Museo de Anatomía de la Universidad Militar Nueva Granada
- Identificar los microorganismos causantes del biodeterioro de las piezas conservadas por la técnica de disección de la colección del Museo de Anatomía de la Universidad Militar Nueva Granada
- Evaluar el efecto del etanol a diferentes concentraciones sobre los microorganismos causantes del biodeterioro en las piezas conservadas por la técnica de disección de la colección del Museo de Anatomía de la Universidad Militar Nueva Granada.

3.4.METODOLOGÍA

La observación de indicadores de deterioro y toma de muestras se realizó en el Museo de Anatomía de la Universidad Militar Nueva Granada, ubicado en la Tv 3 # 49 02 (Bogotá D.C.). La manipulación de muestras, siembras, purificación y caracterización de los hongos, junto con la evaluación del efecto del etanol, se realizó en el laboratorio del grupo de investigación Unidad de Investigaciones Agropecuarias (UNIDIA) de la Pontificia Universidad Javeriana.

- a. **Determinación del nivel de biodeterioro de las piezas conservadas por la técnica de disección de la colección del museo de anatomía de la Universidad Militar Nueva Granada**

Inspección visual y reconocimiento de la situación actual de la colección

Se realizaron visitas al museo con el fin de realizar inspecciones visuales y un reconocimiento de la situación actual del museo y de las piezas. Se realizaron registros fotográficos y asignación de numeración a cada pieza para facilitar su control.

Identificación y descripción de los indicadores de biodeterioro en las piezas

Se realizó una inspección visual pieza por pieza para diferenciar lo que corresponde a material particulado, otras sustancias adheridas a la pieza como restos de resina y lo que corresponde a crecimiento típico de hongos filamentosos. A los indicadores de crecimiento microbiano encontrados en las piezas se les realizó una descripción según su ubicación en la pieza (el tejido de origen), el color, forma y textura.

Clasificación de las piezas según su nivel de biodeterioro

La clasificación se realizó de acuerdo con los criterios establecidos en la Tabla 1 según el cubrimiento e intensidad de los indicadores de crecimiento de los hongos filamentosos sobre la pieza.

La metodología se adaptó de lo reportado por Manrique Hernández, A., Patiño Ramírez, M., & Gutiérrez Chaves, A. para el estudio del biodeterioro en material bibliográfico en el 2012 (19).

Tabla 1. Criterios de clasificación por niveles de afectación biológica en las piezas.

Nivel de biodeterioro	Porcentaje de la pieza afectada
Incipiente (I)	Indicadores de poca cobertura, situados aleatoriamente en la pieza
Bajo (B)	El 25% de la pieza con presencia de indicadores
Medio (M)	El 50% de la pieza cubierta con indicadores
Avanzado (A)	Más del 50% de la pieza con afectación

La información obtenida se registró en un archivo Excel para ser entregado a los encargados del museo como insumo para su inventario y control.

b. Identificación de los microorganismos causantes del biodeterioro de las piezas conservadas por la técnica de disección de la colección del Museo de Anatomía de la Universidad Militar Nueva Granada

A partir de la clasificación por niveles de biodeterioro y basados en la diversidad de indicadores, se seleccionaron cuatro muestras de nivel incipiente, cuatro de nivel bajo, cuatro de nivel medio y cuatro de nivel avanzado, con el objetivo de tener representatividad de los microorganismos involucrados en cada nivel de afectación.

La toma de muestras se realizó mediante un raspado aséptico a partir de los indicadores de crecimiento en diferentes puntos de la pieza y se sembraron en agar Sabouraud teniendo en cuenta el nivel de biodeterioro, número de la pieza seleccionada y ubicación en la caja de Petri (Fig. 1). Posteriormente, se realizaron pases en PDA para purificar los aislamientos de los hongos, a estos aislamientos se le realizaron microcultivos para lograr la identificación hasta género mediante tinción con azul de lactofenol y seguimiento de la clave taxonómica de Samson *et al.*, 2004 (20). Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente simulando las condiciones reales en el museo.

La codificación dada a los aislamientos fue la siguiente: Nivel-Número de pieza-Ubicación caja Petri. Ejemplo: A4-A (nivel avanzado-Pieza 4-Punto A en la caja de Petri).

