

ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN PINTURA SOBRE TELA

TRABAJO DE FIN DE GRADO (TFG)

.....
GRADO EN CONSERVACIÓN Y RESTAURACIÓN DE BIENES CULTURALES

.....
FACULTAD DE BELLAS ARTES

.....
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

.....
CURSO ACADÉMICO 2018-2019



NATALIA PULIDO OJEDA

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a Elisa Díaz González la dedicación y la supervisión constante durante todo el proceso del trabajo. Gracias también a Mario González Carracedo por haber sabido transmitirme tanta información nueva para mí con tanta paciencia.

A Alba Fuentes Porto, técnico del Servicio de Análisis y Documentación de Obras de Arte, por enseñarme todo lo que sé del análisis multiespectral.

Gracias a toda mi familia y amigos por el apoyo durante todos estos meses. Y especial agradecimiento a mi abuela Nani por hacer posible la realización de este trabajo de fin de grado prestándome tres cuadros tan queridos en casa.

RESUMEN

El análisis del biodeterioro y la identificación de las especies que degradan una obra es la base en la que debemos apoyarnos los restauradores y restauradoras para abordar la elección de un tratamiento de desinfección para cada obra.

En el presente trabajo se lleva a cabo un estudio del biodeterioro en general, y del efecto de los hongos sobre la tela en particular. Además, se realiza el análisis con imagen multiespectral y microscopio digital del biodeterioro presente en tres pinturas sobre tela. El estudio concluye con la identificación de las especies presentes en cada supuesto mediante técnicas de identificación molecular.

PALABRAS CLAVE

Biodeterioro, hongos en pintura sobre tela, análisis multiespectral, microscopio digital, identificación molecular de especies.

ABSTRACT

The analysis of the biodeterioration and the identification of the species that degrade an artwork is the base upon which restorers must utilize in order to decide an specific treatment for each artwork.

In the present work a study of biodeterioration in general, and the effect of fungi on the paintings in particular is carried out. In addition, the multispectral photography and digital microscope analysis of the biodeterioration present in three paintings on canvas is performed, and then the identification of the species present in each case is concluded by means of molecular identification techniques.

KEY WORDS

Biodeterioration, fungi on paintings, multispectral análisis, digital microscope, molecular identification of species.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO GENERAL	2
2.1. JUSTIFICACIÓN	2
2.2. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	2
2.3. REFERENTES	3
2.4. METODOLOGÍA	3
2.5. CRONOGRAMA.....	5
3. CUERPO DEL TRABAJO	6
3.1. PRESENTACIÓN DE LAS OBRAS Y ANTECEDENTES	6
3.2. EL BIODETERIORO	10
3.2.1. <i>Factores influyentes en la aparición de biodeterioro</i>	10
3.2.1.1. Factores edáficos.....	11
3.2.1.2. Factores ambientales	12
3.2.1.2.1. Agua.....	12
3.2.1.2.2. Temperatura.....	13
3.2.1.2.3. Luz.....	14
3.2.1.2.4. Viento	15
3.2.1.2.5. Contaminantes	15
3.2.2. <i>Microorganismos deteriorantes de los tejidos</i>	16
3.2.2.1. Tejidos vegetales	16
3.2.2.2. Tejidos animales	17
3.2.3. <i>Los hongos</i>	17
3.2.3.1. Morfología y estructura básica.....	18
3.2.3.2. Reproducción	19
3.2.3.3. Nutrición y metabolismo	19
3.2.4. <i>Biodeterioro causado por hongos en pintura sobre tela</i>	20
3.3. ANÁLISIS MULTIESPECTRAL EN PINTURA.....	22
3.3.1. <i>Reflectografía infrarroja</i>	23
3.3.2. <i>Fluorescencia ultravioleta</i>	23
3.3.3. <i>Reflectografía ultravioleta</i>	24
3.4. EXPERIMENTACIÓN PRÁCTICA.....	26
3.4.1. <i>Estudio por imagen</i>	26
3.4.1.1. Supuesto 1.....	26
3.4.1.2. Supuesto 2.....	32
3.4.1.3. Supuesto 3.....	37
3.4.2. <i>Identificación molecular de especies</i>	43

3.4.2.1.	Toma de muestras y cultivos	43
3.4.2.2.	Extracción de ADN y electroforesis	48
3.4.2.3.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis	50
3.4.2.4.	Secuenciación Sanger	52
3.4.2.5.	Análisis de las secuencias	52
3.4.3.	<i>Resultados</i>	55
4.	CONCLUSIONES	58
5.	BIBLIOGRAFÍA	60
6.	ANEXOS	61
	ANEXO 1. IMÁGENES GENERALES SUPUESTO 1.....	62
	ANEXO 2. IMÁGENES DE DETALLE SUPUESTO 1	66
	ANEXO 3. FOTOGRAFÍAS CON MICROSCOPIO DIGITAL SUPUESTO 1.....	73
	ANEXO 4. IMÁGENES GENERALES SUPUESTO 2.....	80
	ANEXO 5. IMÁGENES DE DETALLE SUPUESTO 2	84
	ANEXO 6. FOTOGRAFÍAS CON MICROSCOPIO DIGITAL SUPUESTO 2.....	91
	ANEXO 7. IMÁGENES GENERALES SUPUESTO 3.....	98
	ANEXO 8. IMÁGENES DE DETALLES SUPUESTO 3.....	102
	ANEXO 9. FOTOGRAFÍAS CON MICROSCOPIO DIGITAL SUPUESTO 3.....	112
	ANEXO 10. SECUENCIAS OBTENIDAS PARA CADA UNA DE LAS MUESTRAS. ALINEAMIENTOS Y SECUENCIAS CONSENSO UTILIZADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES.....	124
	ANEXO 11. RESULTADOS DE LA BÚSQUEDA EN BASES DE DATOS BOLD Y NCBI.....	132

1. INTRODUCCIÓN

El análisis de las obras y de sus factores de deterioro antes de su intervención es una parte fundamental en el proceso de restauración, siendo necesaria en muchos de los casos la realización de pruebas específicas para la identificación del agente de deterioro presente. Por este motivo, este trabajo busca defender la realización de análisis previos, tanto invasivos como no invasivos, en los casos concretos en los que el agente de deterioro es un microorganismo.

Los microorganismos que degradan con más frecuencia las obras de arte y en concreto las obras de soporte textil son los hongos y las bacterias. Estos seres vivos son difíciles de diferenciar directamente sobre la obra, presentándose en ocasiones contemporáneamente. Por ello, en este trabajo se utiliza el análisis multiespectral para determinar la zona en la que se extiende el biodeterioro, y técnicas de identificación molecular de especies para diferenciar las especies presentes en tres óleos sobre tela de una colección particular.

El análisis multiespectral ha permitido determinar la presencia y la extensión del biodeterioro a través del análisis de las imágenes obtenidas en los espectros visible, infrarrojo y ultravioleta gracias a dos equipos diferentes: el equipo multiespectral ARTIST y la cámara multiespectral FUJIFILM. Además, se ha completado el estudio con microscopía óptica digital (DINOLITE).

La identificación molecular de especies se llevó a cabo con el objetivo de conocer qué microorganismos concretos se encuentran en cada obra, para así poder determinar qué tratamiento ha de realizarse en cada obra dependiendo de las especies presentes, evitando de este modo realizar tratamientos generalizados que no aseguren la eliminación del agente de biodeterioro.

2. PLANTEAMIENTO GENERAL

2.1. JUSTIFICACIÓN

La aparición de biodeterioro en bienes de interés cultural es un problema muy frecuente para el que todavía no se han establecido metodologías específicas que demuestren una efectividad total. Por el contrario, suelen llevarse a cabo tratamientos generales para todo el conjunto sin tener en cuenta las especies presentes, suponiendo dichos tratamientos un estrés para la obra que en muchas ocasiones no comporta la solución del problema. Además, en el caso de microorganismos como hongos y bacterias, no siempre resulta posible la diferenciación entre uno y otro sin la realización de análisis específicos de identificación de especies. Por tanto, si no se llevaran a cabo estos análisis podría quedar en la obra un agente de biodeterioro que no se ha tenido en cuenta, y que continuará degradando la obra, aunque se haya conseguido detener el otro.

Así, este trabajo de fin de grado defiende, en primer lugar, la utilización del análisis multiespectral para determinar la presencia y extensión del biodeterioro en obras de pintura. Y, en segundo lugar, se defiende la colaboración con especialistas microbiólogos y genetistas para la identificación de especies a través de técnicas de identificación molecular.

