

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE MICROBIOLOGÍA

**Evaluación microbiológica de agentes causantes de biodeterioro en momias de
Maranga del Centro Cultural-PUCE**

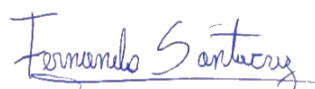
Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Microbiología

MELANIE ALEJANDRA LUNA ZAPATA

Quito, 2023

Certificado de aprobación

Certifico que el trabajo presentado por la Srta. Melanie Alejandra Luna Zapata ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



MSc. Fernando René Santacruz Flores

Director

Quito, 16 de junio de 2023

DEDICATORIA

A mi yo de 6 años, que desde que entró a la escuela amaba e investigaba de momias para cada trabajo que le pedían, a ella que creía que era un sueño que nunca se iba a cumplir.

A mi abuelito, que siempre confió en mí y ahora desde el cielo mira el fruto de mi esfuerzo.

A mi familia y a todas las personas que confiaron en mí y me ofrecieron su apoyo para que este sueño se cumpla.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al personal del Museo Jacinto Jijón y Caamaño, por permitir el muestreo de las momias presentes en este estudio y hacer que el mismo sea posible.

A Mgr. Elena Granda por escogerme para realizar este proyecto, confiar en mi capacidad como microbióloga y establecer el primer contacto con el personal del Centro Cultural PUCE.

A mis profesoras del colegio, Lic. Sonia Mejía y Lic. Estefanía Lozada por hacerme ver el potencial del mundo de la ciencia y guiarme en los primeros pasos de mi amor por ella.

A mi director de tesis, MSc. Fernando Santacruz, por acogerme como su tesista, guiarme en este proyecto y hacer el proceso un poco más fácil.

A mis lectoras, en especial a Mtr. Jeniffer Yáñez, sin su ayuda, disposición de instalaciones, materiales y equipos, así como sus palabras de apoyo no hubiera sido posible mi disertación, definitivamente no podría estar más agradecida. A PhD. Diana Astorga, por su exigencia en que seamos mejores microbiólogos, su apoyo cuando fue necesario y sus retroalimentaciones que me servirán durante toda mi vida profesional.

A Dra. Iliana Alcocer, por acogerme por primera vez en un laboratorio y brindarme los conocimientos básicos que todo microbiólogo debe conocer y a PhD. Martín Marcial, sin él la carrera no sería lo mismo, gracias por hacer las clases más interesantes, por demostrar su amor por la microbiología, por su amistad y sobre todo ser a quien puedo recurrir con toda clase de preguntas.

A mi familia, en especial a mis padres, Roberto Luna y Verónica Zapata, por darme una educación de calidad y esforzarse por hacerme una persona de bien. Los frutos de su amor y cariño se reflejan en este sueño. A mi hermana, Carolina Luna, que con sus locuras hizo que mi estadía en la universidad fuera menos estresante y las noches de estudio menos largas.

A mis abuelitos y tíos, por su constante preocupación y apoyo durante estos años. Por festejar mis logros, mostrarme que están orgullosos y recordarme que no debo dejarme vencer por nada.

A Emilia Montenegro, mi mejor amiga y compañera de locuras durante toda la carrera, definitivamente será una licenciada excelente, muchísimas gracias por tu apoyo para que esta tesis sea lo que es y por todo durante estos años, no podría estar aquí sin tu amistad.

A Daniel de la Cadena, que por pura casualidad lo conocí y terminó siendo un apoyo fundamental para mí, mil gracias por compartir tu conocimiento, por tu ayuda incondicional, tus palabras de aliento cuando fueron necesarias y los días de salir tarde del laboratorio, en definitiva, gracias por todo tu amor reflejado más de una vez en el crecimiento mutuo.

A mis amigos de la universidad, Alexis Quintana, Amanda Estrada, Doménica Aguilar, Emily López, Ámbar Galarza y Alisson Gaibor por su amistad, sus consejos, locuras y experiencias juntos.

A mi jefa en México, Hidrobióloga. Jaqueline Cruz, por contarme sus anécdotas, darme fuerzas y aliento para hacer la tesis y mantenerse pendiente de mi en este poco tiempo de conocernos.

Al personal de sala de preparaciones PUCE, por facilitar la preparación de materiales y medios de cultivo para este estudio.

Y a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por financiar parcialmente mi disertación.

En definitiva, gracias a todos.

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|--|-----|
| Certificado de aprobación..... | II |
| DEDICATORIA..... | III |
| AGRADECIMIENTOS..... | IV |
| TABLA DE CONTENIDOS..... | VI |
| LISTA DE FIGURAS..... | VII |
| LISTA DE TABLAS..... | VII |
| Resumen..... | 1 |
| Abstract..... | 2 |
| Introducción..... | 3 |
| Materiales y Métodos..... | 5 |
| Delimitación de zonas de muestreo..... | 5 |
| Muestreo..... | 6 |
| Tamizaje enzimático de hongos..... | 6 |
| Tamizaje enzimático de bacterias..... | 6 |
| Determinación del índice enzimático..... | 7 |
| Identificación y caracterización de microorganismos..... | 7 |
| Identificación molecular..... | 7 |
| Extracción de ADN..... | 7 |
| Amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis..... | 8 |
| Secuenciación y análisis..... | 9 |
| Resultados..... | 9 |
| Discusión..... | 10 |
| Conclusiones..... | 15 |
| Agradecimientos..... | 15 |
| Declaración de conflictos de intereses..... | 16 |
| Referencias..... | 16 |
| Figuras..... | 23 |
| Tablas..... | 25 |
| Hoja de firmas..... | 27 |
| Anexos..... | 28 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Vestigios humanos y sus características de biodeterioro | 23 |
| Figura 2. Gráfico de barras | 23 |
| Figura 3. Características macroscópicas y microscópicas de las colonias aisladas..... | 24 |
| Figura 4. Electroforesis de hongos y bacterias | 24 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Índices de alta actividad enzimática microbiana. | 25 |
| Tabla 2. Identificación macroscópica, microscópica y molecular de los microorganismos aislados | 26 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo 1. Acta de compromiso de uso de imágenes de bienes culturales | 28 |
|---|----|

El siguiente trabajo de investigación se presenta en el formato de la *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* a partir de la siguiente hoja.

Evaluación microbiológica de agentes causantes biodeterioro en momias de Maranga del Centro Cultural-PUCE

Microbiological evaluation of biodeterioration in Maranga mummies of the Cultural Center-PUCE

Luna Zapata Melanie Alejandra^{1*}, Santacruz-Flores Fernando¹

¹Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Carrera de Microbiología. Quito, Ecuador.

*Autor de correspondencia: maluna@puce.edu.ec

Resumen

La reserva del Museo Jacinto Jijón y Caamaño de la PUCE, alberga 46 ejemplares de Momias de Maranga. Estas momias muestran signos de deterioro que pueden deberse a factores ambientales o microbianos. Es por esto que es necesario realizar un análisis microbiológico para determinar si existen microorganismos en los cuerpos momificados y si son capaces de afectarlos por medio de su actividad enzimática.

Se evaluó a dos momias, una con fardo funerario y otra expuesta. Se realizó un muestreo por impronta con cinco diferentes medios de cultivo. A partir de los aislamientos se realizó un tamizaje enzimático (amilolítico, celulolítico y proteolítico) relacionado al deterioro de los especímenes. Los aislamientos que exhibieron las capacidades enzimáticas evaluadas fueron caracterizados a nivel macroscópico, microscópico y molecular. Se identificó un total de 14 microorganismos con un índice enzimático significativo. Entre estos, los géneros *Penicillium* y *Cladosporium* destacan por tener una alta capacidad enzimática mientras que cada bacteria aislada fue significativa para una de las tres enzimas. Los hallazgos sugieren que los microorganismos encontrados son la causa del deterioro de las momias, especialmente aquella envuelta en fardo. Adicionalmente, constituyen una base para profundizar la investigación referente al deterioro microbiológico de restos históricos en el país.

Palabras clave: Momias, biodeterioro, microorganismos, capacidad enzimática.

Abstract

The reserve of the Jacinto Jijón and Caamaño Museum from the PUCE houses 46 copies of Maranga Mummies. These mummies show signs of deterioration that may be due to environmental or microbial factors. This is why it is necessary to perform a microbiological analysis to determine if there are microorganisms in the mummified bodies, and if they are capable of affecting them through their enzymatic activity.

Two mummies were evaluated, one with a funerary bundle and another exposed. An imprinting sampling was carried out with five different culture media. From the isolates, an enzymatic screening (amylolytic, cellulolytic and proteolytic) related to the deterioration of the specimens was performed. The isolates that exhibited the evaluated enzymatic capacities were characterized at the macroscopic, microscopic and molecular levels. A total of 14 microorganisms with a significant enzyme index were identified. Among these, the genera *Penicillium* and *Cladosporium* stand out for having a high enzymatic capacity, while each isolated bacterium was significant for one of the three enzymes. The findings suggest that the microorganisms found are responsible for the deterioration of the mummies, especially on the one wrapped in a bundle. Additionally, they constitute a basis for deepening research regarding the microbiological deterioration of historical remains in the country.