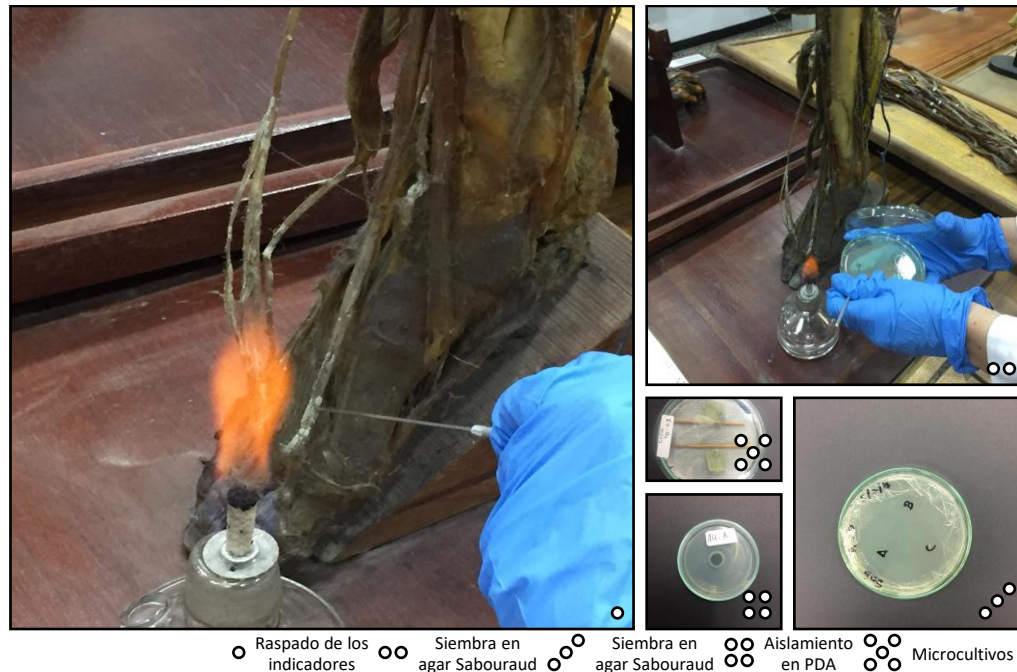


Figura 1. Procedimiento de toma de muestras, aislamiento e identificación de microorganismos.

c. Evaluación del efecto del etanol a diferentes concentraciones sobre los microorganismos causantes del biodeterioro

Para evaluar el efecto del etanol se seleccionó el hongo filamentoso con mayor frecuencia encontrado en las piezas, este correspondió al género *Penicillium*, aislamiento codificado como M3-C.

Basado en reportes de colecciones de historia natural y expertos en el tema que sugieren tratamientos con concentraciones de etanol mayores al 70% (21), se eligieron concentraciones de etanol del 80, 85 y 90% para evaluar el efecto del etanol frente al hongo filamentoso en el laboratorio. Se siguieron dos metodologías diferentes para hacer la evaluación: una mediante evaluación de peso seco, en la cual no se obtuvieron los resultados esperados y otra metodología por contacto directo del inóculo con diferentes concentraciones de etanol en diferentes tiempos de exposición.

i. Metodología 1: Evaluación por peso seco

Elección del medio de cultivo

Se eligieron para el tratamiento los medios de cultivo: caldo Czapek (Sacarosa 30 g/L, NaNO_3 3 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, KCl 5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/L) y caldo Extracto de Malta (Extracto de malta 10 g/L, extracto de levadura 4 g/L, glucosa 4 g/L) (22). Se prepararon 50 ml de cada medio diez veces concentrado (10x) para que al diluirlos con el etanol quedaran a su concentración normal (1x).

Preparación del inóculo

A partir del aislamiento purificado se hizo una siembra en PDA 6 días antes del tratamiento incubando a temperatura ambiente, a partir de esta colonia se realizó una suspensión de conidios en solución salina 0,85% p/v con una concentración de $1,2 \times 10^6$ conidios/ml.

Tratamiento con etanol al 80%

Para cada medio se trabajó un volumen efectivo de trabajo de 30ml, por lo tanto, se prepararon erlenmeyers con 25,3 ml de etanol al 99,9% (para que al diluirlo quedara al 80%), 3 ml de medio (para que diluido quedara a concentración normal), 0,3 ml del inóculo que diluido en este volumen inicia con una concentración de 1×10^4 UFC/ml y se completó el volumen con 1,4 ml de H_2O . Se manejaron controles de la prueba sin etanol y con y sin inóculo. La prueba se realizó con los dos medios de cultivo y se probó solo esta concentración de etanol como ensayo preliminar. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Los erlenmeyers se incubaron en agitación a 120 rpm a temperatura ambiente por 6 días.

Determinación de peso seco

Con el objetivo de determinar la biomasa producida por el crecimiento en los medios líquidos diluidos con etanol, después de la incubación se filtró el contenido de los erlenmeyers, con papel filtro previamente secados a 70°C y pesados. Posteriormente se secó en horno el filtrado a 70°C por 24 horas y por último se pesaron de nuevo los papeles filtro después del secado. Finalmente se calculó la diferencia del papel filtro antes

y después de la filtración para obtener el peso seco de la biomasa producida por el hongo filamentoso evaluado o de rastros de medio de cultivo sin diluir.

ii. Metodología 2: Evaluación por tiempos de contacto

Preparación del inóculo

A partir del aislamiento purificado se hizo una siembra en PDA 6 días antes del tratamiento incubando a temperatura ambiente, a partir de este cultivo se realizó una suspensión de conidios en solución salina 0,85% p/v con una concentración de $7,8 \times 10^6$ conidios/ml.

Tratamiento por tiempos de contacto

Para cada concentración de etanol se trabajó un volumen efectivo de trabajo de 1 ml, de los cuales 0,01 ml eran del inóculo para que iniciara con una concentración de 10^4 UFC/ml, se agregó en cada tubo eppendorff 0,95 ml, 0,89 ml y 0,84 ml etanol al 95% para obtener las concentraciones a probar 90%, 85% y 80% de etanol respectivamente. Los volúmenes se completaron con agua destilada estéril. En cada tratamiento se dejó el inóculo por 5, 10 y 15 minutos de contacto, al final de cada tiempo, se tomaron 0,1 ml y se realizaron 3 diluciones seriadas 1/10 a partir de las cuales se realizó una siembra por superficie en agar Rosa Bengala para realizar un recuento en placa. Las placas se incubaron a temperatura ambiente por 6 días. Se tomó como control negativo las mismas condiciones de prueba sin etanol. La metodología se adaptó de Cadnum, J. L *et al.* (23).