2.2. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

El objetivo general de este trabajo es la identificación de las especies de hongos presentes en tres obras de pintura sobre tela mediante técnicas de biología molecular.

Los objetivos específicos, por otra parte, son:

- La aplicación del análisis multiespectral para confirmar la presencia de biodeterioro y determinar el alcance de la infección.
- La presentación de los procesos necesarios para la identificación molecular de una especie, con el objetivo de dar a conocer estas técnicas de laboratorio que tenemos a disposición los restauradores.

- Por último, la defensa de la interdisciplinariedad en los procesos de conservación y restauración de obras de arte. Esto ayudará a la elección y justificación de la metodología empleada favoreciendo mejores resultados en los tratamientos de desinfección.

2.3. REFERENTES

Las fuentes de información utilizadas, principalmente, han sido *Biología aplicada a la conservación y restauración*, de Violeta Valgañón, y *La biología en la restauración*, de Giulia Caneva, Maria Pia Nugari y Ornella Salvadori. También ha sido importante la información proporcionada por el manual *Ciencia y restauración*, de Mauro Matteini y Arcangelo Moles.

2.4. METODOLOGÍA

La realización del trabajo tiene inicio con la elección de tres obras pertenecientes a una colección particular debido a la eventual presencia de biodeterioro en ellas. Las tres tienen en común que fueron pintadas por el mismo autor y sobre soportes de tela.

La búsqueda documental ha consistido en el estudio de las obras elegidas, de los aspectos relacionados con el biodeterioro de las obras de arte, en concreto de los soportes de tela, y de las aplicaciones del análisis multiespectral. En primer lugar, se estudiaron los factores que influyen en la aparición del biodeterioro y los organismos que degradan los soportes de tela. Posteriormente, y puesto que el objetivo del trabajo es identificar las especies de hongos presentes, se trataron de manera específica las características de dichos microorganismos y su acción sobre soportes de tela. Por último, se llevó a cabo un estudio de las aplicaciones de la fotografía multiespectral en el análisis de obras de arte para comprender la utilidad de cada uno de los espectros y la información que aportan en los casos de degradación biológica. Para ello, se han utilizado fuentes bibliográficas y el acceso a revistas especializadas.

La experimentación práctica se ha llevado a cabo en tres fases consecutivas: análisis multiespectral, análisis con microscopio digital e identificación molecular de especies. El objetivo del análisis multiespectral era determinar la presencia y extensión del

biodeterioro, para lo que se utilizaron dos equipos para dos tipos de fotografía diferentes:

- El sistema multiespectral ARTIST permite obtener imágenes de elevada resolución, sin distorsión y sin ruido. Este equipo permitió realizar las fotografías de detalle debido a la facilidad para cambiar de espectro electromagnético sin mover el escáner, puesto que el cambio se realiza desde un software específico del sistema ARTIST. Así, se tomaron fotografías de cada detalle como reflectografía ultravioleta, reflectografía visible, fluorescencia ultravioleta y reflectografía infrarroja 1 y 2.
- La cámara FUJIFILM X-T1 es una cámara multiespectral, lo que significa que su sensor es capaz de captar todas las bandas del espectro electromagnético. Para hacer posible la captura de una sola banda, se incorporan filtros que bloquean las demás radiaciones. Con este equipo se llevaron a cabo las tomas generales, puesto que el sistema ARTIST no permite la realización de fotografías generales salvo a partir de la composición de un mosaico, que es más lento y da peores resultados. Para cada fotografía general se utilizó la reflectografía visible, la fluorescencia ultravioleta, la reflectografía ultravioleta y la reflectografía infrarroja.

El análisis microscópico de las obras se realizó con los microscopios digitales Dino-Lite, que permiten realizar un examen de las obras con luz visible, ultravioleta o infrarroja, aunque en este caso solo se ha llevado a cabo el examen con luz visible. Además, estos microscopios aportan dos aumentos diferentes según la distancia a la que se encuentren de la obra. En este caso las fotografías realizadas siempre serán de 60x o 210x.

Por último, para la comprensión de la identificación molecular de las especies asistí a dos cursos impartidos en el Servicio de Genómica de los Servicios Generales de Apoyo a la Investigación (SEGAI) de la Universidad de La Laguna: *Introducción a la biología molecular: Extracción de ADN, electroforesis y PCR* e *Introducción a la secuenciación de ADN: Secuenciación Sanger y análisis de secuencias*. Después de la participación en dichos cursos, se llevó a cabo todo el proceso estudiado: toma de muestras, cultivos, extracción de ADN, reacción en cadena de la polimerasa, electroforesis, secuenciación Sanger y análisis de los resultados.

2.5. CRONOGRAMA

	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio
Elegir y acotar el tema						
Buscar y organizar la información						
Redactar el índice y escoger el título						
Definir objetivo						
Redactar marco teórico y metodológico						
Desarrollo y ejecución						
Análisis de los resultados						
Redacción						
Revisión						
Corrección						
Preparación de la defensa						

3. CUERPO DEL TRABAJO

3.1. PRESENTACIÓN DE LAS OBRAS Y ANTECEDENTES

Las obras seleccionadas para el estudio fueron todas pintadas por el mismo autor, Fernando Julio Ojeda Artiles, aunque en distintos momentos de su vida.

El autor de los cuadros falleció en el año 2010 y, desde entonces, algunas de sus obras se conservan en casa de su mujer colgadas en las paredes de una de las habitaciones en homenaje a su obra. Una de las obras (a la que llamaremos Supuesto 1 para poder identificarla a lo largo del trabajo) data del año 1966, mientras que los Supuestos 2 y 3 que forman parte de una misma serie, datan ambos del 2008. Los Supuestos 2 y 3 forman parte de los cuadros expuestos, mientras que el Supuesto 1 quedó almacenado en la habitación de la azotea del edificio, que pertenece también a su esposa.

En septiembre de 2018, el techo, y por consecuencia las paredes de la habitación en la que se encontraban los Supuestos 1 y 2 sufrieron filtraciones provenientes de la azotea, que se encuentra justo encima, hasta provocar una inundación del suelo de 1 cm. Ese día lo único que se hizo fue retirar el agua del piso, y aproximadamente 3 días después se descolgaron los cuadros del muro. Fue entonces cuando la propietaria se percató del ataque biodeteriógico y, automáticamente, colocó los cuadros en la habitación de la azotea en la que se encontraba el Supuesto 1.

La exposición directa al agua de las filtraciones provocó un aumento no solo de la humedad relativa del aire, sino que además comportó la absorción de la misma por parte de los soportes de los Supuestos 2 y 3. La humedad y la retención de agua, unido a la temperatura, de entre 23 y 25 °C en septiembre en la ciudad de Las Palmas de Gran Canaria, suponen las condiciones ideales para el desarrollo de hongos y bacterias.

Por otra parte, el Supuesto 1, como se ha comentado, se encontraba desde hace aproximadamente ocho años en una habitación que da directamente al exterior a través de una puerta y una ventana, que suele estar siempre abierta para ventilar la estancia. Debido a su orientación hacia el este, el sol calienta todos los días la habitación y, puesto que la ventana normalmente se encuentra abierta y el mar está relativamente cerca, los porcentajes de humedad también son elevados. En definitiva, también en el caso de esta

obra no es de extrañar la aparición de microorganismos, puesto que las condiciones ambientales son favorables para su desarrollo.

A continuación se añaden fichas identificativas de las tres obras seleccionadas.



Título	Supuesto 1
Autor	Fernando Julio Ojeda Artilles
Cronología	1966
Técnica	Óleo sobre tela pegada a cartón gris
Dimensiones	48,4 x 39,4 cm
Firma	Sí
Descripción	Figura femenina desnuda sentada en el suelo con las rodillas dobladas y las manos y a la cabeza apoyadas sobre las rodillas
Procedencia	Barrio de Vegueta, Las Palmas de Gran Canaria

Estado de conservación Bueno

Tabla 1. Ficha técnica del Supuesto 1.



Título	Supuesto 2
Autor	Fernando Julio Ojeda Artiles
Cronología	
Técnica	Óleo sobre lienzo
Dimensiones	x cm
Firma	No
Descripción	Autorretrato con la cabeza agachada y la mano abierta a modo de saludo
Procedencia	Barrio de Vegueta, Las Palmas de Gran Canaria
Estado de conservación	Bueno

Tabla 2. Ficha técnica del Supuesto 2.