Keywords: Mummies, biodeterioration, microorganism, enzymatic capacity

Introducción

La reserva del Museo Jacinto Jijón y Caamaño, perteneciente al Centro Cultural de la PUCE, se caracteriza por ser guardiana de diversos bienes culturales entre estos 46 ejemplares de momias de Maranga. En 1925, Jacinto Jijón y Caamaño realiza estudios en el complejo arqueológico de Maranga y de las excavaciones resultantes traslada restos momificados al Ecuador. El complejo, asentado en la región del valle costero de Lima, Perú, fue uno de los más importantes en la época contemporánea de la región. En los registros de Jijón y Caamaño 1949, y desenmarañados por Lumbreras 2014, el historiador logró exhumar momias de diferentes periodos enfocándose en la época de Proto Lima. Cada periodo tenía una forma específica de disponer de sus muertos para asegurar una correcta y delicada transición de la vida a la muerte. A pesar de que su donación fue en 1963, no fue hasta 2010 que se les otorgó un lugar correcto para su almacenamiento y conservación con condiciones controladas dentro de la reserva (Ordoñez et al. 2015; Jijón y Caamaño 1949).

A las momias de este estudio, se las colocaba en posición fetal o decúbito lateral o dorsal. Eran envueltas en tejidos de caña, telas de algodón escarmenado de camélidos y recubiertas de paja y hojas. La cantidad de tejidos, fardos y soportes de madera o de caña, era variable. Toda la momia cubierta por fardos era sujeta con cuerdas tejidas de totora. En esta tradición, utilizaban una técnica combinada entre momificación natural y artificial, que se veía favorecida por las características del suelo donde eran enterradas para garantizar la desecación del cuerpo y así evitar su deterioro (Lumbreras 2014; Llagostera 2003; Jijón y Caamaño 1949; Uhle 1944).

El análisis microbiológico en momias es un estudio que se realiza alrededor del mundo con el fin de asegurar su conservación y evitar la pérdida de tan importante material histórico. De acuerdo con Piñar et al. 2013, este tipo de investigaciones, en restos humanos, se volvieron relevantes ante las muestras de deterioro ocasionadas por microorganismos oportunistas. Los hongos filamentosos son de principal interés por ser capaces de colonizar los cuerpos preservados. Estos causan la presencia de manchas blanquecinas, deterioro y pérdida tejidos, zonas con oscurecimiento, agujeros en textiles funerarios, micelio aéreo evidente, entre otros (Abdel-Maksoud y El-Amin 2012). Los microorganismos, mediante su actividad metabólica, pueden causar biodeterioro con el mecanismo de liberación de enzimas celulolíticas, lipolíticas, proteolíticas y amilolíticas (Hammed et al. 2020). Entre los géneros de hongos filamentosos mayormente aislados en momias se encuentran: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Monilia* y *Alternaria*. Asimismo, entre las levaduras

de mayor importancia se destacan *Candida*, *Saccharomyces* y *Rhodotorula*; y finalmente entre las bacterias biodeterioradoras de restos históricos resaltan los géneros *Streptococcus*, *Micrococcus* y *Bacillus* (Aguayo 2015; Cavka et al. 2010).

La composición de las momias, su grado de exposición y conservación, y las condiciones ambientales a las que fueron expuestas (en este caso desconocidas por alrededor de 47 años), las vuelve un blanco vulnerable de colonización de microorganismos que ocasionan fenómenos de biodeterioro (Valentín 2012; Piñar et al. 2013). El término biodeterioro es utilizado para definir toda alteración en materiales ocasionada por agentes biológicos y su metabolismo, donde la estética del material se ve afectada y existen señales de destrucción o desgaste (Gómez et al. 2012; Ministerio de Cultura y Deporte 2021).

La metodología apropiada para un muestreo de esta índole no ha sido estandarizada, puesto que entra en un debate ético por ser utilizadas en un cuerpo humano. Sin embargo, la mayor parte de muestreos se realizan mediante hisopado con el uso de agentes neutralizantes para evitar la inhibición por fungicidas o tratamientos previos en los cuerpos momificados (Cavka et al. 2010; Mansour 2018). Existen métodos no invasivos como rayos X, resonancia magnética, microscopía electrónica, tomografía y uso de luminómetro (Valentín 2012). La desventaja de estas técnicas es que no permiten un análisis microbiológico certero. En este contexto, el muestreo por impronta resulta la mejor opción, al ser poco invasivo y permitir, a su vez, la posibilidad de aislamiento e identificación de los microorganismos. Esta técnica genera un impacto mínimo en la momia, evita extender la contaminación por el uso directo de químicos y reduce a su vez el daño físico (Moissidou et al. 2015; Samadelli et al. 2019).

Independientemente del método de muestreo seleccionado, es importante medir los parámetros ambientales, en especial la temperatura y humedad, con el fin de evitar la colonización y proliferación de microorganismos. El control de estos parámetros es prioritario puesto que las características intrínsecas de las momias pueden verse afectadas; entre estas se incluyen su porcentaje de agua, el cual es afectado por la técnica de momificación utilizada, la exposición a oxígeno y su concentración en el ambiente, los textiles funerarios, el uso de tratamientos previos, entre otros (Magdy et al. 2020; Valentín 2015; Aguayo 2015).

Aunque el valor del patrimonio cultural no puede ser netamente expresado, en términos monetarios, la pérdida mundial anual por biodeterioro neto ocasionado por hongos es de alrededor de \$40 000 billones (Sterflinger y Pinar 2013). En ese contexto el análisis

microbiológico de las momias peruanas es una necesidad urgente y tiene el fin de salvaguardar su importancia tanto histórica como económica. Esto motivo la colaboración del centro cultural con la cerrera de microbióloga, lo que justifica la realización del presente estudio (correo de B Lucero en 2022; sin referencias, ver agradecimientos).

Hasta la fecha de redacción de este artículo, existen dos estudios de biodeterioro de bienes patrimoniales en el país. Uno por parte de la Universidad Tecnológica Equinoccial con el análisis de cinco lienzos en conventos en el centro de la ciudad de Quito (Poyatos et al. 2017); y otro que se llevó a cabo por la Universidad Internacional SEK con el uso del patrimonio cultural que en este caso es la iglesia de Guápulo, en donde se busca la identificación de hongos tanto en la estructura de la iglesia, sus pinturas, esculturas y altares (Garcés y Luna 2009). En Ecuador, el análisis de agentes causantes de biodeterioro en momias es inexistente. Por este motivo, se recalca la importancia de este estudio al generar un precedente y ser el primero en el país lo que permitirá iniciar un historial de las condiciones de momias, de acuerdo a manifestaciones de metabolismo microbiológico. Con estos datos se podrá inferir mejores métodos de preservación de los vestigios humanos, condiciones de atmósfera modificada para disminuir la posible proliferación de microorganismos, así como enfoques nuevos en la investigación arqueológica ligada a la Paleomicrobiología.

Con este antecedente, la investigación busca conocer si existen microorganismos causantes de biodeterioro y si estos tienen la capacidad enzimática suficiente para ser causantes de daño a los cuerpos momificados.

Materiales y Métodos

Delimitación de zonas de muestreo

Las momias en estado crítico fueron revisadas de forma preliminar, de entre estas se escogió dos. La primera, catalogada por el museo como “Fardo funerario completo con restos de individuo en el interior (posiblemente momificado)”, fue identificada en este estudio como momia en fardo funerario (MEF). La segunda, descrita como “Vestigio humano momificado de un individuo subadulto” fue clasificada como momia sin fardo o expuesta (MSF). Los puntos con mayor afección de cada cuerpo fueron delimitados para el muestreo. Se establecieron cinco puntos para la momia en fardo y seis puntos para la momia expuesta. La delimitación incluyó un registro fotográfico (Figura 1), así como una descripción de las características y signos de biodeterioro en base a Valentín 2013.

Muestreo

El muestreo se llevó a cabo en la reserva del museo. Se tomó en cuenta las condiciones ambientales antes, durante y después del proceso (temperatura y humedad relativa). Se utilizó cinco medios de cultivo, todos modificados para su uso en superficies con la adición de caldo neutralizante LPT (Sanchis Solera 2019) y en placas de contacto. El agar papa dextrosa (PDA por sus siglas en inglés) para hongos y levaduras y el agar *Plate Count* (PCA por sus siglas en inglés) para bacterias mesófilas aerobias. Así mismo, se utilizó tres medios enzimáticos para diferentes tipos de microorganismos: agar gelatina (AG) para evaluar proteolíticos, en base al protocolo de Edison y Martin 2012, modificado, agar carboximetilcelulosa (CMC) para celulolíticos y agar almidón (AA) para amilolíticos.

El muestreo se realizó por impronta y por duplicado. Las placas destinadas para la evaluación de mesófilos aerobios fueron incubadas a 30 ± 2 °C por dos semanas, mientras que las placas para hongos y levaduras se mantuvieron a temperatura ambiente, es decir, a 25°C por tres semanas, en ambos casos con monitoreo diario hasta la purificación de las colonias microbianas.

Tamizaje enzimático de hongos

Los cultivos para identificar halos de hidrólisis de cada enzima se realizaron por separado y a partir de colonias aisladas. Para revelar el medio CMC se utilizó el colorante rojo Congo al 1% que permitió hacer evidentes los halos de solubilización de color amarillo anaranjado alrededor de la colonia por presencia de enzimas celulolíticas, para que el halo fuera más visible se dejó en la incubadora por 15 a 20 minutos (Paillé 2012; Alcívar y Vargas 2013). Así mismo, se utilizó el reactivo lugol para revelar el medio AA, este reacciona con la amilopeptina y produce un color morado-marrón oscuro en las zonas donde no se ha hidrolizado el almidón (Universidad de la Patagonia San Juan Bosco 2017). Mientras que para el medio AG no se utilizó revelador, puesto que al utilizar un medio modificado permite exentar ese paso (Edison y Martin 2012).