Interpretación de resultados

Con los recuentos en placa del control y de los tiempos de contacto se determinó el porcentaje de reducción mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Reducción} = 100\% - \frac{(\text{Recuento tiempo de contacto} \times 100)}{\text{Recuento control negativo}}$$

Se considera que el etanol tiene un efecto fungicida cuando el porcentaje de reducción es igual a 100 y fungistático cuando el porcentaje de reducción en los tiempos de contacto es menor (23).

4.5. RESULTADOS Y DISCUSION

a. Diagnóstico de la situación de la colección

La inspección de condiciones en el espacio del museo dejó en evidencia la presencia de humedad en las paredes, un sistema de ventilación en malas condiciones, condiciones de limpieza deficientes, ya que se encontró material particulado y presencia de insectos muertos en las bases y algunas de las piezas.

El museo cuenta con una colección de 26 piezas conservadas por disección, de las cuales 10 son cortes óseos de miembros superiores, 5 cortes óseos de miembros inferiores, 4 cortes óseos con músculos de expresión facial, 1 feto humano, 1 Platyrrino (simio) y 1 corte óseo de pelvis. Todas estas piezas están conservadas por la técnica de disección sin la presencia de urnas de protección. Se presenta deterioro en las bases de todas las piezas ya que están elaboradas en madera. Las figuras 2 y 3 presentan el registro fotográfico realizado en el museo.



Figura 2. Fotografías del Museo de Anatomía de la Universidad Militar Nueva Granada y piezas conservadas en las diferentes técnicas.




Figura 3. Humedad y condición de la ventilación en el Museo de Anatomía de la Universidad Militar Nueva Granada.

Identificación y descripción de los indicadores de biodeterioro en las piezas

Tras realizar la inspección visual de cada una de las piezas y el reconocimiento de los indicadores de crecimiento de microorganismos, la tabla 2 presenta a continuación los indicadores fúngicos comúnmente encontrados.

Tabla 2. Indicadores de crecimiento fúngico en las piezas del Museo de Anatomía de la Universidad Militar Nueva Granada.

Descripción del indicador	Ejemplo del indicador en las piezas
Manchas irregulares algodonosas blanco-grisáceas.	

Descripción del indicador	Ejemplo del indicador en las piezas
Colonias irregulares pulverulentas verdes.	
Manchas blancas con aspecto algodonoso en tejido.	
Crecimiento con textura algodonosa de color verde en todo el tejido, cartílago y uñas.	

Clasificación de las piezas según su nivel de biodeterioro

A continuación, se muestran los resultados de la clasificación de las 26 piezas diagnosticadas según el nivel de afectación (Fig. 4).

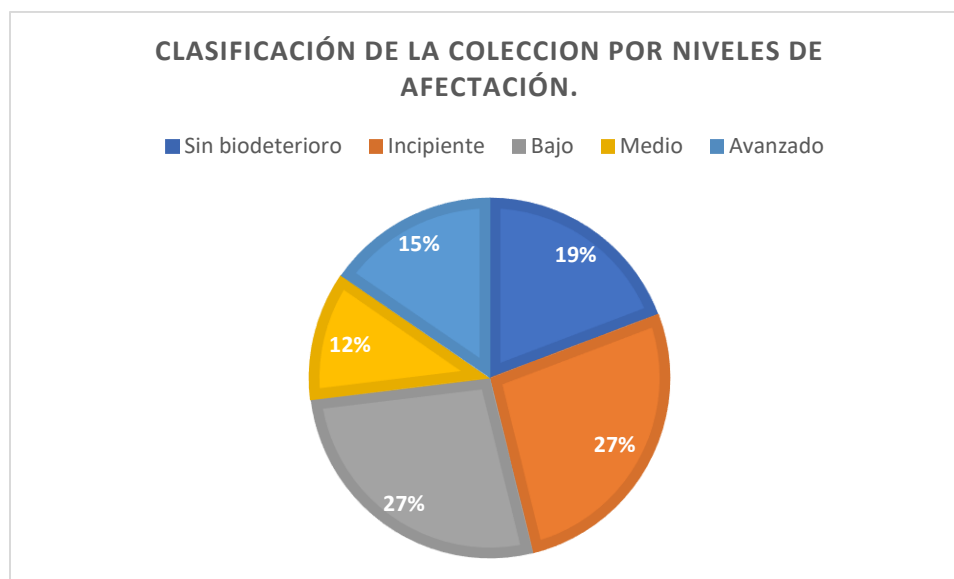


Figura 4. Clasificación de las piezas de la colección por niveles de biodeterioro.

La mayoría de las piezas de la colección se encuentra entre los niveles incipiente y bajo, las pocas piezas que se vieron con la mayor afectación son las que se encontraban cerca del muro con humedad y las piezas más cercanas a la puerta de entrada que recibieron una gran cantidad de material particulado proveniente de la obra civil que se realizó en la Facultad, sin que se manejara algún tipo de cuidado o protección de las piezas en el museo (Fig. 5).

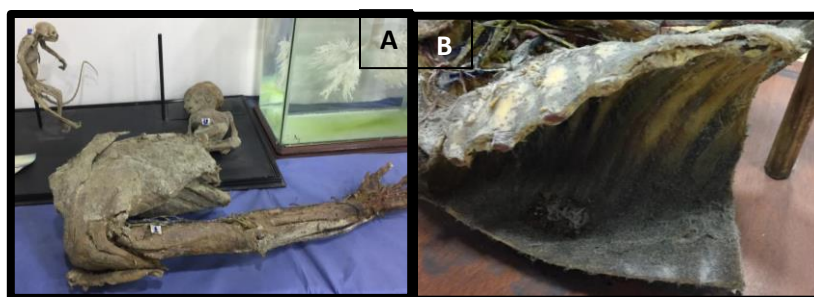


Figura 5. A: Piezas con nivel de afectación avanzado en el muro con humedad. B: Caja torácica de miembro superior con gran cantidad de material particulado.