Título	Supuesto 3
Autor	Fernando Julio Ojeda Artilles
Cronología	
Técnica	Óleo sobre lienzo
Dimensiones	48,4 x 39,4 cm
Firma	No
Descripción	Autorretrato con el brazo levantado a la altura de la cabeza y con el puño cerrado
Procedencia	Barrio de Vegueta, Las Palmas de Gran Canaria
Estado de conservación	Bueno

Tabla 3. Ficha técnica del Supuesto 3.

3.2. EL BIODETERIORO

Se entiende como biodeterioro del patrimonio a “una alteración irreversible de los materiales que lo constituyen, debido a la actividad metabólica de una o más poblaciones de microorganismos u organismos vivos pertenecientes a distintos grupos sistemáticos”¹.

El biodeterioro está condicionado por los factores ambientales que rodean la obra y por los propios materiales que la forman. Los factores ambientales pueden suponer condiciones limitantes para el desarrollo de ciertos organismos, cuyo desarrollo y supervivencia dependen de unas condiciones determinadas de humedad, temperatura, luz, etc. Los componentes de la obra, por su parte, determinarán qué tipo de organismos serán los que la atacan según su grupo de nutrición.

Las condiciones ambientales, los componentes de la obra y los organismos que la atacan determinarán un mecanismo de degradación que podrá ser físico o químico, y que en muchas ocasiones se producen simultáneamente. Además, el desarrollo de un ataque biológico crea habitualmente condiciones favorables para el desarrollo de otros agentes biodeteriógicos.

En este apartado se tratarán cuestiones generales como las condiciones necesarias para la aparición de biodeterioro y los organismos biodeteriógicos más comunes en pintura sobre tela; así como cuestiones más específicas como las características principales de los hongos y el efecto de los mismos en pintura sobre tela.

3.2.1. FACTORES INFLUYENTES EN LA APARICIÓN DE BIODETERIORO

El crecimiento del biodeterioro viene determinado por los factores intrínsecos y extrínsecos a la obra, también llamados factores edáficos y atmosféricos, respectivamente.

¹ Instituto Andaluz de Patrimonio Histórico. (2019). *Biodeterioro del patrimonio cultural* [en línea]. Sevilla: Consejería de Cultura y Patrimonio Histórico. [13/06/19] Disponible en: https://www.iaph.es/web/canales/Ciencias_Experimentales_y_Patrimonio_Cultural/biologia/biodeterioro/index.html

En este apartado se tratarán de explicar dichos factores, con el objetivo de comprender cuáles son las condiciones que provocan la aparición de biodeterioro en los bienes culturales. Además, estos factores son importantes no solo para el desarrollo de los agentes biodeteriogenos, sino también para el control de los mismos. De esta forma, si se adquiere un conocimiento de las condiciones que favorecen su desarrollo, será posible tomar decisiones coherentes para frenarlo.

3.2.1.1. FACTORES EDÁFICOS

Los factores edáficos son los que hacen referencia a la estructura de la obra, es decir, los materiales constituyentes, los aplicados en las intervenciones de restauración y los depósitos superficiales². Para comprender la relación entre los agentes biodeteriogenos y los materiales que constituyen la obra, es importante tener en cuenta las características de cada uno.

En líneas generales, la materia puede ser dividida en orgánica e inorgánica, y ambos tipos pueden formar parte de un bien cultural. Se consideran materiales orgánicos aquellos que presentan carbono hidrogenado en su composición, mientras que los materiales inorgánicos son aquellos que no presentan nada de carbono hidrogenado.³

Los seres vivos, por su parte, pueden ser divididos según su forma de alimentación en organismos autótrofos o heterótrofos. Los organismos autótrofos son aquellos capaces de producir su propio alimento tomando sustancias inorgánicas y convirtiéndolas en orgánicas; mientras que los organismos heterótrofos no pueden fabricar sus propios alimentos, por lo que se alimenta de compuestos orgánicos, principalmente de materia animal o vegetal.

Así, dependiendo de los materiales por los que esté constituida la obra, será más propensa a sufrir un ataque de organismos autótrofos o heterótrofos, ya que los

² Guillén Brufal, N. (2012). *Estudio comparativo de las metodologías de aplicación de sustancias fungicidas en los soportes de pintura sobre lienzo* (Trabajo Final de Máster). Universitat politècnica de València.

³ Caneva, G., Nugari, M. P., Salvadori, O. (2000). *La biología en la restauración*. Hondarribia (Guipuzcoa): Nerea, p. 23.

segundos necesitan componentes orgánicos para sobrevivir, mientras que los primeros se sirven de las sustancias inorgánicas para producir su propio alimento.⁴

3.2.1.2. FACTORES AMBIENTALES

Las condiciones ambientales que rodean las obras son un condicionante fundamental de su estado de conservación. Los factores más determinantes son el agua, la temperatura, la luz, el viento y los contaminantes. Estos factores se combinan entre sí, haciendo que sea difícil en algunos casos determinar un solo agente desencadenante.⁵

Concretamente, el crecimiento biológico depende en gran medida de los parámetros climáticos, puesto que cada tipo de organismo necesita unas condiciones ambientales concretas para su desarrollo. Por tanto, si estos factores se encuentran por debajo o por encima de las necesidades del organismo, los factores ambientales serán un factor limitante para su desarrollo.⁶ Por regla general, las zonas cálido-húmedas favorecen el crecimiento biológico, mientras que las zonas frías o áridas se presentan desfavorables.⁷

3.2.1.2.1. AGUA

El agua puede ser considerada un factor intrínseco o extrínseco, puesto que no solo se encuentra en el ambiente que rodea las obras, sino que es un componente fundamental de la composición de los materiales que la forman. Además, los materiales higroscópicos tienen la capacidad de absorber y perder agua dependiendo de la humedad y la temperatura del ambiente.

La susceptibilidad de los materiales a presentar un ataque biológico debido a la humedad depende de las características higroscópicas de los materiales. Los materiales orgánicos son, por norma general, más higroscópicos que los inorgánicos, lo que provoca en los casos de HR alta (entre el 65 % y el 70%) una mayor probabilidad de que

⁴ Valgañón, V. (2008) *Biología aplicada a la conservación y restauración*. Madrid: Síntesis, p. 82.

⁵ Valgañón, V. *Ibid.*, p. 85.

⁶ Guillén Brufal, N. Op. Cit.

⁷ Caneva, G., Nugari, M. P., Salvadori, O. Op. Cit., p. 33.

estos presenten biodeterioro, puesto que la mayoría de los organismos precisan de unas condiciones de HR medias-altas.

La humedad no provoca únicamente ataques biodeteriográficos, sino que también representa un agente de deterioro por sí mismo, puesto que, una humedad relativa alta puede causar alteraciones químicas de los materiales constituyentes de las obras. Además, los cambios bruscos de humedad provocan movimientos en los materiales higroscópicos debido a la absorción y la pérdida de agua, que hace que se dilaten y se contraigan, causando daños físicos de tamaño y forma.⁸

3.2.1.2.2. TEMPERATURA

La temperatura es una magnitud física que refleja la cantidad de calor, ya sea de un cuerpo, de un objeto o del ambiente. Las unidades de medida más habituales son los grados centígrados o Celsius, Fahrenheit y Kelvin.

La temperatura, como la humedad, es un factor condicionante para los organismos vivos porque influye en la cinética de las reacciones bioquímicas y en la estructura de las moléculas⁹. Sin embargo, es un factor que, en interior, debe estar necesariamente asociado con condiciones de humedad inconvenientes para causar degradación. En condiciones normales, en interior la temperatura suele encontrarse en los límites que permiten e incluso favorecen el crecimiento de organismos vivos, entre 25°C y 35°C. Por tanto, el causante de la aparición de biodeterioro, en líneas generales, no será tanto la temperatura, sino la temperatura sumada a una humedad favorable para este tipo de desarrollo.¹⁰

Los cambios bruscos de temperatura sumados a una HR media-alta, como se explicaba anteriormente, pueden causar movimientos en el soporte que pueden provocar

⁸ Valgañón, V. Op. Cit., p. 86.

⁹ Caneva, G., Nugari, M. P., Salvadori, O. Op. Cit., p. 34.