Tamizaje enzimático de bacterias

Cada colonia obtenida a partir de un cultivo axénico fue cultivada en tubos de vidrio con 4 ml de caldo de infusión cerebro-corazón (BHI por sus siglas en inglés), se incubó a 28 ± 2 °C por 48 h para obtener un cultivo a escala uno McFarland (3×10^8 células), con excepción de la colonia perteneciente a filo actinobacteria que se incubó por siete días con agitación constante

para llegar a concentración necesaria. Las placas Petri con cada medio enzimático se dividieron en tres secciones, cada una fue rotulada de acuerdo la parte de la solución a utilizar ya sea sobrenadante, pellet o el cultivo como tal, a cada sección se le colocó un sorbete autoclavado de 5 mm.

Treinta microlitros del cultivo previamente homogenizado fueron colocados en el primer sorbete. Luego se tomó 1 ml del cultivo y se lo dispensó en microtubos de 1,5 ml para ser centrifugados a 5000 G por 8 minutos. El sobrenadante fue filtrado por filtros de 0.2 μm con ayuda de una jeringa de 10 ml. Treinta microlitros del sobrenadante libre de células fueron inoculados en el segundo sorbete. Finalmente, al *pellet* obtenido en el microtubo fue lavado dos veces con 500 μl de PBS (*Phosphate-buffered saline*), se resuspendió las células en 100 μl del mismo *buffer* y se inoculó 30 μl en el último sorbete.

Todas las placas fueron incubadas por 48 h a 28 ± 2 °C. Para mejorar la visualización de los halos de degradación del medio AG se refrigeró las placas por una hora. Por otro lado, los medios CMC y AA fueron revelados de la misma forma que en el *screening* de hongos.

Determinación del índice enzimático

Para determinar la actividad enzimática se utilizó la fórmula propuesta por Florencio et al. 2012, esta indica que si el índice enzimático es $\geq 1,5$ se la considera con potencial de ser alta productora de enzimas.

$$\text{Índice enzimático} = \frac{\text{Diámetro del halo de hidrólisis}}{\text{Diámetro de la colonia}}$$

Identificación y caracterización de microorganismos

Para la identificación macroscópica se tomó en cuenta características del anverso y reverso de la colonia, el color, elevación, borde y forma de la misma, así como presencia de exudados o pigmentos. Mientras que, para la identificación microscópica de los microorganismos seleccionados se realizó la tinción de Gram para bacterias y la tinción con azul de lactofenol, por medio de cinta adhesiva, para observar estructuras representativas de mohos.

Identificación molecular

Extracción de ADN

Las cepas con alto índice enzimático ($\geq 1,5$) fueron tomadas como candidatas para su identificación a nivel molecular. Se realizó la extracción del material genómico mediante la

modificación del protocolo del kit *Purelink™ plant total DNA purification* para su uso en hongos al exceptuar los pasos de preparación de lisado de células vegetales. Por otro lado, se utilizó *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* para la extracción de ADN de bacterias y de aquellos hongos cuya calidad se veía influenciada por proteínas o compuestos fenólicos. La calidad y concentración del ADN obtenido fue medida con ayuda de espectrofotometría.

Amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis

Para la amplificación de ADN bacteriano, se utilizó la región 16s ARNr con el uso del *primer forward* 27F con la secuencia 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' y el *primer reverse* 1492 R con la secuencia 5' TACGGYTACCTTGTTACGACT 3'.

Para la amplificación de ADN fúngico, se utilizó la región ITS con el *primer* ITS1 que corresponde a la secuencia 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' e ITS4 con 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'.

De acuerdo al protocolo del Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico 2021, para la preparación del *Master Mix* se añadió 1,25 µl de *primer forward*, 1,25 µl de *primer reverse*, 8 µl de agua libre de nucleasas (LDN), 12,5 µl de *Go Taq®* y 2 µl del ADN obtenido, de manera que se tuvo un total de 25 µl por muestra.

Sin embargo, ante problemas en la amplificación se modificó la preparación de la *Master Mix* mediante la adición de betaína a 0,5 M, este un potenciador de PCR para obtener los resultados de aquellos hongos que generaron problemas de amplificación, se redujo la cantidad de *primers* a 1µl para evitar la amplificación de sitios inespecíficos y también el total de LDN por tubo.

Así mismo se siguió el protocolo estandarizado de PCR del Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico 2021, para hongos: desnaturalización a 95 °C por un minuto, 30 ciclos de alineamiento a 95 °C por un minuto, 55 °C por treinta segundos y 72 °C por un minuto y un ciclo de elongación a 72 °C por cinco minutos. Para bacterias desnaturalización a 95 °C por cinco minutos, 30 ciclos de alineamiento a 94 °C por treinta segundos, 58 °C por treinta segundos y 72 °C por 40 segundos y un ciclo de elongación a 72 °C por 10 minutos.

Para la electroforesis se preparó un gel de agarosa al 1,5 %, en donde se incluyó las muestras del PCR, un control positivo y un control negativo, además de la escalera molecular. Se le proporcionó una carga de 95 voltios por una hora en *buffer* de TAE 1X. Se utilizó el colorante SYBR® Safe para el revelado de las bandas.

Secuenciación y análisis

Las muestras positivas fueron enviadas a *Macrogen*, en Seúl, Corea del Sur, para obtener la secuenciación por método de Sanger (Sanger et al. 1977). La secuencia enviada fue analizada en el programa MEGA11 (Tamura et al. 2021) en donde se eliminaron zonas de ruido y se verificó la calidad de la secuencia. Se utilizó la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *EzBioCloud* y *Mycobank* para la identificación en base al mayor porcentaje de identidad, con un valor mínimo de 97%.

Resultados

A partir del muestreo inicial de las cinco zonas del cuerpo momificado envuelto y seis zonas del cuerpo expuesto, se obtuvo diecisiete hongos, seis bacterias, una actinobacteria y una levadura, con un total de veinticinco microorganismos, en el que solo un hongo corresponde a la momia expuesta. La momia envuelta en fardo funerario tiene una mayor carga microbiana en la zona abierta superior izquierda, con cuatro hongos y una bacteria y con un total general de trece microorganismos en la misma (Figura 2).

De los dieciocho aislados fúngicos, once tienen alto potencial enzimático ($\geq 1,5$) mientras que los siete restantes no tienen capacidad enzimática o en su defecto la actividad enzimática evaluada no es significativa ($< 1,5$). De igual forma, en las bacterias de las siete aisladas solo tres cuentan con potencial biodegradador. Es así que los microorganismos descritos en la Tabla 1 fueron seleccionados para su posterior identificación en base a esta característica.

En la identificación macroscópica (Figura 3) se obtuvo resultados de colonias fúngicas circulares con diferentes bordes, texturas que varían en características aterciopeladas, polvosas y algodonosas, con colores en el anverso desde verde en diferentes matices hasta cafés y grises, así como en el reverso diferentes tonalidades de blancos y cafés, mientras que las colonias bacterianas variaban entre regulares e irregulares, elevadas o planas y con un color blanco, blanco amarillento o transparente (Tabla 2).

Para la identificación molecular se midió la concentración y pureza de cada muestra de ADN, todas presentaron una concentración entre 20 a 60 μl y una pureza medida a 260/280 entre 1,30 a 2. Se amplificaron un total de diez secuencias de hongos, una secuencia de levaduras y tres secuencias de bacterias por PCR convencional y fueron verificadas mediante electroforesis. En cinco cepas fúngicas se observaron fragmentos de 550 pb, otras cinco presentaron bandas de

600 pb y la restante de 650 pb. En bacterias las tres cepas presentaron fragmentos de 1500 pb (Figura 4). Una vez evidenciada la amplificación se envió a *Macrogen* para su secuenciación.

En el análisis bioinformático se obtuvo trece muestras con porcentajes de identidad que muestran una similitud desde 98.76 % hasta el 100%, donde se ve superado el umbral mínimo de 97%. Mientras que la cepa de levadura obtuvo un porcentaje de 96.94% que es levemente menor al necesario para una identificación a nivel de especie. Se obtuvo en total cinco especies de *Cladosporium*, dos especies de *Penicillium*, una especie de *Aspergillus*, una especie de *Dentocorticium* y una levadura *Rhodotorula* en cuanto a hongos se refiere. Por otro lado, en bacterias se obtuvo una especie de *Lentibacillus*, una especie de *Virgibacillus* y una especie de *Sposarcina*, todas del orden Bacillales (Tabla 2).

Discusión

La momificación, en este caso artificial y natural, implica procesos de deshidratación y desecación (Lumbreras 2014), este proceso reduce el porcentaje de agua (A_w) del cuerpo en cuestión a niveles en los que los microorganismos no son capaces de reproducirse, esto los lleva a un estado de latencia (Abdel-Maksound y El-Amin 2012; Llagostera 2003). El estado de latencia, también conocido como dormancia, ocurre cuando los microorganismos se encuentran bajo estrés y con una disponibilidad limitada a nutrientes, lo que los obliga a reducir al mínimo su metabolismo, esto les permite mantenerse viables, pero no cultivables (Guerra Peñaloza 2014; Delgado et al. 2018).

Salir de este estado puede ser rápido o lento en base a las condiciones en las que se encuentren (Pedrique de Aulacio y De Castro 2008). En este caso, las condiciones para el crecimiento de los microorganismos fueron favorables desde el muestreo, con un medio de cultivo nutritivo, temperatura adecuada y un A_w óptimo. Sin embargo, existen microorganismos que necesitan condiciones de crecimiento específicas o una mayor nutrición, por lo que, los medios de cultivo seleccionados pueden haber tenido un impacto en la obtención de microorganismos. Además, solo el 1% de microorganismos son cultivables, ante esto sería necesario un estudio metagenómico para obtener todo el microbioma de las momias (Martiny 2019).