Vale la pena destacar que se instalaron deshumidificadores permanentes en el museo como respuesta a la situación de emergencia, controlando así la humedad relativa del lugar, esto contribuyó a detener el crecimiento de los microorganismos sobre las piezas limitando las condiciones óptimas de crecimiento, por lo tanto, la afectación de las piezas

no siguió aumentando a niveles de biodeterioro superiores. Esto concuerda con estudios realizados en Noruega para la conservación preventiva de objetos de material orgánico en museos donde remarcan la importancia de mantener un ambiente con la humedad relativa y temperatura controlados para evitar daño en las piezas (24). Ejemplos de la importancia de esto se ven en el Museo Británico, donde usaron deshumidificadores para el mantenimiento en buen estado de la momia llamada “Lindow Man” con alto valor histórico (25). Otro ejemplo fue el caso de un pedazo de la pintura en el techo de la catedral de Valencia en España que se vio deteriorado por el cambio de humedad y temperatura durante el tiempo que no fueron monitoreados (25)(26).

A pesar de que el control de humedad relativa del ambiente pudo actuar como una medida favorable para detener la colonización de los agentes biológicos, se ha considerado que se requiere un tratamiento en las piezas afectadas para prevenir que se sigan deteriorando o que este deterioro se active y pueda contaminar al resto de piezas en el museo.

Toda la información recopilada durante en el diagnóstico de la colección del museo se encuentra adjunta al documento en el ANEXO 1. Tabla de Excel con el diagnóstico de la colección. Este documento será entregado al personal encargado del Museo de Anatomía de la Universidad Militar Nueva Granada

b. Identificación de los microorganismo causantes del biodeterioro

A partir de las piezas seleccionadas para la toma de muestras se obtuvieron 14 aislamientos de hongos filamentosos sin presencia de crecimiento bacteriano, aspecto que podría estar relacionado con las características de poca disponibilidad de agua en las piezas.

La identificación por clave taxonómica y tinción con azul de lactofenol permitió identificar los géneros *Penicillium* y *Cladosporium* (Fig. 6) y tres aislamientos considerados micelio estéril.

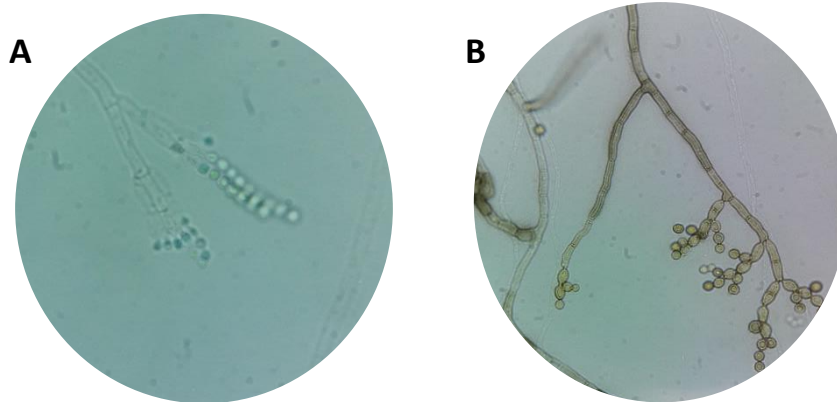


Figura 6. Microcultivos realizados a partir de los aislamientos. A: A6-B *Penicillium* sp., B: A4-A *Cladosporium* sp.

Con respecto al total de aislamientos se determinó la frecuencia en la que se encontraba cada género identificado (Fig 7.).

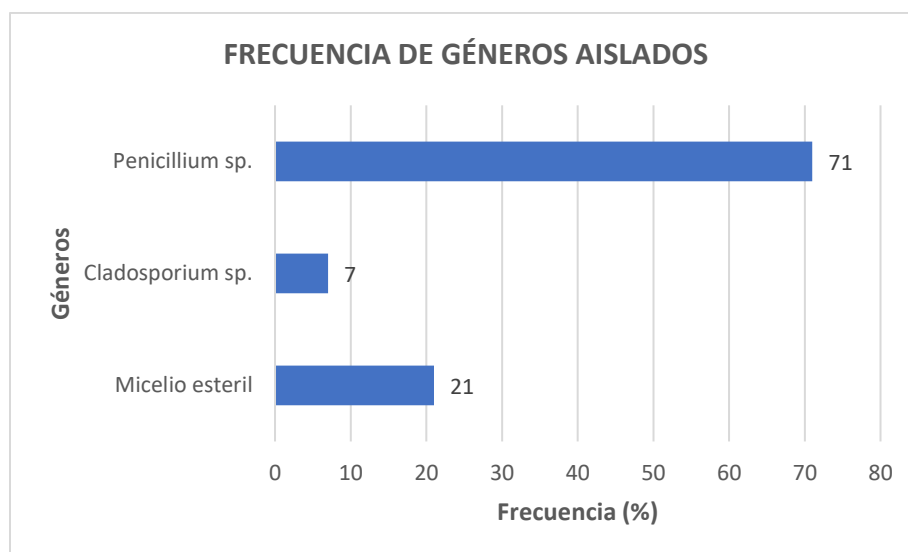


Figura 7. Frecuencia de géneros aislados a partir de las piezas afectadas.