¹⁰ Valgañón, V. Op. Cit., p. 91.

desprendimientos de la capa pictórica además de la creación de grietas y huecos, en los que será más fácil que se desarrolle un ataque biológico.¹¹

3.2.1.2.3. LUZ

La luz es una forma de energía radiante, que se transmite como una onda electromagnética a una velocidad de 300.000 km/s aproximadamente.¹² Las radiaciones electromagnéticas provocan la ruptura de enlaces de las moléculas, diferenciándose dos tipos de reacciones: las reacciones fotolíticas y las fotoquímicas.

Las reacciones fotolíticas son las producidas únicamente por el efecto de la luz sobre una superficie. Las fotoquímicas, por otra parte, son las que se producen por la acción de la luz junto con algún elemento químico, como puede ser el agua o el oxígeno. Estos daños producidos por la luz dependerán del tipo de material sobre el que incide la luz, de la energía o longitud de onda de la radiación y del tiempo de exposición a la fuente de luz.

La luz es vital para el desarrollo de organismos fotosintéticos, que precisan de una exposición continuada a la misma para desarrollarse. Sin embargo, es un factor negativo para el desarrollo de otros organismos, como pueden ser las termitas o los hongos.

La longitud de onda también influye, puesto que puede ser capaz de provocar la ruptura de las moléculas biológicas, como es el caso de las radiaciones ultravioletas, o de aumentar la temperatura de la superficie, en el caso de las radiaciones infrarrojas.¹³

El tiempo de exposición, por otra parte, está directamente relacionado con los fenómenos de fotoperiodismo, que son “las variaciones que se producen en el comportamiento de un organismo dependiendo de la duración del día y la noche”¹⁴. Estos fenómenos son importantes tanto para las plantas, como para los insectos y los animales.

¹¹ Valgañón, V. *Ibíd.*, p. 89-90.

¹² Valgañón, V. *Ibíd.*, p. 91.

¹³ Caneva, G., Nugari, M. P., Salvadori, O. *Op. Cit.*, p. 38.

¹⁴ Valgañón, V. *Op. Cit.*, p. 97.

3.2.1.2.4. VIENTO

El viento es “aire atmosférico que se mueve en determinada dirección”¹⁵. Este factor atmosférico afecta únicamente a obras que se encuentran al aire libre y es especialmente dañino cuando se asocia a otros fenómenos como la lluvia, el granizo o el polvo, que son capaces de erosionar la superficie de las obras.

La erosión de la superficie de una obra puede provocar la creación de poros o huecos, que facilitan el asentamiento de microorganismos. Además, el propio viento ayuda en la dispersión de los orgánulos reproductores o de los mismos seres vivos.

3.2.1.2.5. CONTAMINANTES

La contaminación produce un cambio no deseado de las propiedades físicoquímicas y biológicas del aire, del suelo o del agua. Los grados de alteración que esta provocará en los bienes materiales dependerá del tipo de contaminante, la concentración, el tiempo de exposición, la sensibilidad del material que se ve afectado y los posibles sinergismos entre los distintos contaminantes.¹⁶

La sensibilidad a un determinado contaminante cambia dependiendo de la especie y puede producir un efecto positivo en el crecimiento de los mismos. Este efecto puede darse de forma indirecta o directa.

Por una parte, una influencia indirecta es la que se produce en el caso de organismos resistentes que, cuando se encuentran en una situación de ausencia de competición por parte de otros organismos, forman grandes poblaciones. Por otra parte, una influencia directa es la que se producen en los casos de eutrofización, en los que se favorece el crecimiento excesivo de materia orgánica, provocando también un crecimiento acelerado de especies heterótrofas como hongos o bacterias.¹⁷

¹⁵ Valgañón, V. *Ibíd.*, p. 97.

¹⁶ Valgañón, V. *Op. Cit.*, p. 97.

¹⁷ Caneva, G., Nugari, M. P., Salvadori, O. *Op. Cit.*, p. 41.

En ocasiones, los propios componentes de las obras pueden ejercer el papel de agentes contaminantes al descomponerse. Este es el caso de la celulosa, que produce ácido nítrico (HNO_3) y ácido acético (CH_3COOH) durante su descomposición.¹⁸

3.2.2. MICROORGANISMOS DETERIORANTES DE LOS TEJIDOS

Los tejidos de origen natural pueden dividirse, según su naturaleza, en tejidos vegetales y animales. Esto provocará que la composición de las fibras sea distinta unos de otros y, por tanto, que los tejidos vegetales y animales sean propensos a ataques biológicos diferentes. Sin embargo, el ataque biológico por parte de microorganismos a tejidos puede dividirse en dos grandes grupos: hongos y bacterias.

3.2.2.1. TEJIDOS VEGETALES

El biodeterioro de tejidos vegetales está condicionado por el contenido porcentual de celulosa y de lignina, el grado de polimerización, la longitud de las cadenas, su cristalinidad y su orientación. Mientras más pura sea la celulosa y mayor cantidad de lignina presente el tejido, más difícilmente será atacado.¹⁹

Los agentes de biodeterioro más habituales en los tejidos vegetales son los hongos, tanto celulosolíticos como no celulosolíticos, siendo las especies más frecuentes las pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Memnoiella*, *Myrothecium*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys* y *Stemphylium*. El crecimiento de los hongos puede darse de manera superficial o penetrar en las fibras de los tejidos, alcanzando la estructura interna de las fibras.²⁰ Por lo general, el efecto de los hongos se manifiesta en forma de cambios de color, manchas y pérdida de resistencia de las zonas afectadas.²¹

¹⁸ Valgañón, V. Op. Cit., p. 103.

¹⁹ Caneva, G., Nugari, M. P., Salvadori, O. Op. Cit., p. 94-95.

²⁰ Caneva, G., Nugari, M. P., Salvadori, O. (2000). *Ibíd.*, p. 96.

²¹ Valgañón, V. Op. Cit., p. 135.

Las bacterias también pueden atacar soportes textiles vegetales, pero es un daño menos común, puesto que necesitan de una gran cantidad de agua. Aparecen en lugares con altos valores de humedad relativa o cuando la obra ha estado enterrada, puesto que la tierra y los materiales en descomposición favorecen su desarrollo. Como los hongos, las bacterias provocan cambios de color, manchas y pérdida de la resistencia mecánica de los tejidos, pudiendo incluso llegar a descomponer completamente las fibras.

3.2.2.2. TEJIDOS ANIMALES

El biodeterioro en tejidos de origen animal, como la lana y la seda, se produce debido a su principal constituyente biológico: las proteínas. Dicho biodeterioro se dará en tejidos de origen animal cuando exista un alto grado de impurezas y cuando los tejidos se conserven en condiciones ambientales de calor y alta humedad relativa.²²

Al contrario que los tejidos vegetales, los tejidos animales son más susceptibles a sufrir un ataque bacteriano que de hongos. Entre las bacterias más frecuentes se encuentran las bacterias del género *Bacillus*, *Proteus* y algunos actinomicetus. Los hongos más habituales, por otra parte, son los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Trichoderma*.²³

3.2.3. LOS HONGOS

En este apartado se estudiará la morfología básica, la reproducción y la nutrición de los hongos. Este tipo de estudio es necesario porque nos aporta información sobre las características fisiológicas del agente biodeteriorante en cuestión que nos ayudarán a comprender sus exigencias vitales y, por tanto, a tomar decisiones adecuadas en cuanto a los métodos preventivos o de eliminación.

Los hongos pertenecen a un reino independiente del resto de organismos: el reino Fungi.²⁴ Este grupo se diferencia de las plantas en la ausencia de clorofila y la composición de su pared celular, que en el caso de los hongos está compuesta por

²² Caneva, G., Nugari, M. P., Salvadori, O. Op. Cit., p. 103.

²³ Caneva, G., Nugari, M. P., Salvadori, O. Ibíd., p. 104.

²⁴ Kuhar, F., Castiglia, V., Papinutti, L. (2013). Reino Fungi: morfologías y estructuras de los hongos. *Revista Boletín Biológica nº 28*. Recuperado de: <https://core.ac.uk/download/pdf/52479411.pdf>

quitina, celulosa o ambas, mientras que la de las plantas contiene principalmente celulosa. Por otra parte, se diferencian de los animales en que los hongos no poseen sistema de locomoción y la nutrición se lleva a cabo de manera diferente.²⁵

Estos organismos pueden ser unicelulares, como las levaduras, o pluricelulares, como en el caso de los hongos filamentosos o mohos, aunque todos ellos se caracterizan por ser microorganismos eucarióticos, con células que presentan un núcleo diferenciado.