A pesar de lo anterior, la cantidad de microorganismos presentes en las dos momias evaluadas varía significativamente. Se esperaba encontrar una diferencia en el número de aislamientos entre la momia envuelta (que estuvo expuesta directamente al suelo) y la momia expuesta (la cual se presume recibió tratamientos previos para retirar fardos), sin embargo, los datos revelan

una desproporción importante. Esto puede deberse a que la momia envuelta en fardo formó parte de la exposición permanente del museo desde 2014 hasta 2022, año en que fue reubicada a la sala de cuarentena de la reserva. Por ende, estuvo expuesta a las condiciones del mismo por alrededor de ocho años, mientras que las momias restantes, que incluye a la momia expuesta, se encontraban almacenadas en la reserva con condiciones controladas y a su vez contaron con dos procesos de fumigación con amonio cuaternario, uno en 2020 y otro en 2021.

Desafortunadamente, la única parte del Museo que cuenta con un sistema de ventilación separado que controla los parámetros ambientales es la vitrina de las *Tzanzas*. Si bien el museo también fue fumigado, la momia envuelta en fardo permaneció en su vitrina sin que fuera influenciada por el químico. Según Samadelli et al. 2019, los tejidos de las momias en temperaturas superiores a 20°C y porcentajes de humedad relativa por encima del 65% aumentan el Aw lo que acelera su descomposición, los vuelve más susceptibles a la contaminación aérea y a la activación de microbiota existente. La presencia de los restos funerarios dentro de la vitrina sin controles ambientales explicaría el alto nivel de desgaste en las telas del fardo funerario y su alta cantidad de microorganismos.

La presencia de microorganismos de tipo fúngicos en los vestigios humanos de Maranga es un problema que tiene un papel clave en el nivel de deterioro. Los hongos tienen un sistema de digestión externa para degradar las macromoléculas orgánicas como polisacáridos (almidón y celulosa) y proteínas (gelatina) por medio de la secreción de enzimas y las transforman en unidades más pequeñas que son asimiladas por absorción como parte de su metabolismo (Carlile et al. 2001). Este proceso metabólico afecta el fardo funerario de la momia envuelta puesto que causa debilidad, desgaste, presencia de manchas y zonas oscuras. Puesto que, al degradar los principales componentes de las fibras de las telas, las vuelven delgadas y fáciles de deshacer.

La capacidad enzimática presente en los hongos determina su potencial como biodegradador. A mayor capacidad enzimática hay una mayor liberación de enzima lo que abarca un mayor daño en los cuerpos momificados. La principal desventaja de los microorganismos de tipo fúngico es que pueden tener los tres tipos de enzimas (celulasas, proteasas y amilasas) y diferentes formas de las mismas, unas más efectivas que otras. Para este estudio se determinó por medio de Florencio et al. 2012 el límite de aceptación con un valor $\geq 1,5$. Sin embargo el estudio de Dornelas et al. 2017 establece valores bajos, medios, altos y muy altos de la actividad enzimática. Los valores entre $2 > IE > 4$ significan una alta capacidad enzimática. Es así que los resultados obtenidos de microorganismos como *P. brevicompactum* Dierckx 1901, con una

alta capacidad proteolítica y celulolítica, *C. cladosporioides* Fresenius, 1952, con alta capacidad amilolítica, los cataloga como los principales deterioradores de la momia en envuelta puesto que son capaces de afectar y degradar el los componentes del fardo funerario (Naji et al. 2014; Hameed 2019).

Hongos como *Cladosporium*, *Penicillium* y *Aspergillus* han sido documentados en varias ocasiones a lo largo del tiempo como agentes de biodeterioro en cuerpos momificados. Cuentan con una alta capacidad enzimática y la habilidad de formar esporas, lo que les permite permanecer mayor tiempo sobre los cuerpos momificados. Son versátiles en sus condiciones de crecimiento, en muchos casos requieren de una baja temperatura y humedad relativa desde el 50% para desarrollarse. Estas características hacen que se los considere como microorganismos de gran importancia en biodeterioro (Valentín 2003; Valentín 2007; Abdel-Maksoud 2013; Aguayo 2015).

A pesar de que *Cladosporium* es el género con mayor diversidad en el estudio. Se distingue a la cepa de *P. brevicompactum* Dierckx 1901, por tener la mayor capacidad celulolítica (3,0). Además, está dentro de los tres microorganismos con mayor capacidad proteolítica (1,78), junto con la otra cepa del mismo género y especie (2,70). Mediante la alineación con en el sistema MEGA11 (Tamura et al. 2021) se sugiere que estas dos cepas podrían ser distintas tanto por sus diferencias enzimáticas, morfológicas (macroscópicas y microscópicas) como la presencia de polimorfismos a nivel genético. Sin embargo, dicha variación se limita a mutación puntual, es decir, el cambio en un único nucleótido. Aunque en muchos casos este tipo de variaciones no causa problemas significativos, si determina un cambio a una cepa diferente. Es necesario realizar una investigación más a fondo para determinar la distancia evolutiva entre las cepas diferentes y cuál es la influencia de este cambio en la producción enzimática.

Hongos como *P. rubens* Biourge 1923, *P. brevicompactum* Dierckx 1901, y *A. niger* Tieghem 1867, pueden ser perjudiciales para los textiles y fardos funerarios que envuelven a las momias. Los materiales utilizados para las telas del periodo de Proto-Lima eran principalmente fibras animales, como lana de camélidos, y fibras vegetales, ambas de origen orgánico. Estos materiales se caracterizan por durabilidad, estabilidad y elasticidad (Tantaleán Gómez y Stanish 2022; Jijón y Caamaño 1949). Los géneros mencionados afectan a los textiles de los cuerpos momificados cuando han sido expuestos a condiciones desfavorables, como es el caso de las momias de Maranga (Camelia Illies 2021). Estos microorganismos, al ser celulolíticos, podrían

ser los responsables del alto nivel de desgaste y degradación de los textiles funerarios (Valentín 2003).

Por otra parte, se destaca a la cepa de *Cladosporium cladosporioides* Fresenius, 1952, como la única entre los aislamientos fúngicos que exhibe una alta capacidad amilolítica. En este estudio se aislaron cinco especies diferentes del hongo, que incluyen a *C. cladosporioides*, *C. tenuissimum*, *C. asperulatum*, *C. delicatulum* y *C. halotolerant* (Fresenius, 1952; Cooke, 1878; Bensch et al. 2010; Cooke, 1876. y Zalar, de Hoog y Gunge-Cim, 2007). Investigaciones previas realizadas por Riverón Acosta, et. al. 2017, demostraron que el género *Cladosporium* es productor de proteasas, al utilizar un medio de cultivo con caseína y evidenciar un halo de degradación, Vázquez-Montoya 2020, lo clasifica como uno de los tres hongos con mayor capacidad celulolítica, junto con *Penicillium* y *Fusarium*. Lo expuesto previamente coincide con los resultados obtenidos del aislamiento de momias, puesto se evidenció un alto potencial enzimático para las tres enzimas evaluadas.

De igual manera se aisló una cepa de *Dentocorticium portoricense* Larsen y Gilbertson 1974. Este hongo es conocido como un importante degradador de madera puesto que excreta celulasas, hemicelulasas y pectinasas como parte de su metabolismo para facilitar el acceso a los nutrientes (Hibbet y Donogue 2001; Jang et al. 2016). Sin embargo, no fue aislado de las vigas de madera que soportan a la momia si no de la zona abierta derecha de la misma. Este microorganismo probablemente comenzó en las vigas y luego se trasladó a áreas de la momia que ya habían sido degradadas previamente por otros microorganismos, lo que facilitó su metabolismo.

La levadura aislada, *Rhodotorula* sp. Harrison 1927, no presenta la pigmentación característica de este género, esto puede ser explicado por una mutación que impide la producción adecuada de carotenoides, lo que evita la expresión de su color rojo anaranjado característico. Según Mot et al. 2017, la exposición de químicos, la baja densidad de las paredes celulares, el alto estrés oxidativo y la injuria microbiana podrían estar vinculados con una mutación causante de despigmentación. La levadura produce pigmentos como una forma de protección contra el estrés ambiental y la presencia de rayos UV, lo que le permite protegerse de los radicales libres y agentes antioxidantes (García-Cortes et al. 2021; Sharma y Ghoshal 2019) en este caso al no verse afectada por los rayos solares por un amplio periodo de tiempo, mutó. La ausencia de pigmentos en *Rhodotorula* resulta beneficiosa para las momias puesto que evita la formación

de manchas en los fardos funerarios. No obstante, esta característica también podría enmascarar su efecto.

En cuanto a bacterias se refiere, se demostró que la bacteria *Lentibacillus populi* Sun et al. 2016, tiene la mayor capacidad celulolítica dentro de las bacterias evaluadas. Ha sido catalogada como microorganismo degradador de madera por presentar actividad enzimática al evaluar la hidrólisis de diferentes sustratos. En los estudios la bacteria mostró resultados positivos para la degradación de proteínas al hidrolizar L-tirosina y caseína, así como para la degradación de celulosa mediante el uso de B-glucuronidasa. Al ser Gram positiva, esta bacteria puede formar endosporas, lo que le permite permanecer en el cuerpo momificado a lo largo del tiempo, incluso en condiciones adversas. Este microorganismo fue encontrado previamente en coprolitos de la civilización Caral-Supe, la más antigua del Perú (Vásquez-Domínguez et al. 2020).

Por otro lado, se destaca la bacteria *Virgibacillus carmonensis* Heyrman et al. 2003, por poseer la mayor capacidad amilolítica evaluada de su grupo. Esta bacteria ha sido previamente identificada en biopelículas asociadas al biodeterioro de murales en Carmona, España, así como en las paredes de las Catacumbas Capuchinas de Palermo, lo que evidencia su capacidad para causar deterioro. Esta bacteria es Gram positiva y produce endosporas subterminales. Puede utilizar la celobiosa (disacárido obtenido de la hidrólisis parcial de la celulosa) como un sustrato de crecimiento, aunque de forma poco o no eficiente, por lo que no creció en el medio de cultivo con celulosa, lo afirma la ausencia de actividad celulolítica. Se le atribuye una alta actividad proteolítica puesto que puede hidrolizar una variedad de formas de proteína, entre estas la caseína y la gelatina (Piñar et al. 2014; Heymar et al. 2003).