A continuación, se muestra la variedad de géneros que fueron aislados de cada nivel de biodeterioro (Tabla 3).

Tabla 3. Géneros aislados de cada nivel de biodeterioro.

NIVEL	GÉNEROS
I	<i>Penicillium</i> sp., Micelio estéril
B	<i>Penicillium</i> sp.
M	<i>Penicillium</i> sp., Micelio esteril
A	<i>Penicillium</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., Micelio esteril

Se observa la aparición de *Cladosporium* sp. unicamente en el nivel avanzado de biodeterioro y *Penicillium* sp. en todos los niveles, por esta razón es el género seleccionado para la prueba del efecto del etanol, ya que representará cada nivel de biodeterioro. Las características macroscópicas de estos hongos coinciden con los indicadores descritos en las piezas, como en el caso de *Penicillium* que presenta colonias de textura pulverulenta y de color verde similar a lo observado sobre las piezas afectadas.

La caracterización completa de los morfotipos aislados se presenta en el Anexo 2.

La figura 8 muestra la frecuencia de aislamientos a partir de diferentes tipos de tejido. La frecuencia se determinó con respecto al total de aislamientos.

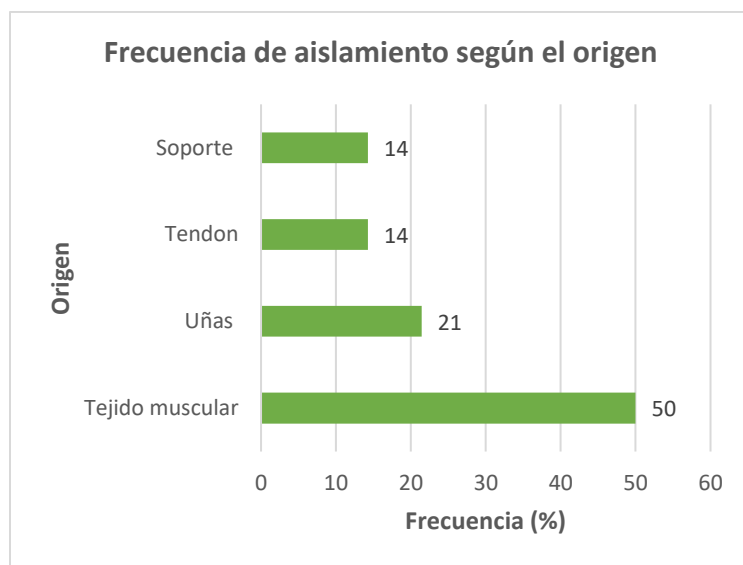


Figura 8. Frecuencia de aislamientos según el origen o lugar de aislamiento.

La mayoría de los aislamientos se obtuvieron a partir de tejidos musculares, lo que representa un sustrato proteico para los microorganismos, mientras que, en el caso de las uñas, el principal sustrato será la queratina. Esto sugiere que los hongos filamentosos que se desarrollaron en estos sustratos podrían tener la capacidad para degradarlos (siendo proteolíticos o queratinolíticos, respectivamente).

Vale la pena hacer énfasis en que no se obtuvieron aislamientos de bacterias ya que como se ha descrito, estos microorganismos necesitan un mayor a_w o disponibilidad de agua para crecer ($>0,90$), mientras que los hongos filamentosos pueden crecer en menores a_w ($>0,80$) (27)(28). Aunque la humedad relativa del ambiente del museo se asumió alta (dato exacto no suministrado por falta de equipos de medición en el museo), el sustrato encontrado en las piezas no aporta agua disponible para la actividad microbiana, ya que como se ha indicado, en la preparación han pasado por un proceso de secado para ser conservadas por el método de disección.

El género *Penicillium* es altamente conocido por ser un hongo filamentosos capaz de crecer en una gran variedad de hábitats, por lo que es considerado un contaminante ambiental, su función principal en la naturaleza es la de descomponer materiales orgánicos y para esto cuenta con una gran variedad de enzimas como proteasas, lacasas y queratinasas (29)(30) que le dan la capacidad de crecer en diferentes sustratos, como lo son los soportes de madera donde se encuentran las piezas en el museo, tendones y tejidos

musculares que se encuentran expuestos en las piezas, así como en las uñas y el pelo que se encontraba en los rostros muestreados. Por otra parte, el género *Cladosporium*, que es considerado saprófito, en el presente estudio fue aislado a partir de uñas coincidiendo con los reportes de su actividad queratinolítica (30) (31). Como perspectiva de investigación surge la posibilidad de evaluar la presencia de microorganismos no cultivables por los métodos descritos en el presente estudio.

c. Evaluación del efecto del etanol como tratamiento de control

Metodología 1: Evaluación por peso seco

La implementación de esta metodología no presentó los resultados esperados, en donde se pudiera evidenciar un efecto inhibitorio por parte del etanol, ya que durante las pruebas para la elección de los medios de cultivo se observó que, al diluir el etanol en el medio, este último se precipitaba. Esto mismo también se observó durante el paso de filtración, donde el caldo Czapek quedaba precipitado en el fondo del erlenmeyer y el precipitado quedaba en el papel filtro, esto representa una interferencia en la lectura de resultados (Tabla 4). También se observó crecimiento del hongo en el erlenmeyer que estaban sin inocular en el caldo Extracto de Malta (Tabla 5). Teniendo en cuenta que los resultados presentaban muchas inconsistencias, se decidió descartar esta forma de evaluación.