3.2.3.1. MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA BÁSICA

Los hongos pluricelulares están formados por hifas, filamentos cilíndricos normalmente septados con paredes que dividen cada hifa en células separadas. Las hifas se ramifican, entrelazándose entre sí y creciendo tanto sobre el material del que se alimentan como dentro de este. Al conjunto de hifas se le denomina micelio o moho, y es visible sin necesidad de microscopio.

Algunas hifas crecen por encima del tapiz micelial, donde se producen los cuerpos fructificantes, que producen y liberan esporas llamadas conidios. Los conidios son esporas asexuales, resistentes a la desecación y normalmente pigmentadas, cuya función es dispersar al hongo hacia nuevos hábitats por el viento, el agua o animales.

Los conidios, al ser pigmentados, cambian el color blanco del micelio, pudiendo aparecer negro, verde azulado, rojo, amarillo o marrón. Además, la presencia de estas esporas confiere al micelio un aspecto polvoriento.

La diferencia más importante entre hongos y plantas, y una de las razones de que los hongos pertenezcan a un reino aparte, es la composición química de su pared celular. La pared celular de las células de las plantas está compuesta principalmente por celulosa, mientras que la de los hongos presenta quitina, un polímero derivado de la glucosa, u otros polisacáridos. Así, las paredes celulares de los hongos “están habitualmente compuestas de un 80-90% de polisacáridos, además de una matriz

²⁵ Valgañón, V. Op. Cit., p. 158.

compuesta de proteínas, lípidos, polifosfatos e iones inorgánicos, que cementan la pared”²⁶.

3.2.3.2. REPRODUCCIÓN

La mayoría de los hongos se reproduce de manera asexual, y el proceso puede darse de tres formas diferentes: mediante el crecimiento y diseminación de las hifas filamentosas, mediante la producción asexual de esporas o por división celular.

La reproducción sexual, por otra parte, requiere de la unión de dos núcleos compatibles y se realiza en tres fases distintas: plasmogamia, cariogamia y meiosis. Los órganos sexuales implicados pueden ser hermafroditas (masculinos y femeninos en un talo), o dioicas (talos constituidos por órganos sexuales masculinos o femeninos).

La formación de esporas mediante reproducción sexual puede desarrollarse mediante la fusión de gametos unicelulares, por la fusión de hifas especializadas llamadas gametangios o por la fusión de dos células haploides.

3.2.3.3. NUTRICIÓN Y METABOLISMO

Entre las diferencias importantes con los organismos vegetales, cabe destacar la incapacidad de los hongos para llevar a cabo la fotosíntesis. Normalmente, los hongos tienen necesidades nutricionales sencillas y la mayoría son aeróbicos.

La nutrición de los hongos se lleva a cabo gracias a la secreción de enzimas extracelulares que digieren los compuestos orgánicos complejos, transformándolos en monómeros. A continuación, estos componentes son absorbidos por la célula fúngica, aportándole energía, carbono y otros nutrientes.

Debido a su proceso nutricional, los hongos pueden reciclar material orgánico muerto, como restos de hojas o cadáveres de animales, o alimentarse de las células vivas de las plantas y animales que invaden.

²⁶ Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. and Clark, D. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson Education.

3.2.4. BIODETERIORO CAUSADO POR HONGOS EN PINTURA SOBRE TELA

Las pinturas sobre tela están constituidas por un soporte, una capa de preparación, una película pictórica y, en ocasiones, una capa de protección. Esto hace que en este tipo de obras se encuentren una gran cantidad de materiales, muchos de naturaleza orgánica, que pueden servir de fuente de energía para muchos microorganismos, aunque para la aparición de los mismos deben darse también las condiciones ambientales necesarias para su desarrollo. Los procesos de biodeterioro pueden darse tanto en el anverso como en el reverso de la obra, y puede aparecer de forma concentrada u ocupar superficies completas.

Los hongos atacan principalmente los tejidos de origen vegetal, cuyo componente principal es la celulosa, aunque también pueden atacar los tejidos de origen animal, compuestas en gran medida por proteínas.

El desarrollo de los hongos puede producirse en el anverso o en el reverso, en la superficie de los tejidos o entre las fibras. Sin embargo, lo más frecuente es que el desarrollo de estos organismos se produzca en el reverso en el caso de las pinturas sobre tela, debido a la mayor biodegradabilidad del lienzo respecto a la capa pictórica. Esto se debe también a las condiciones ambientales que se crean en el reverso del cuadro cuando este se encuentra colgado en la pared. La ausencia de ventilación provoca que se cree un microclima estable en el reverso particularmente favorable para el desarrollo de hongos al aumentar la humedad relativa y la temperatura. Sin embargo, aunque el biodeterioro comience en el reverso de la obra, puede propagarse entre las fibras de los tejidos hasta alcanzar la capa pictórica, causando pequeñas fracturas y el desprendimiento de algunos fragmentos.

Los hongos pueden degradar las obras mediante procesos físicos o químicos. Se consideran procesos físicos los procesos que “llevan a una pérdida de cohesión del sustrato debido a la acción mecánica de los organismos”²⁷. En el caso de los hongos en pintura sobre tela, como ya se ha comentado, pueden llegar a producir fracturas y desprendimiento de la capa pictórica durante el crecimiento de las hifas que forman el

²⁷ Caneva, G., Nugari, M. P., Salvadori, O. Op. Cit., p. 46.

micelio. Por otra parte, los procesos químicos son los que producen la descomposición o transformación del sustrato debido a la acción química de los microorganismos. Los hongos utilizan los materiales orgánicos que constituyen las obras como fuente de nutrientes gracias a la actividad enzimática que son capaces de realizar. Durante estos procesos las enzimas transforman las moléculas complejas que componen los materiales, como la celulosa, en moléculas simples. Inmediatamente después de este proceso, llamado hidrólisis, la consistencia de los materiales cambia, provocando una pérdida de resistencia y llegando incluso a causar la descomposición de los materiales constituyentes de la capa pictórica y el soporte.

Visualmente, la presencia de hongos se manifiesta en forma de manchas con aspecto polvoriento que pueden ser de color negras, verde azuladas, rojas, amarillas o marrones. Cuando el desarrollo de los hongos se produce en el anverso, los filamentos que se extienden por la pintura pueden enmascarar los colores con veladuras blanquecinas o, si el micelio está pigmentado, las veladuras aparecen coloreadas.

3.3. ANÁLISIS MULTIESPECTRAL EN PINTURA

El análisis multiespectral consiste en el empleo de radiaciones tanto visibles como invisibles al ojo humano para la documentación y el estudio de obras de arte. Este método, caracterizado principalmente por ser de tipo no destructivo, supone una parte fundamental del análisis de una obra antes de ser intervenida, ya que proporciona un apoyo científico en la caracterización y el diagnóstico.

Estos análisis, de carácter físico, se basan en la interacción entre una fuente de energía y la materia, partiendo de la base de que dependiendo de los materiales constitutivos de la obra estos absorberán y reflejarán de forma diferente una misma longitud de onda. Sin embargo, el ojo humano solo es capaz de percibir una pequeña parte del espectro, por lo que será necesaria la utilización de instrumentos que permitan transformar la radiación invisible en visible.

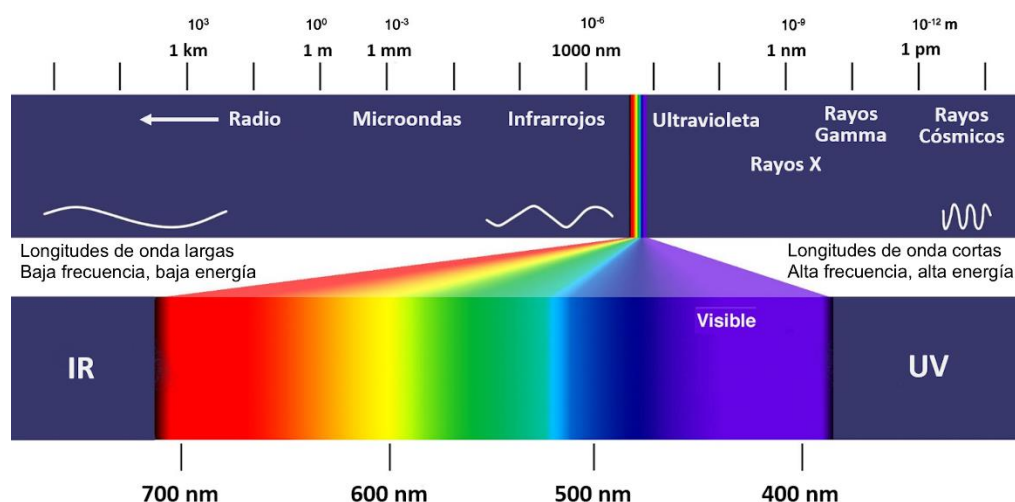


Ilustración 1. El espectro electromagnético. Recuperado de:

<https://unmundointelectualblog.wordpress.com/2017/03/08/espectro-electromagnetico/>

Las radiaciones se diferencian entre sí dependiendo de la energía, la frecuencia y la longitud de onda, que no son independientes entre ellas²⁸:

- La energía de una radiación es directamente proporcional a su frecuencia; es decir, cuanto mayor es la frecuencia, mayor es la energía de la radiación.