Finalmente, *Sporosarcina aquimarina* Yoon et al. 2001, resalta por su capacidad como productora de proteasas a comparación del resto de cepas. Esta ha sido aislada en muestras de agua de mar y en regiones de la Antártida. Esta bacteria es psicrófila y cuenta con enzimas psicrófilas que le dan una gran flexibilidad para adaptarse a cualquier ambiente. Es Gram positiva, tiene forma de bastón y es formadora de endosporas (Yoon 2001; Santos et al. 2014). La presencia de esta bacteria en las momias puede verse relacionada con la cercanía del centro arqueológico Maranga a la zona costera y fuentes de agua. También se la identificó como contaminante en el museo de Auschwitz y en el tracto intestinal de la momia de un infante del antiguo Egipto (Zink 2000; Rajkowska 2016). Su capacidad proteolítica fue probada por

Santos et al. 2014, para su uso a nivel industrial. Se la expuso a diferentes sustratos como la gelatina y albúmina que fueron degradadas por las metaloproteasas de la bacteria.

Conclusiones

Este estudio permite tener un primer acercamiento a las condiciones microbiológicas en las que se encuentran los vestigios humanos de la colección del Museo Jacinto Jijón y Caamaño. Además, establece una metodología inicial de muestreo e identificación basada en las características enzimáticas de los microorganismos. Es imprescindible investigar más a fondo para evitar la pérdida de estos bienes culturales de alta importancia.

La presencia o ausencia de fardo funerario, las condiciones de almacenamiento y el uso de tratamientos previos como fumigaciones influyen la cantidad de microorganismos presentes en cada momia. Los microorganismos aislados e identificados por medio de este estudio tienen una alta capacidad enzimática por lo que son catalogados como los principales causantes del biodeterioro observado en las momias, principalmente en la momia envuelta cuyo fardo funerario se deshace al tacto. Asimismo, cuentan con estrategias de supervivencia que facilitan su permanencia en los cuerpos momificados.

Los géneros de tipo fúngico con mayor capacidad enzimática fueron *Penicillium* y *Cladosporium*, mientras que cada bacteria de las tres estudiadas fue significativa para una de las enzimas evaluadas. Todos estos microorganismos han sido reportados previamente como agentes de biodeterioro en restos momificados a lo largo del mundo. Es por esto que se sugiere realizar un estudio más a fondo de las momias pertenecientes a la reserva del museo para determinar si estos microorganismos se encuentran en todas ellas o si se reducen a la momia en estado de cuarentena.

Agradecimientos

Un especial agradecimiento a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por financiar parcialmente esta investigación. A MSc. Fernando Santacruz por dirigir este proyecto y ser mi director de disertación. A los profesionales del Museo Jacinto Jijón y Caamaño, Byron Lucero y Mikel Villaverde por permitir el muestreo de sus vestigios humanos y a Mgtr. Elena Granda por establecer un primer contacto con el Centro Cultural PUCE para realizar este estudio.

Declaración de conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés en publicar este artículo

Contribución de los autores

ML: Concepción y diseño del estudio, diseño experimental del estudio, adquisición, análisis e interpretación de datos, redacción de la versión inicial del manuscrito.

FS: Diseño experimental del estudio, revisión del manuscrito y gestión de financiamiento.

Referencias

Abdel- Maksoud G, El-Amin, A. 2012. The investigation and conservation of a Gazelle mummy from the late period in Ancient Egypt. *Mediterranean Archaeology and Archaeometry*. 13 (1): 45-67. <http://maajournal.com/Issues/2013/Vol13-1/FullTextMaksoud.pdf>

Aguayo Y. 2015. Identificación microbiológica básica de los hongos en el ambiente y en los bienes documentales del archivo y biblioteca del conjunto conventual de la orden franciscana de Quito. [Tesis de grado] [Quito, Ecuador]. Universidad Tecnológica Equinoccial.

Arya A, Shan A, Sadasivan S. 2001. Indoor aeromycoflora of Baroda Museum and deterioration of Egyptian mummy. *Current Science*. 81 (7): 793-799. https://www.researchgate.net/publication/242090475_Indoor_aeromycoflora_of_Baroda_museum_and_deterioration_of_Egyptian_mummy

Bensch K, Groenewald JZ, Dijksterhuis J, Starink-Willemse M, Andersen B, Summerell BA, Shin HD, Dugan FM, Schroers HJ, Braun U, et al. 2010. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Studies in Mycology*. 67: 1-94.

Biourge. 1923. *Penicillium rubens*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1108849&lvl=3&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock

Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. 2001. *The Fungi*. Academic Press. London: Harcourt Science and Technology Company.

Cavka M, Glasnović A, Janković I, Sikanjić P R, Perić B, Brkljacić B, Mlinarić-Missoni E, Skrlin J. 2010. Microbiological analysis of a mummy from the archeological museum in Zagreb. *Collegium antropologicum*. 34 (3): 803–805. <https://hrcak.srce.hr/file/89467>

Cooke. 1876. *Cladosporium delicatulum*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

Cooke. 1878. *Cladosporium tenuissimum*. <https://www.gbif.org/species/2620623>

Delgado Romero JA, Gómez Fernández EJ, González Grau JM. 2018. La vida microbiana en condiciones adversas. ¿Los microorganismos viven frecuente o esporádicamente a tasas de crecimiento casi nulas? DIGITAL.CSIC. <https://digital.csic.es/handle/10261/190767>

Dierckx. 1901. *Penicillium brevicompactum*.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5074&lvl=3&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock

Dornelas JCM, Fontes Figueiredo JE, De Abreu CS, De Paula Lana EG, Abreu Oliviera C, Marriel I. 2017. Characterization and phylogenetic affiliation of Actinobacteria from tropical soils with potential uses for agro-industrial processes. *Genetics and molecular research*. 16 (3). https://www.researchgate.net/publication/319495118_Characterization_and_phylogenetic_affiliation_of_Actinobacteria_from_tropical_soils_with_potential_uses_for_agro-industrial_processes

Edison T, Martin J. 2012. Gelatin Hydrolysis Test Protocol. American Society for Microbiology. https://www.researchgate.net/profile/Hamza-Ettadili/post/How_to_perform_a_Gelatin_liquefaction_test_for_bacterial_cultures/attachment/6011ea9a8431b80001cbe2b3/AS%3A984719810387974%401611786906336/download/Gelatin+Hydro+Test+Edison+2012.pdf

Florencio C, Couri S, Sánchez C. 2012. Correlation between Agar Plate Screening and Solid-State Fermentation for the Prediction of Cellulase Production by *Trichoderma* Strains. *Enzyme Research*. 1 (1): 1-7. <https://downloads.hindawi.com/archive/2012/793708.pdf>

Fresenius GA. 1952. *Cladosporium cladosporioides*. <https://www.gbif.org/species/2620657>

Garcés K, Luna T. 2009. Análisis microbiológico de los bienes culturales en la iglesia de Guápulo. [Tesis pregrado] [Quito. Ecuador] Universidad Internacional SEK Ecuador.

García-Cortes A, García-Vásquez JA, Aranguren Y, Ramirez-Castrillon M. 2021. Pigment production improvement in *Rhodotorula mucilaginosa* AJB01 using design of experiment. *Microorganisms*. 9 (2): 387. <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/2/387>

Gómez S, Borrego S, Lavin P, Valdés O, Vivar, Battistoni P, Guiamet P. 2012. Productos ambientalmente amigables de origen vegetal empleados en el control de microorganismos intervinientes en el biodeterioro del Patrimonio Cultural. 7mo congreso de Medio Ambiente. La Plata, Argentina.

http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/repositorio/_documentos/sipcyt/bfa005006.pdf

Guerra Peñaloza MI. 2014. Inducción de la dormancia bacteriana por condiciones de inanición de carbono y bajas temperaturas. Repositorio Bibliotecas UdeC. <http://repositorio.udec.cl/jspui/handle/11594/5603>.

Hameed A, Saeed Y, Shakour A, Abdellatif N, Ibrahim Y, Elghanam M, Elwakeel F. 2020. Indoor air fungal pollution of a historical museum, Egypt, a case study. *Aerobiología*. 36: 197-209. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10453-019-09623-w.pdf>

Heyrman J, Logan NA, Busse HJ, Balcaen A, Lebbe L, Rodriguez-Diaz M, Swings J, De Vos P. 2003. *Virgibacillus carmonensis* sp. nov., *Virgibacillus necropolis* sp. nov. and *Virgibacillus picturae* sp. nov., three novel species isolated from deteriorated mural paintings, transfer of the species of the genus *Salibacillus* to *Virgibacillus*, as *Virgibacillus marismortui* comb. nov. and *Virgibacillus salexigens* comb. nov., and emended description of the genus *Virgibacillus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 53 (2): 501–511. <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=f013a53251e70b66ff4de9d4eb2797d71e6574ad>

Jijón y Caamaño J. 1949. Maranga: contribución al conocimiento de los aborígenes del Valle del Rímac, Perú. La Prensa Católica. Quito, Ecuador.

Llagostera A. 2005. Patrones de momificación chinchorro en las colecciones Uhle y Nielsen. *Chungará*. Arica. 25 (1): 5-22. https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-73562003000100002

Lumbreras L. 2014. Maranga: Estudios de Lima Prehispánica según Jacinto Jijón y Caamaño. 2da Edición. Ediciones Copé.