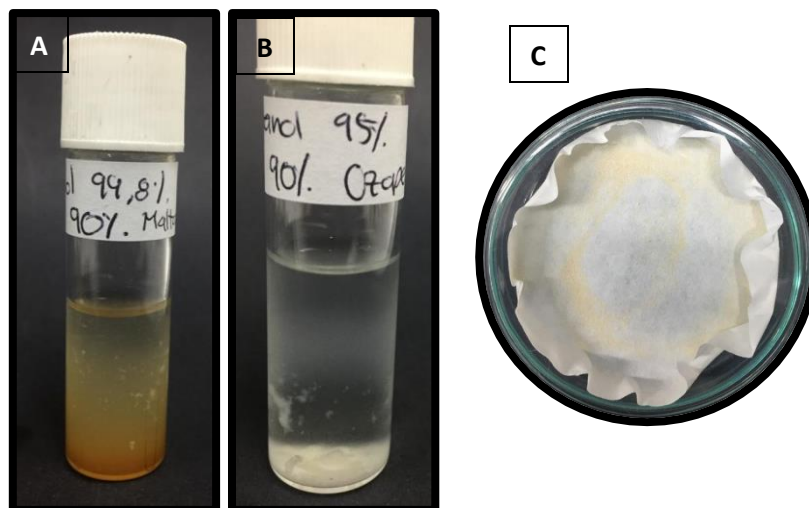


Figura 9. Medios precipitados por el etanol A: medio Extracto de Malta B: medio Czapek. C: Papel filtro con restos de medio Czapek.

Las tablas 4 y 5 presentan los resultados de peso seco obtenidos en esta etapa de evaluación de la metodología.

Tabla 4. Pesos secos tratamiento con etanol al 80% en caldo Czapek

Czapek con inóculo (g)	Czapek sin inóculo (g)	Czapek con inóculo y etanol 80% (g)	Czapek sin inóculo y etanol 80% (g)
0	0	0,03	0,03

Tabla 5. Pesos secos tratamiento con caldo Extracto de Malta (EM)

EM con inóculo (g)	EM sin inóculo (g)	EM con inóculo y etanol 80% (g)	EM sin inóculo y etanol 80% (g)
0,11	0,08	0	0

En el caso del tratamiento con caldo Czapek no se evidenció biomasa en ninguna de las pruebas y lo que se logró filtrar eran restos de medio de cultivo precipitado, esto se pudo presentar por la poca solubilidad de los componentes del medio en el etanol al 80%. Sería recomendable hacer pruebas de crecimiento en el medio antes de la adición de etanol, así como pruebas de solubilidad en etanol a diferentes concentraciones. En el tratamiento con caldo extracto de malta, si se observó biomasa fúngica en el medio sin etanol, y también, se observó inhibición de este crecimiento en etanol al 80%, pero los resultados no son válidos ya que se evidenció la presencia de biomasa en los erlenmeyers sin inocular.

Metodología 2. Evaluación por tiempos de contacto.

Debido a los resultados inesperados con la metodología anterior, se realizó la evaluación por esta metodología. A continuación, en la tabla 6 se muestran los recuentos de los tratamientos después del tiempo de exposición y los recuentos del control negativo. En la tabla 7 se muestra el porcentaje de reducción que presentó cada tratamiento con

respecto al control negativo, calculados a partir de la ecuación presentada en la metodología.

Tabla 6. Recuentos después del tiempo de exposición a las diferentes concentraciones de etanol

Tratamiento	5'	10'	15'
Etanol 90%	$1,0 \times 10^4$ UFC/ml	$1,9 \times 10^4$ UFC/ml	$8,5 \times 10^3$ UFC/ml
Etanol 85%	$2,7 \times 10^3$ UFC/ml	$2,7 \times 10^3$ UFC/ml	$2,5 \times 10^2$ UFC/ml
Etanol 80%	$2,5 \times 10^2$ UFC/ml	$2,5 \times 10^2$ UFC/ml	$< 10^2$ UFC/ml
Control negativo	$4,5 \times 10^5$ UFC/ml	$4,6 \times 10^5$ UFC/ml	$3,7 \times 10^5$ UFC/ml

Tabla 7. Porcentaje de reducción de cada tratamiento respecto al control

% Reducción	5'	10'	15'
Etanol 90%	$97,8\% \pm 1,08$	$95,9\% \pm 1,08$	$97,7\% \pm 1,08$
Etanol 85%	$99,4\% \pm 0,30$	$99,4\% \pm 0,30$	$99,94\% \pm 0,30$
Etanol 80%	$99,94\% \pm 0,03$	$99,94\% \pm 0,03$	$100\% \pm 0,03$

En la figura 10 se presenta el registro fotográfico del crecimiento en placa de *Penicillium* sp. en el tratamiento con etanol al 80% (mayor % de reducción) y su comparación de crecimiento en el control.