²⁸ Matteini, M., Moles, A. (2001). *Ciencia y restauración*. Hondarribia (Guipúzcoa): Nerea, p. 167-168.

- La frecuencia y la longitud de onda de una radiación son inversamente proporcionales; es decir, una radiación con frecuencia elevada tiene una longitud de onda pequeña, siendo, por tanto, muy energética; y viceversa, una radiación con una frecuencia baja y, consecuentemente, con una elevada longitud de onda, es poco energética.

3.3.1. REFLECTOGRAFÍA INFRARROJA

La reflectografía infrarroja es una técnica fotográfica que se sirve de la capacidad que tienen longitudes de onda de entre 900 a 50.000 nm de atravesar la capa pictórica de una obra, para la documentación de los estratos subyacentes.

El rango del espectro más utilizado es el perteneciente al infrarrojo cercano, que va desde 780 a 3000 nm, puesto que la longitud de onda óptima para atravesar un estrato pictórico son 2000 nm. Sin embargo, la capacidad de penetración depende no solo de la longitud de onda, sino también del espesor de la capa pictórica y del contraste entre las diferentes capas. Así, cuanto mayor sea la longitud de onda y menor el espesor de la capa, mayor será la penetración.

Por tanto, la reflectografía infrarroja permite observar las capas subyacentes a la capa pictórica de una obra, permitiendo el estudio de los dibujos preparatorios, los “arrepentimientos” pictóricos y la presencia de pinturas subyacentes.

3.3.2. FLUORESCENCIA ULTRAVIOLETA

La llamada fluorescencia ultravioleta se trata de una fluorescencia visible generada por una excitación ultravioleta. Es decir, se produce cuando un determinado material es incidido por una luz ultravioleta como radiación excitante, emitiendo como consecuencia radiaciones de longitud de onda mayor, y manifestándose por tanto en el espectro visible.

Por tanto, el fenómeno de la fluorescencia ultravioleta es directamente observable, además de ser una técnica fotográfica, y se manifiesta en forma de luz coloreada, generalmente de intensidad débil y con origen en todos los puntos del objeto alcanzados

por la radiación de excitación UV. Los colores van desde el verde al amarillo y al naranja claro.

Debido a que muchos de los materiales empleados en los procesos de creación artística son capaces de manifestar colores de fluorescencia y que la mayor parte de los materiales pictóricos compuestos por polímeros orgánicos presentan fluorescencias muy similares, es difícil llegar a ser capaces de identificar pigmentos y componentes pictóricos solo a partir de esta técnica, aunque es una buena fuente primaria de análisis. Además, la fluorescencia ultravioleta permite detectar la presencia de un barniz, que se manifiesta enmascarando la capa pictórica como un velo bajo esta radiación.

Otra de las aplicaciones de esta técnica es la documentación de restauraciones anteriores, puesto que permite apreciar la diferencia de envejecimiento de los materiales presentes en la obra. Esto es debido a las reacciones químicas entre los aglutinantes y los pigmentos, que con el tiempo provocan la formación de compuestos moleculares fluorescentes. Por tanto, las intervenciones más recientes aparecerán como una zona oscura en comparación con la pintura original.

En este trabajo en concreto, la fluorescencia ultravioleta cumple una función primordial, puesto que algunos microorganismos reaccionan bajo una radiación de luz ultravioleta, emitiendo fluorescencia. Esto nos permite no solo ver la distribución de dichos organismos en la obra de manera más clara, sino diferenciar distintos tipos de fluorescencias, que podrían suponer dos especies diferentes de microorganismos.

3.3.3. REFLECTOGRAFÍA ULTRAVIOLETA

La reflectografía ultravioleta tiene como objetivo capturar la banda UV, permitiendo la identificación de compuestos de origen diferente, pero con comportamiento similar dentro del campo visible²⁹.

En comparación con la fluorescencia ultravioleta, la reflectografía ha sido mucho menos utilizada. Sin embargo, su aplicación permite la diferenciación de los materiales que componen la obra y, como en el caso de la fluorescencia, pone de manifiesto

²⁹ <https://fotogasull.art/es/fotografia-cientifica/>

intervenciones anteriores. En ocasiones, gracias a la reflectografía ultravioleta pueden apreciarse con claridad áreas que en la fluorescencia aparecen confusas, por lo que la comparación de ambos registros es importante.

3.4. EXPERIMENTACIÓN PRÁCTICA

3.4.1. ESTUDIO POR IMAGEN

La metodología utilizada en el estudio por imagen ha sido la toma de fotografías de más generales a más específicas, estudiando en profundidad las zonas más interesantes. Para ello, se han utilizado tres sistemas: la cámara FUJIFILM para las fotografías generales, el sistema ARTIST para las tomas de detalle y el microscopio digital de DINOLITE para las fotografías micro.

En las tomas generales (Anexos 1, 4 y 7) se ha registrado la reflectografía visible (400 – 700 nm), el infrarrojo (700 – 1000 nm), la fluorescencia (400 – 700 nm) y la reflectografía ultravioleta (300 – 400 nm). En las fotografías de detalle (Anexos 2, 5 y 8) se han realizado una reflectografía visible (400 – 700 nm), reflectografía visible en blanco y negro, en infrarrojo 1 y 2 (700 – 1000 nm y 1000 – 1300 nm, respectivamente), una fluorescencia ultravioleta (400 – 700 nm) y una reflectografía ultravioleta (320 – 400 nm). Por último, en el caso de las fotografías micro (Anexos 3, 6 y 9) se ha realizado la documentación con luz visible.

Aunque se ha llevado a cabo la documentación total de las obras (Anexos 1-9), el objetivo no es el de documentar la técnica pictórica, sino utilizar estas técnicas para documentar el biodeterioro, por lo que los análisis que se explican a continuación se centrarán en el mismo.

3.4.1.1. SUPUESTO 1

Esta obra fue realizada en el año 1966 y presenta diferencias con las otras dos obras aportadas en este estudio. Está realizada sobre una tela pegada a un cartón gris y, a diferencia de las otras, el biodeterioro se presenta en el anverso de la obra.

Con luz visible, es posible apreciar una especie de manchas transparentes de consistencia resinosa que podrían ser confundidas con un barniz o algún tipo de resina. Sin embargo, bajo radiación ultravioleta estas manchas presentan fluorescencia y es fácilmente diferenciable la distribución y la presencia de las mismas solo en el fondo del cuadro, rodeando la figura principal.