Magdy M, Ismail M, Issa Y, Abdel-Maksound G, Ibrahim M. 2020. An Analytical study for understanding the degradation process of a late period mummy. *Advanced Research in Conservation Science*. 1 (2).

https://journals.ekb.eg/article_131476_e52339deeaee263f493bb6a40a93575.pdf

Mansour M. 2018. Impact of the Storage conditions on biodegradation of Ancient Egyptian child mummies by xerophilic fungi. *Egyptian Journal of Archaeological and Restoration Studies*. 8 (2): 97-107. https://ejars.journals.ekb.eg/article_23501_fb6463909d6d800ba51858eee6b8bada.pdf

Martiny AC. 2019. High proportions of bacteria are culturable across major biomes. *The ISME journals*. 13(8): 2125–2128. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0410->

Ministerio de Cultura y Deporte. 2021. Biodeterioro. <https://ipce.culturaydeporte.gob.es/investigacion/conservacion-bienes-culturales/biodeterioro.html>

Moissidou D, Day J, Shin D, Bianucci R. 2015. Invasive versus Non-Invasive Methods Applied to Mummy Research: Will This Controversy Ever Be Solved? *BioMed Research International*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4543116/>

Moş AC, Pârvu M, Pârvu AE, Roşca-Casian O, Dina N, Leopold N, Silaghi-Dumitrescu R, Mircea C. 2017. Reversible naftifine-induced carotenoid depigmentation in *Rhodotorula mucilaginosa* (A. Jörg.) F.C. Harrison causing onychomycosis. *Sci Rep* 7, (11):1-25. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11600-7>

Naji KM, Abdullah QY, Al-Zaqri AQ, Alghalibi SM. 2014. Evaluating the biodeterioration enzymatic activities of fungal contamination isolated from some ancient Yemeni mummies preserved in the national museum. *Biochemistry research international*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4247924/>

Ordoñez M, Beckett R, Nelson A, Conlogue G. 2015. Paleoimagen y análisis bioantropológico de la colección Maranga del Museo Jacinto Jijón y Caamaño. *Antropología Cuadernos de Investigaci+on*. 15 (15): 62-79. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/7575941.pdf>

Peldrique de Aulacio M, De Castro N. 2008. Reproducción y crecimiento microbiano. *Universidad Central de Venezuela*. 08 (6): 1-22. http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_6_crecimiento.pdf

Piñar G, Kraková L, Pangallo D, Piombino-Mascali D, Maixner F, Zink A, Sterflinger K. 2014. Halophilic bacteria are colonizing the exhibition areas of the Capuchin Catacombs in Palermo, Italy. *Extremophiles*. 18: 677-691.

https://www.academia.edu/7407441/Halophilic_bacteria_are_colonizing_the_exhibition_areas_of_the_Capuchin_Catacombs_in_Palermo_Italy.

Piñar G, Piombino D, Maixner F, Zink A, Sterflinger K. 2013. Microbial survey of the mummies from the Capuchin Catacombs of Palermo, Italy: biodeterioration risk and contamination of the indoor air. *FEMS Microbiology Ecology*. 86, (2). <https://academic.oup.com/femsec/article/86/2/341/539931>

Poyatos-Jiménez F, Morales-Cabrera R, Cevallos-Paredes L, Freile C, Morales F. 2017. Estudio y análisis de los procesos de alteración por agentes microbiológicos en obras pictóricas sobre lienzo expuestas en claustros de conventos y monasterios del centro histórico de Quito, Ecuador. *La Ciencia y el Arte VI. Ciencias experimentales y conservación del patrimonio*. 292-303.

<https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/103733/Estudio%20y%20an%C3%A1lisis%20de%20los%20procesos%20de%20alteraci%C3%B3n.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Rajkowska K, Koziróg A, Otlewska A, Piotrowska M, Nowicka-Krawczyk P, Brycki B, Kunicka-Styczyńska A, Gutarowska B. 2016. Quaternary ammonium biocides as antimicrobial agents protecting historical wood and brick. *Acta Biochimica Polonica*. http://dx.doi.org/10.18388/abp.2015_1134.

Riverón-Acosta MB, Casartelli de Santa Inez D, Fujiwara Baleiro L, Tiyo Mano E, Ferreira da Silva L. 2017. Enzimas hidrolíticas (DNAsas, lipases e proteases) secretadas por *Cladosporium cladosporioides* aislado de solo e seu potencial de aplicação em biotecnología. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 37 (2). <https://ve.scielo.org/pdf/rsvm/v37n2/art06.pdf>

Samadelli M, Gregori G, Maixner F, Rossani M, Del Vesco P, Borla M, Paladin A, Wurst, C, Sterflinger K, Voigt C, et al. 2019. A first assessment of the conservation of the mummified human remains in the Museo Egizio in Turin in the framework of the “mummy conservation project”. *Rivista del Museo Egizio*. <https://rivista.museoegizio.it/article/a-first-assessment-of-the-conservation-of-the-mummified-human-remains-in-the-museo-egizio-in-turin-in-the-framework-of-the-mummy-conservation-project/#ref6>

Sanchis Solera J. 2019. LPT Neutralizing Broth. Laboratorios MacroKit. <https://www.microkit.es/fichas/LPT-NEUTRALIZINGBROTH-INCOLORO.pdf>

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74(12): 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>

Santos AF, Pires F, Jesus HE, Santos ALS, Peixoto R, Rosado AS, D'Avila-Levy CM, Branquinha MH. 2014. Detection of proteases from *Sporosarcina aquimarina* and *Algoriphagus antarcticus* isolated from Antarctic soil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 87 (1): 109-119. doi:10.1590/0001-3765201520130519. <https://www.scielo.br/j/aabc/a/SbmZg4m8jdVDYf9RgBRvVmm/?lang=en>.

Sharma R, Goshal G. 2019. Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC-1403) using agro-industrial waste in bioreactors: A statistical approach. *Biotechnol Rep (Amst)*. 5 (25): e00407. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6921150/>

Sterflinger K, Pinar G. 2013. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art--tilting at windmills? *Applied Microbiology Biotechnology*. 97 (2): 37-46. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3825568/#CR3>

Sun P, Gao J, Mao X, Zhao X, Sun J, Lu M. 2016. *Lentibacillus populi* sp. nov., a moderately halophilic, endophytic bacterium isolated from a poplar tree, and emended description of the genus *Lentibacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology*, 6 (12).

Tamura K, Stecher G, Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022-3027

Tieghem. 1867. *Aspergillus niger*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5061&lvl=3&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock

Uhle, M. 1944. *La momia peruana*. https://www.iai.spk-berlin.de/fileadmin/dokumentenbibliothek/Indiana/Indiana_3/IND_03_Uhle.pdf

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. 2017. Metabolismo bacteriano, identificación y taxonomía. <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/microgeneral/wp-content/uploads/2017/02/07-Metabolismo-Identificacion-y-taxonom%C3%ADa.pdf>

Valentín N, García M. 2012. Análisis y control del biodeterioro, A las plagas les gustan las momias. MOMIAS, manual para su buena práctica y conservación. Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Valentín N. 2003. Microbial contamination and insects infestation in organic materials. Coalition. 6. <http://www.rtphc.csic.es/issue6.htm>

Vázquez-Montoya EL, Castro-Ochoa LD, Maldonado-Mendoza IE, Luna-Suárez S, Castro-Martínez C. 2019. Residuo de moringa como inductor de la producción de celulasas y como fuente de hongos celulolíticos. *Revista Argentina de Microbiología*. 1 (52). http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412020000100004.

Vásquez-Domínguez A, Jaramillo-Valverde L, Levano KS, Novoa-Bellota P, Machaguay-Romero M, Garcia-de-la-Guarda R, Cano RJ, Solis RS, Guio H. 2020. Comparative Analysis of Gut Microbiome in Individuals of the Old Civilization of Caral-Supe Based on Data from 16S rRNA and ITS region. <http://dx.doi.org/10.1101/2020.04.24.060582>.

Zalar P, de Hoog GS, Schroers H-J, Crous PW, Groenewald JZ, Gunde-Cimerman N. 2007. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Stud Mycol*. 58: 157-183.

Zink A, Reischl U, Wolf H, Nerlich AG. 2000. Molecular Evidence of Bacteremia by Gastrointestinal Pathogenic Bacteria in an Infant Mummy from Ancient Egypt. *Arch Pathol Lab Med* 1. 124 (11): 1614–1618. doi: <https://doi.org/10.5858/2000-124-1614-MEOBBG>

Yoon JH, Lee KC, Weiss N, Kho YH, Kang KH, Park YH. 2001. *Sporosarcina aquimarina* sp. nov., a bacterium isolated from seawater in Korea, and transfer of *Bacillus globisporus* (Larkin and Stokes 1967), *Bacillus psychrophilus* (Nakamura 1984) and *Bacillus pasteurii* (Chester 1898) to the genus *Sporosarcina* as *Sporosarcina globispora* comb. nov., *Sporosarcina psychrophila* comb. nov. and *Sporosarcina pasteurii* comb. nov., and emended description of th. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 51(3): 1079–1086. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-1079>

Figuras



Figura 1. A. Fardo funerario completo con restos de individuo en interior (posiblemente momificado) (JC-AP-2305). A1. Zona abierta superior izquierda (textil degradado). A2. Zona abierta superior derecha (textil degradado). A3. Madera. A4. Cuerdas. A5. Zona abierta inferior (textil degradado). B. Vestigio humano momificado de individuo subadulto (JC-AP-2064). B1. Mejilla (Presencia de restos de textil) B2. Codo (Mancha café) B3. Unión cabeza-cuello (Presencia de colgajo de piel) B4. Antebrazo (Mancha negruzca) B5. Espalda (Presencia de agujeros) B6. Pie (Presencia de agujeros). Colección del Museo Jacinto Jijón y Caamaño del Centro Cultural de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Fotografía: Melanie Luna.