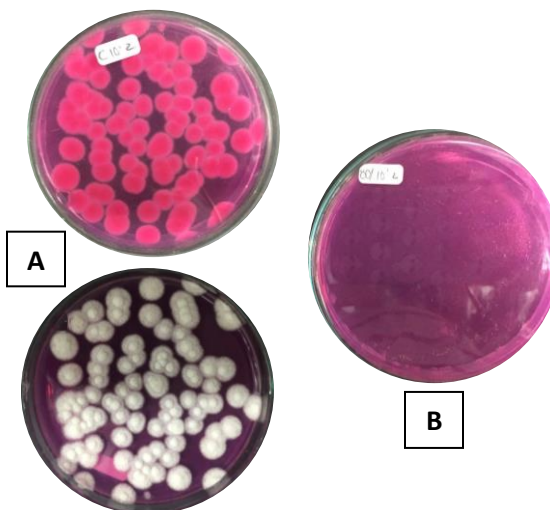


Figura 10. Recuentos de los tratamientos después de los tiempos de contacto **A.** Control negativo 10 min tiempo de contacto. **B.** Tratamiento: 10 min tiempo de contacto con 80% etanol

Con respecto a los resultados presentados en las tablas 6 y 7. Los mayores porcentajes de inhibición respecto al control se presentaron por acción del etanol al 80%, tras 15 minutos de contacto se logra evidenciar una actividad fungicida ya que presenta un porcentaje de inhibición del 100%. Teniendo en cuenta que al hacer tratamiento de control de biodeterioro sobre las piezas, no se realizan procedimientos de enjuague de los biocidas, este tiempo de contacto podría ser incluso superior y se considera un resultado aplicable.

Los resultados obtenidos para las concentraciones de etanol 85 y 90%, podrían indicar que, a mayores concentraciones de etanol, este va perdiendo su efectividad al evaporarse más rápido. Se ha descrito que el mecanismo del etanol como agente biocida consiste en desnaturalizar las proteínas presentes en la pared celular de los hongos, causando así su muerte. Según los resultados obtenidos, la mejor actividad fungicida la tiene el etanol al 80%. Se recomienda hacer pruebas *in situ* a esta concentración de etanol aplicándolo sobre los indicadores presentes en las piezas esperando que se presente la misma actividad biocida observada en el laboratorio.

5.6. CONCLUSIONES

La mayoría de las piezas de la colección del Museo de Anatomía de la Universidad Militar Nueva Granada fueron clasificadas en los niveles incipiente y bajo de biodeterioro, posiblemente gracias a la respuesta de control de humedad relativa en el museo luego de la emergencia. Sin embargo, teniendo en cuenta el riesgo de proliferación y avance del deterioro y la posible contaminación del resto de las piezas del museo es necesario el tratamiento de todas las piezas afectadas. Se reporta *Penicillium* sp. como el género con mayor frecuencia de aislamiento a partir de las piezas de la colección, cuyas características macroscópicas coinciden con la morfología de los indicadores observados en las piezas. Los resultados de la evaluación de un producto para el control del biodeterioro

mostraron que el etanol al 80% presentó la mejor actividad fungicida frente a *Penicillium* sp. por lo que se recomienda hacer pruebas *in situ* con esta concentración y proceder al tratamiento de las piezas, así como la implementación de acciones de conservación preventiva en el museo para evitar que reaparezca deterioro, especialmente control de humedad relativa, temperatura, filtración del aire y uso de urnas para las piezas. Se recomienda también realizar evaluaciones de microorganismos no cultivables, así como la evaluación de hongos filamentosos dematiáceos como *Cladosporium*.

6.7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Asamblea General de las Naciones Unidas. "Declaración Universal de los Derechos Humanos." 1948; 217 (III) A. Paris.
- (2) Patiño MC. Biodeterioro del museo de anatomía de la Universidad Militar Nueva Granada. Coordinadora de Conservación y Documentación. Sección de Arte y Cultura de la Universidad Militar. Bogotá D.C. 2018.
- (3) Philadelphia: Philamuseum. *Philadelphia Museum of Art*; 2018
- (4) Brenner E. La preservación del cuerpo humano: técnicas antiguas y nuevas. *Journal of Anatomy*. 2014; 224 (3): 316-44.
- (5) Longman. Longman dictionary of contemporary English. 4th ed. Harlow, England: Pearson/Longman. 2009.
- (6) Hueck HJ. The biodeterioration of materials—an appraisal. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2011;48(1-4):5-11.
- (7) Sterflinger K, Piñar G. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art—tilting at windmills?. *Applied microbiology and biotechnology*. 2013 1;97(22):9637-6.
- (8) Sterflinger K. Fungi: their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal biology reviews*. 2010 1;24(1-2):47-55.
- (9) Valentin N. Biodeterioro de los materiales de archivo y museos. Conservación y prevención. Instituto cultura. España.
- (10) Sterflinger K, Pinzari F. The revenge of time: fungal deterioration of cultural heritage with particular reference to books, paper and parchment. *Environmental Microbiology*. 2012;14(3):559-66.