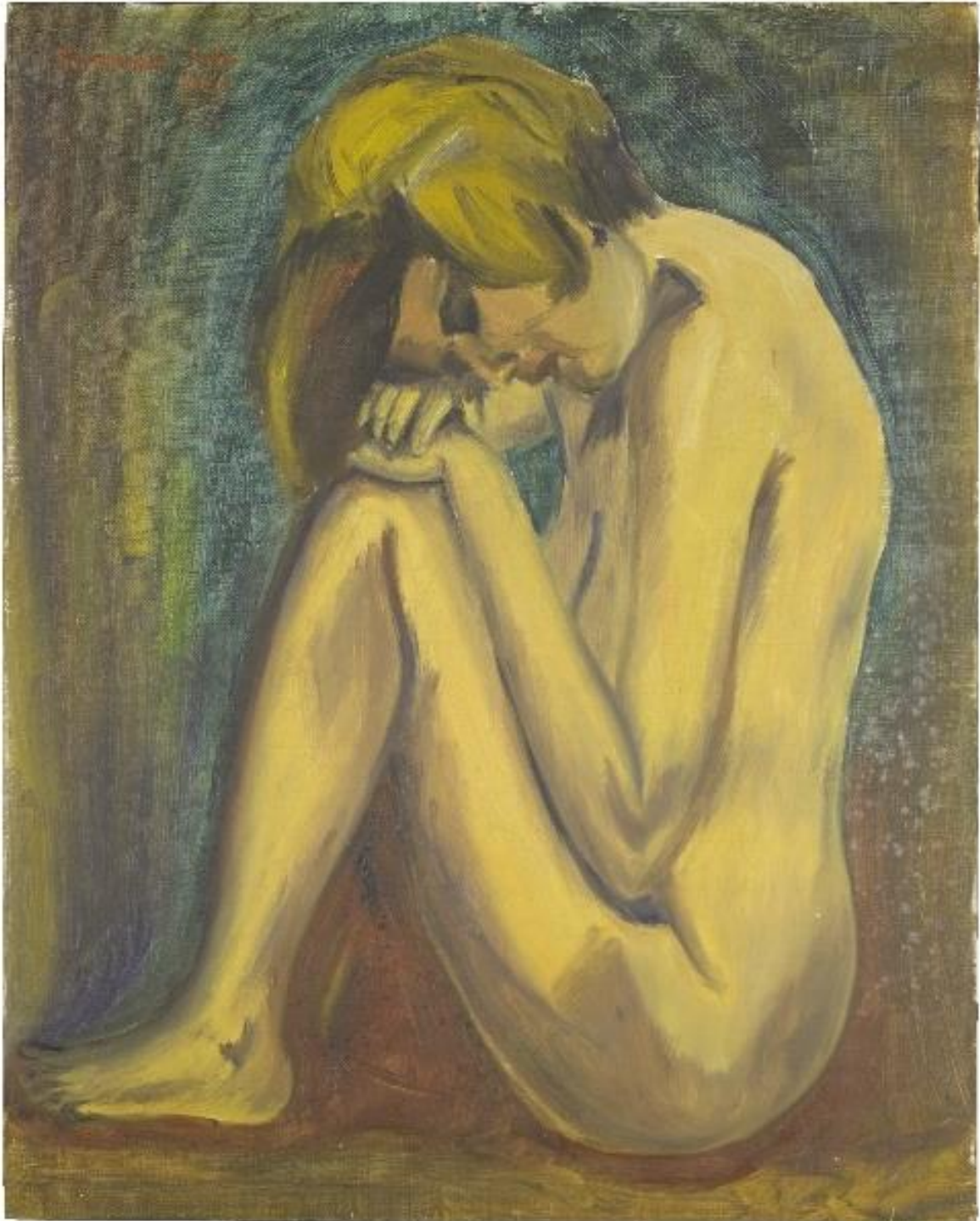


Figura 1. Anverso bajo radiación visible



Figura 2. Anverso con fluorescencia UV



Figura 3. Visible del detalle 1



Figura 4. Fluorescencia UV del detalle 1. Los microorganismos rodean la figura



Figura 5. Visible del detalle 2



Figura 6. Fluorescencia UV del detalle 2. Los microorganismos rodean la figura

Por su parte, el análisis con el microscopio digital ha sido fundamental, puesto que ha permitido ver con claridad que se trataba de un agente biológico, lo que no estaba claro con las fotografías generales y de detalle. Con esta técnica lo que parecían manchas superficiales puede apreciarse que se trata en realidad de algún agente de deterioro incoloro que ya ha empezado a penetrar en la capa pictórica.



Figura 7. Fotografía con microscopio digital con 210x del biodeterioro en la zona marrón



Figura 8. Fotografía con microscopio digital con 210x del biodeterioro en la zona verde

3.4.1.2. SUPUESTO 2

Esta obra presenta el biodeterioro en el reverso. Concretamente, el ataque se distribuye en horizontal en la mitad superior del reverso y donde se observa con claridad la presencia de hongos debido a la morfología.

Este ataque es visible en cualquiera de las bandas espectrales y se presenta de forma bastante homogénea. En el registro en visible, gracias a la intensidad del color y a la densidad del moho, puede apreciarse que en algunas zonas se ha desarrollado más que en otras, aunque es más fácil de apreciar en la fluorescencia ultravioleta.



Figura 9. Fotografía en visible del anverso. Véase la localización y la expansión del ataque biológico.