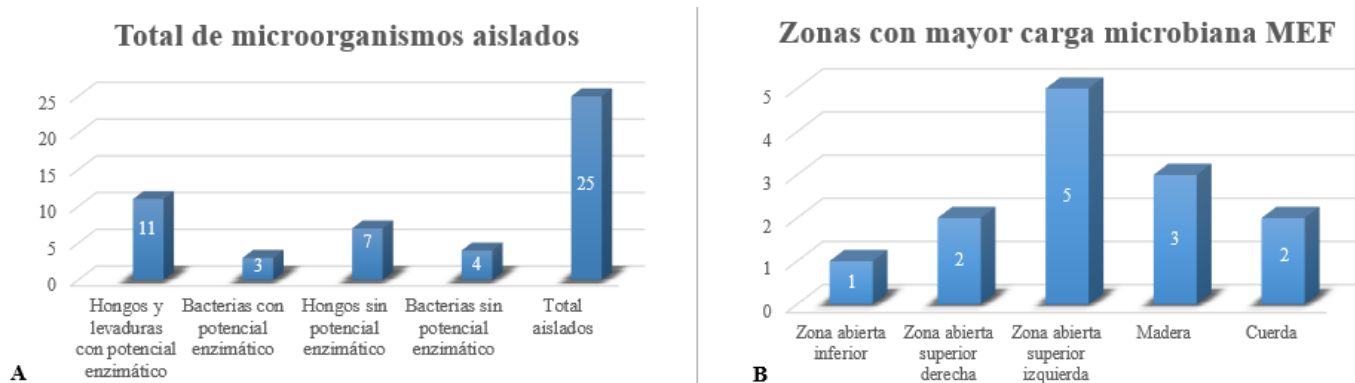


Figura 2. A. Gráfico de barras del total de microorganismos aislados en las dos momias muestreadas. B. Gráfico de barras de zonas con mayor carga microbiana en la momia envuelta en fardo funerario.

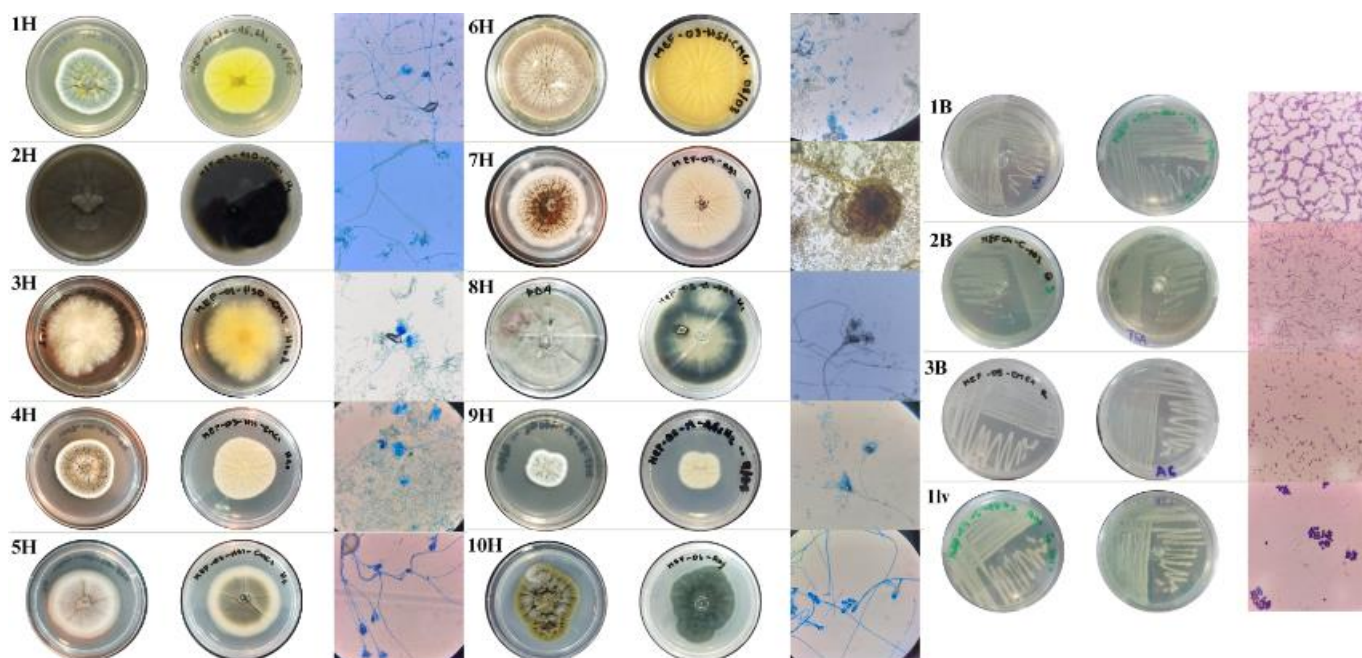


Figura 3. Imágenes de las características macroscópicas y microscópicas de las colonias aisladas.

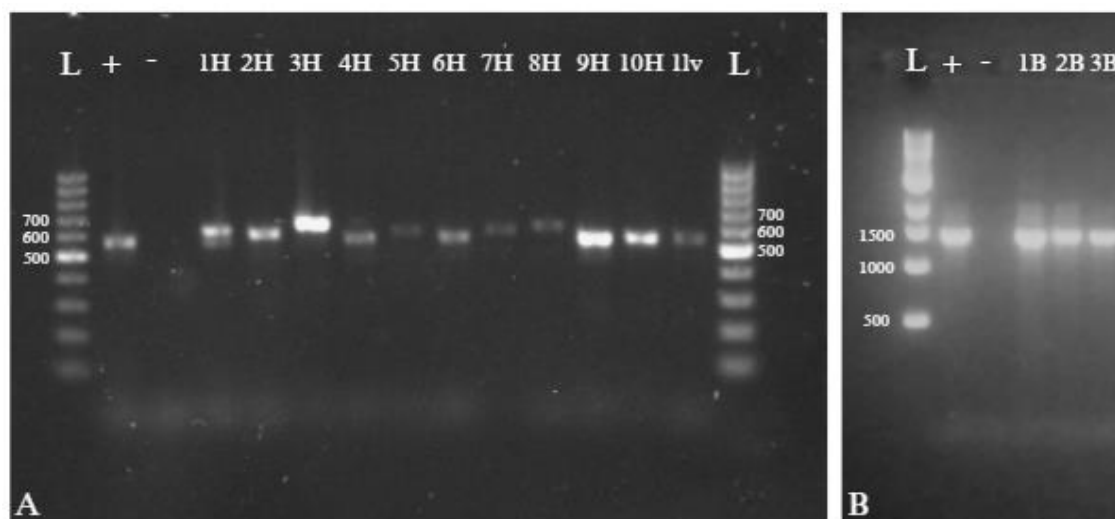


Figura 4. A. Electroforesis de hongos y levadura con una escalera molecular de 100 pb, con fragmentos desde 550 a 700pb. 1H y 9H amplificados con betaína al 0,5 M **B.** Electroforesis de bacterias con escalera molecular de 1kb, todos los fragmentos de 1500bp.

Tablas

Tabla 1. Índices de alta actividad enzimática microbiana.

| Tipo de microorganismo | Codificación | Proteolíticos | | | Amilolíticos | | | Celulolíticos | | |
|------------------------|----------------------|------------------------|-------------------|-------------------|------------------------|-------------------|-------------------|------------------------|-------------------|-------------------|
| | | Diámetro de la colonia | Diámetro del halo | Índice enzimático | Diámetro de la colonia | Diámetro del halo | Índice enzimático | Diámetro de la colonia | Diámetro del halo | Índice enzimático |
| Mohos | MEF-01-ZA-AG1-HA | 1,9 | 3 | 1,58 | 2,4 | 2,7 | 1,13 | 1,4 | 3 | 2,14 |
| | MEF-02-HSD-CMC1-H2 | 1,7 | 2,9 | 1,71 | 1,9 | 2,2 | 1,16 | 1,7 | 3,2 | 1,88 |
| | MEF-02-HSD-CMC2-H1.2 | 2 | 3,1 | 1,55 | 1,8 | 3 | 1,67 | 0 | 0 | Negativo |
| | MEF-03-HSI-CMC1-H1 | 1 | 2,7 | 2,70 | 0 | 0 | Negativo | 0,9 | 2,2 | 2,44 |
| | MEF-03-HSI-CMC1-H2 | 1,1 | 2 | 1,82 | 1,5 | 2 | 1,33 | 1 | 2,9 | 2,90 |
| | MEF-03-HSI-AG-H1 | 1,8 | 3,2 | 1,78 | 1,9 | 2,4 | 1,26 | 1 | 3 | 3,00 |
| | MEF-03-HSI-AG2-R | 0 | 0 | Negativo | 1,1 | 1,5 | 1,36 | 0,8 | 1,6 | 2,00 |
| | MEF-05-M-AG2-H1 | 2 | 3 | 1,50 | 2,3 | 2,5 | 1,09 | 1,5 | 3,5 | 2,33 |
| | MEF-05-M-AG2-H2 | 2 | 3,2 | 1,60 | 2,1 | 2,7 | 1,29 | 1,5 | 2,7 | 1,80 |
| | MSF-06-CC-AG1-R | 0 | 0 | Negativo | 0 | 0 | Negativo | 1 | 2,9 | 2,90 |
| Levadura | MEF-04-C-PDA2-AH1 | 0,7 | 1,3 | 1,86 | 0 | 0 | Negativo | 0 | 0 | Negativo |
| Bacterias | MEF-03-HSI-AA2-AB1 | 1,2 | 2,3 | 1,92 | 0 | 0 | Negativo | 0,7 | 1,5 | 2,14 |
| | MEF-04-C-AG2-B | 1,5 | 2,5 | 1,67 | 0,7 | 1,7 | 2,43 | 0 | 0 | Negativo |
| | MEF-05-CMC1-R | 0,7 | 1,5 | 2,14 | 0 | 0 | Negativo | 0 | 0 | Negativo |