- (11) Sterflinger, K., & Pinzari, F. The revenge of time: fungal deterioration of cultural heritage with particular reference to books, paper and parchment. *Environmental Microbiology*, 2012; 14(3), 559-566
- (12) Berni E, Scaramuzza N. Effect of ethanol on growth of *C hrysonilia sitophila* ('the red bread mould') and *H yphopichia burtonii* ('the chalky mould') in sliced bread. *Letters in applied microbiology*. 2013;57(4):344-9.
- (13) Bundgaard-Nielsen K, Nielsen PV. Fungicidal effect of 15 disinfectants against 25 fungal contaminants commonly found in bread and cheese manufacturing. *Journal of food protection*. 1996;59(3):268-75.
- (14) Guiamet P, Borrego S, Lavin P, Perdomo I, de Saravia SG. Biofouling and biodeterioration in materials stored at the Historical Archive of the Museum of La Plata, Argentine and at the National Archive of the Republic of Cuba. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011 1;85(2):229-34.
- (15) Shabbir A, Khan MA, Khan AM, Iqbal M, Ahmad F. FUNGAL Biodeterioration: a case study in the Zoological Museum of the Punjab University. *J Anim Plant Sci*. 2007; 17(3):90-2.
- (16) Zhang R, Wang K, Sun M, Zhang B, Zhang H, Li S, Du H, Lu Y, Ye Y, Yu X. Characterizations and analysis of the mold from animal specimens in Shenzhen Museum. *Journal of Environmental Protection*. 2016 6;7(07):1033.
- (17) Barnett H, Hunter B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. St. Paul, Minnesota: APS Press The American Phytopathological Society; 2010.
- (18) Rogawansamy S, Gaskin S, Taylor M, Pisaniello D. An evaluation of antifungal agents for the treatment of fungal contamination in indoor air environments. *International journal of environmental research and public health*. 2015 2;12(6):6319-32.
- (19) Manrique Hernández, A., Patiño Ramírez, M., & Gutiérrez Chaves, A. Estudio del microbiodeterioro del fondo documental Anselmo Pineda de la Biblioteca Nacional de Colombia. *Conservamos, Guía técnica para la preservación en bibliotecas*. 2012 ISSN: 1457-1548. 5(5) 1-32.
- (20) Samson, R.A., Hoekstra, E.S & Frisvad, J.C. *Introduction to food-borne fungi*. 7th Edition. 2004
- (21) Hawks, C., Simmons, J. Comunicación personal. 15 agosto de 2018

- (22) Samson, R. A., & CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre,. Food and Indoor Fungi.2010
- (23) Cadnum, J. L., Shaikh, A. A., Piedrahita, C. T., Sankar, T., Jencson, A. L., Larkin, E. L., & Donskey, C. J. Effectiveness of disinfectants against *Candida auris* and other *Candida* species. *infection control & hospital epidemiology*.2017; 38(10), 1240-1243.
- (24) Dahlin, E. Preventive conservation strategies for organic objects in museums, historic buildings and archives. En *5th EC Conference report "Cultural Heritage Research: a pan European Challenge*.2002.16-18.
- (25) Bradley, S.Preventive conservation research and practice at the British Museum. *Journal of the American Institute for Conservation*. 2005 44(3), 159-173.
- (26) Zarzo, M., Fernández-Navajas, A., & García-Diego, F. J. Long-term monitoring of fresco paintings in the Cathedral of Valencia (Spain) through humidity and temperature sensors in various locations for preventive conservation. *Sensors*. 2011 11(9), 8685-8710.
- (27) Xu, J., Tang, J., Jin, Y., Song, J., Yang, R., Sablani, S. S., & Zhu, M. J. High temperature water activity as a key factor influencing survival of *Salmonella* Enteritidis PT30 in thermal processing. *Food Control*. 2019 98, 520-528.
- (28) Valika, L., Baranyi, B., Görnera, F. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roqueforti*. *International Journal of Food Microbiology*. 1999 47, 141-146.
- (29) Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., & Samson, R. A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in mycology*. 2014 78, 343-371.
- (30) Gupta R, Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology & Biotechnology*. 2006 70(1), 21-33.
- (31) Călin, M., Constantinescu-Aruxandei, D., Alexandrescu, E., Răut, I., Doni, M. B., Arsene, M. L., & Lazăr, V. Degradation of keratin substrates by keratinolytic fungi. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2017 28, 101-112.

ANEXO 1.

Tabla de Excel adjunta al documento con el diagnóstico de la colección.

ANEXO 2.

Caracterización de los morfotipos aislados en medio PDA

Morfotipo	Registro macro	Registro micro	Origen	Identificación
1	(M3-C) Colonia verde con borde blanco, reverso crema. Textura pulverulenta. Sin Pigmento difusible.	Hifas hialinas septadas, conidióforos, filalides, conidios catenulados.	Tejido muscular.	<i>Penicillium</i> sp.
2	(A4-A) Colonia verde oliva. Reverso crema. Textura aterciopelada. Sin pigmento difusible.	Hifas dematiáceas, septadas, célula conidiógena en escudete, conidios en forma de barril.	Uña.	<i>Cladosporium</i> sp.
3	(M3-B2) Colonia blanca. Reverso crema. Textura algodonosa. No pigmento difusible.	Hifas hialinas septadas.	Tejido muscular.	Micelio estéril.
4	(I13-C) Colonia blanca. Reverso crema. Textura aterciopelada. No pigmento difusible	Hifas hialinas septadas.	Tendón	Micelio estéril.

Morfotipo	Registro macro	Registro micro	Origen	Identificación
5	(M3-A) Colonia verde, reverso crema. Textura pulverulenta. Sin Pigmento difusible.	Hifas hialinas septadas, conidióforos, fialides, conidios catenulados.	Tejido muscular	<i>Penicillium</i> sp.
6	(A6-A) Colonia verde, reverso crema. Textura pulverulenta. Sin Pigmento difusible.	Hifas hialinas septadas, conidióforos, fialides, conidios catenulados.	Tejido alrededor de uña	<i>Penicillium</i> sp.
7	(B1-A) Colonia verde con borde verde más claro, reverso crema. Textura pulverulenta. Sin Pigmento difusible.	Hifas hialinas septadas, conidióforos, fialides, conidios catenulados.	Tejido muscular	<i>Penicillium</i> sp.