Tabla 2. Identificación macroscópica, microscópica y molecular de los microorganismos aislados

| Codificación | Característica de la colonia | Color anverso | Color reverso | Microscopía | Identificación molecular | Base de datos | Porcentaje de similitud |
|----------------------|---|--|---|--|-------------------------------------|------------------------|-------------------------|
| MEF-01-ZA-AG1-HA | Colonia circular, bordes irregular y aterciopelada, presencia de exudado amarillo | Verde con borde blanco | Amarillo con borde crema | Hifas septadas con conidios ramificados, biverticilados conidios unicelulares y redondas | <i>Penicillium rubens</i> | Mycobank | 100% |
| MEF-02-HSD-CMC1-H2 | Colonia circular, irregular, aterciopelada | Café | Café negruzco con borde café claro | Hifas dematáceas y cenocíticas, conidióforos ramificados a manera de árbol | <i>Dentocorticium portoricense</i> | BLASTN | 100% |
| MEF-02-HSD-CMC2-H1.2 | Colonia circular, irregular y algodonosa | Blanco | Amarillo | Hifas hialinas, septadas y ramificadas, con conidios unicelulares elipsoides y esféricos | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | BLASTN | 100% |
| MEF-03-HSI-CMC1-H1 | Colonia irregular, aterciopelada, productora de exudado | Verde claro con centro y borde blancos | Blanco crema | Hifas septadas con conidios ramificados y triverticilados, con conidias esféricas | <i>Penicillium brevicompactum</i> | Mycobank | 100% |
| MEF-03-HSI-CMC1-H2 | Colonia circular, regular, aterciopelada | Blanco grisaseo | Café amarillento con borde blanco crema | Hifas hialinas, septadas y ramificadas biverticiladas, con conidios unicelulares elipsoides | <i>Cladosporium tenuissimum</i> | Mycobank | 100% |
| MEF-03-HSI-AG-H1 | Colonia circular, regular, porvosa | Café claro con borde café oscuro | Blanco crema | Hifas septadas con conidios ramificados y triverticilados, con conidias esféricas | <i>Penicillium brevicompactum</i> | Mycobank | 100% |
| MEF-03-HSI-AG2-R | Colonia circular, regular, algodonosa | Blanco con centro negro | Blanco | Hifas hialinas, con cabeza y vesícula globosa | <i>Aspergillus niger</i> | BLASTN | 100% |
| MEF-05-M-AG2-H1 | Colonia circular, regular, aterciopelada | Gris | Café negruzco con centro blanco | Hifas dematáceas, con conidios ramificados a manera de árbol | <i>Cladosporium asperulatum</i> | Mycobank | 100% |
| MEF-05-M-AG2-H2 | Colonia circular, regular, aterciopelada y polvosa | Gris verdoso | Blanco crema | Hifas hialinas, septadas y ramificadas, con conidios unicelulares elipsoides | <i>Cladosporium delicatulum</i> | Mycobank | 100% |
| MSF-06-CC-AG1-R | Colonia irregular, elevada a forma de cráter | Gris verdoso con borde verde olivo | Negro | Hifas hialinas, septadas y ramificadas, con conidios unicelulares elipsoides | <i>Cladosporium halotorelant</i> | Mycobank | 100% |
| MEF-04-C-PDA2-AH1 | Colonia irregular, rugosa, elevada y seca | Blanco crema | Blanco crema | Células levaduriformes, Gram positivas, individuales | <i>Rhodotorula</i> sp. | BLASTN, Mycobank y ENA | 96,94% |
| MEF-03-HSI-AA2-AB1 | Colonia circular, regular, lisa, plana y opaca | Blanco | Blanco | Bacilos cortos, individuales y en parejas, Gram positiva | <i>Lentibacillus populi</i> | EzBiocloud | 99,78% |
| MEF-04-C-AG2-B | Colonia puntiforme con bordes regulares, plana y transparentosa | Blanco transparentoso | Blanco transparentoso | Bacilos largos, en cadenas, Gram positivos | <i>Virgibacillus carmonensis</i> | EzBiocloud | 98,76% |
| MEF-05-CMC1-R | Colonias circulares, con bordes irregulares, cremosas y elevadas | Blanco | Blanco crema | Bacilos en forma de bastón, con esporas terminales y subterminales, individuales, parejas y tétradas, Gram positivos | <i>Sporosarcina aquimarina</i> | BLASTN | 99%+C1C4J19 |

Hoja de firmas

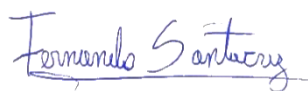
Firma del (la) estudiante y fecha:



Melanie Alejandra Luna Zapata

Quito, 15 de junio de 2023

Firma del director (a) de disertación y fecha:



MSc. Fernando Rene Santacruz Flores

Quito, 16 de junio de 2023


Firma del coordinador (a) de la carrera y fecha:

Mgr. Sonia Margarita Estrella Vásquez

Quito, de junio de 2023

Anexos.

Anexo 1. Acta de compromiso de uso de imágenes de bienes culturales



Centro Cultural

Av. 12 de Octubre 1076 y Ramón Roca
Apartado postal 17-01 2184
Telf.: (593) 2 299 17 00 ext. 1557
Quito - Ecuador www.puce.edu.ec

ACTA DE COMPROMISO DE USO DE IMÁGENES DE BIENES CULTURALES

En la ciudad de Quito, a los seis (6) días del mes de junio del 2023, suscriben la presente Acta de compromiso:

1. Intervinientes:
Suscriben la presente Acta de compromiso:

- El Centro Cultural representado por Francisco Arrieta, director del Centro Cultural.
- Melanie Alejandra Luna Zapata, estudiante de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

2. Antecedentes:

- Con fecha 8 de febrero de 2023, la escuela de Microbiología se encuentra realizando análisis de microorganismos presentes en la colección del Museo Jacinto Jijón y Caamaño, con especial énfasis en restos humanos momificados, el grupo de estudio está integrado por MSc. Fernando Santacruz, docente, y las estudiantes Melanie Luna y Emilia Montenegro.
- Con fecha 5 de junio de 2023, Melanie Luna solicita, mediante correo electrónico, el uso de imagen de dos vestigios culturales arqueológicos del museo Jacinto Jijón y Caamaño para ser reproducidas en su disertación de grado titulada "Evaluación microbiológica de biodeterioro en momias de Maranga del Centro Cultural-PUCE" en formato de artículo científico, esta solicitud incluye el uso de la misma en su presentación de defenza oral en formato póster.


3. Objeto:
Autorizar el uso de dos (2) imágenes fotográficas de dos vestigios culturales arqueológicos pertenecientes a la colección del Museo Jacinto Jijón y Caamaño, especificadas en el inciso 6 del presente documento, en la disertación de grado titulada "Evaluación microbiológica de biodeterioro en momias de Maranga del Centro Cultural-PUCE"

4. Obligaciones:
El Museo Jacinto Jijón y Caamaño se compromete a:

- Facilitar el acceso a los restos momificados parte de la colección del Museo Jacinto Jijón y Caamaño para la toma de muestras y el análisis de microorganismos, así como permitir el uso de las fotografías obtenidas durante la investigación.

Melanie Luna se compromete a:

- Reconocer los derechos del Museo Jacinto Jijón y Caamaño como parte del Centro Cultural de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador en la mención de estos vestigios culturales.





Centro Cultural

Av. 12 de Octubre 1076 y Ramón Roca
 Apartado postal 17-01-2184
 Telf: (593) 2 299 1700 ext. 1557
 Quito - Ecuador www.puce.edu.ec

- Entregar dos ejemplares de la publicación al Museo Jacinto Jijón y Caamaño del Centro Cultural de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, tanto en formato digital como físico (de acuerdo corresponda).
- Entregar las imágenes digitales tomadas de los vestigios arqueológicos del museo.
- Incorporar en la publicación, los créditos correspondientes.
 En los créditos debe constar, los siguientes campos, acorde al inciso 6:

Denominación:

Código:

Colección del Museo Jacinto Jijón y Caamaño del Centro Cultural de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Fotografía: Byron Lucero, profesional del museo

- Emplear las imágenes obtenidas **únicamente** en el mencionado objeto de esta acta. En caso de requerirlas para otros usos (publicaciones no detalladas, conferencias, conversatorios, artículos, etc.) se solicitará nuevamente el permiso al Museo Jacinto Jijón y Caamaño y al Centro Cultural.

5. Aceptación de las partes

Las partes declaran expresamente su aceptación al contenido del presente documento, y, por tanto, en unidad de acto firman el Acta en dos ejemplares de igual contenido y valor.

6. Listado de bienes

| No. | Denominación | Código |
|-----|--|------------|
| 1. | Fardo funerario completo con restos de individuo en interior (posiblemente momificado) | JC-AP-2305 |
| 2. | Vestigio humano momificado de individuo subadulto | JC-AP-2064 |

Suscriben la presente acta:

Francisco Arrieta
 Director
 Centro Cultural

Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Melanie Alejandra Luna Zapata
 Estudiante
 Carrera de Microbiología

Pontificia Universidad Católica del Ecuador