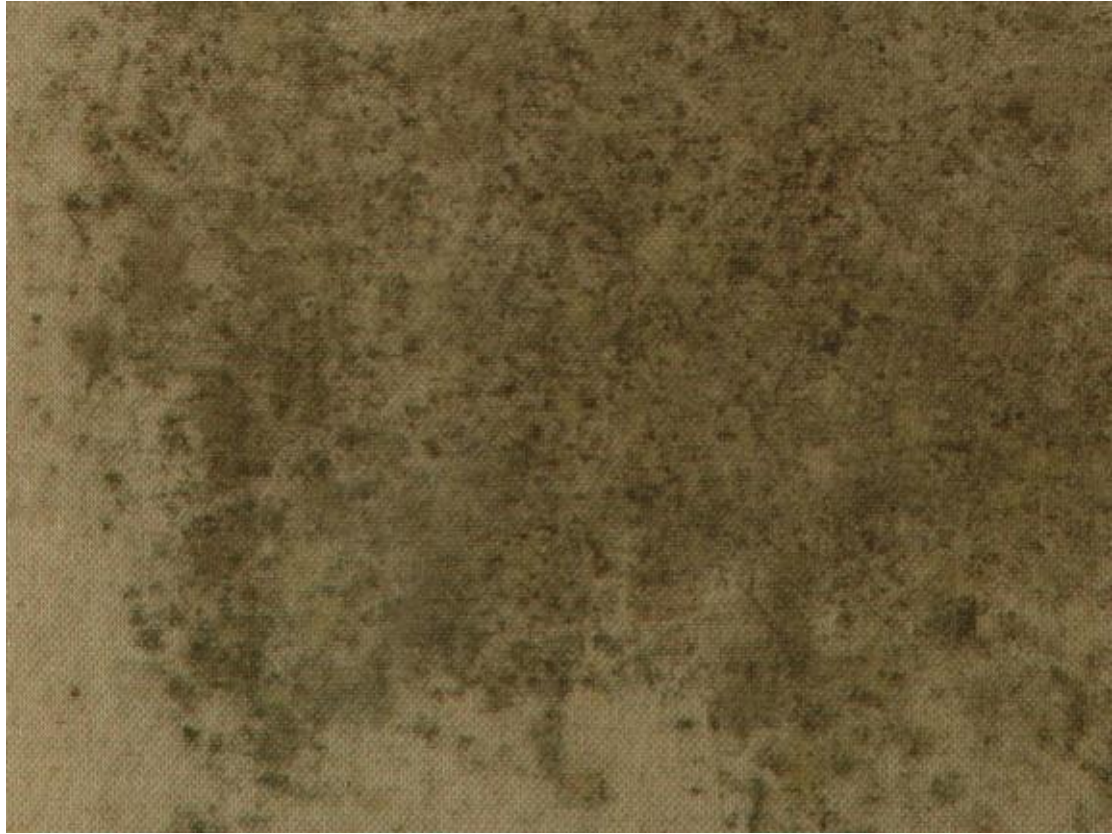


Figura 10. Detalle 3 en visible. Distintas intensidades en el ataque

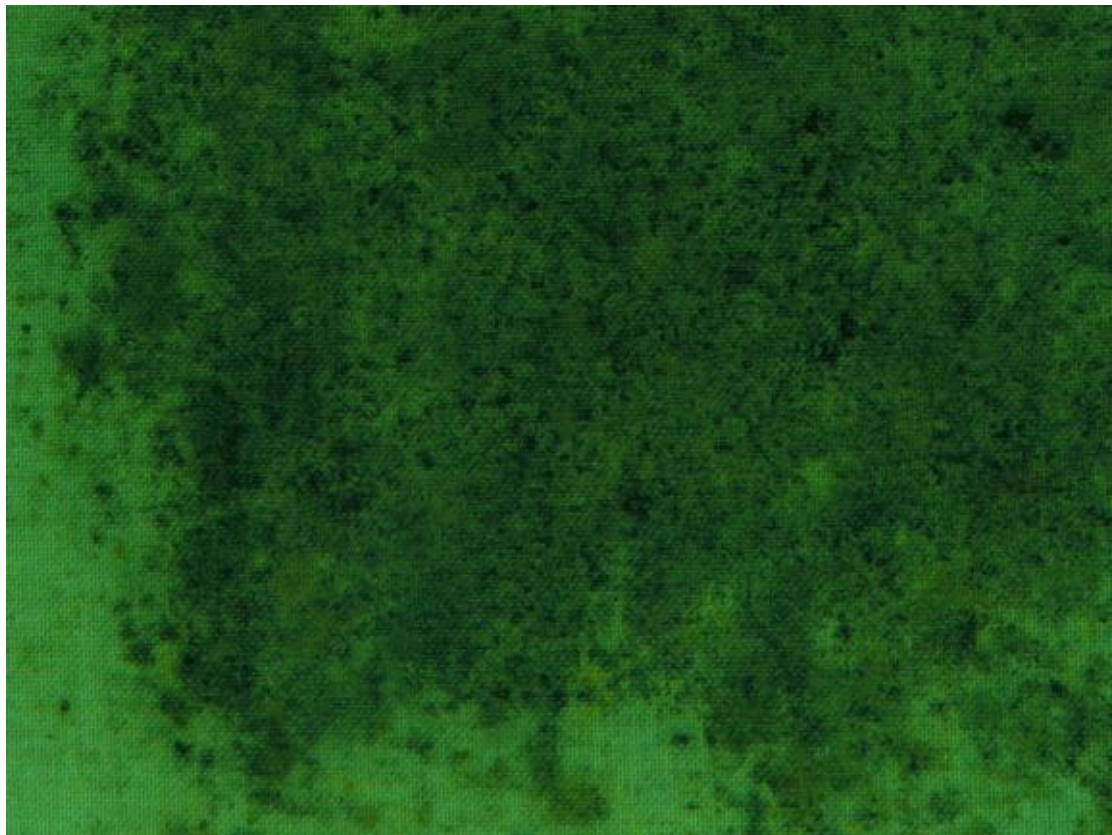


Figura 11. Detalle 3 en fluorescencia UV. Intensidades y fluorescencias diferentes

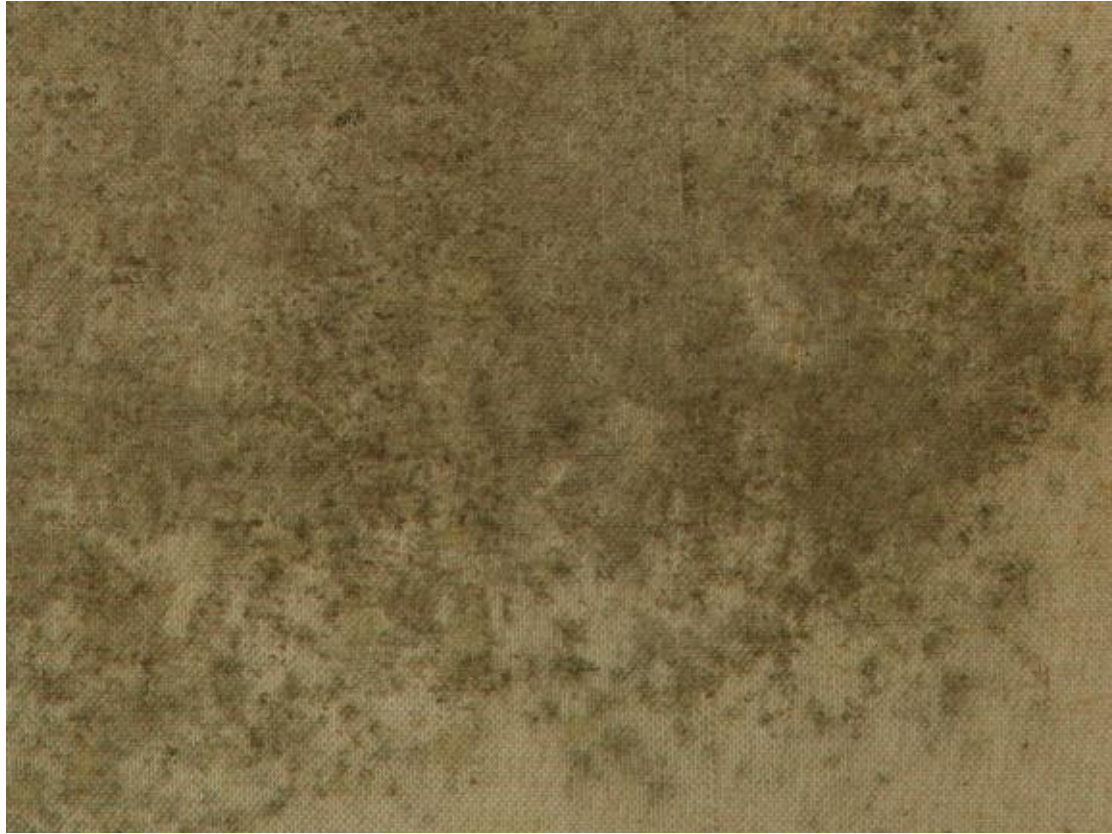


Figura 12. Detalle 4 en visible. Distintas intensidades en el ataque

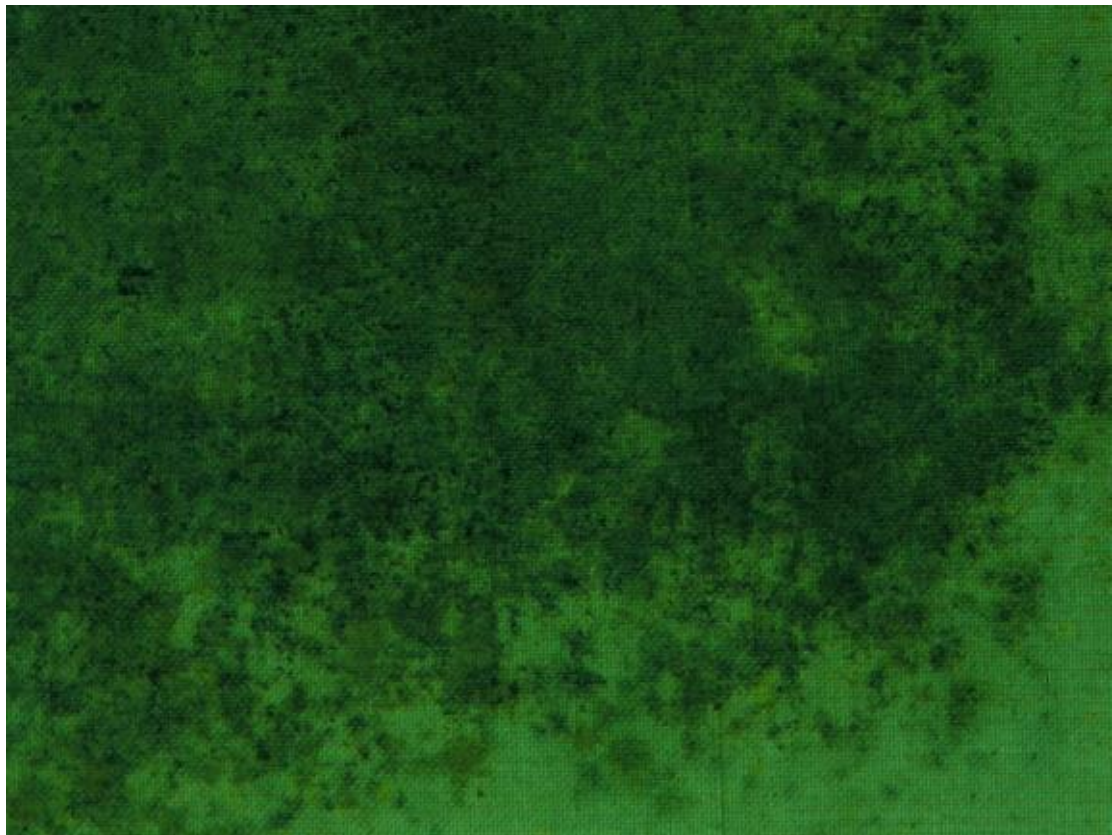


Figura 13. Detalle 4 en fluorescencia UV. Intensidades y fluorescencias diferentes

En los detalles de fluorescencia ultravioleta, es fácil diferenciar dos tonalidades diferentes: verde y anaranjada. Aunque la verde es la predominante, ambas se extienden por toda la obra.

El microscopio digital con luz visible es revelador. Examinando el cuadro con cuidado pueden verse claras diferencias en la morfología y el color en distintas zonas. Concretamente, se han diferenciado tres formaciones diferentes: una blanquecina, una verde oscuro y otra de un color claro con visibles esporas. Por este motivo, se toman tres muestras para analizar en el laboratorio.



Figura 14. Moho blanco

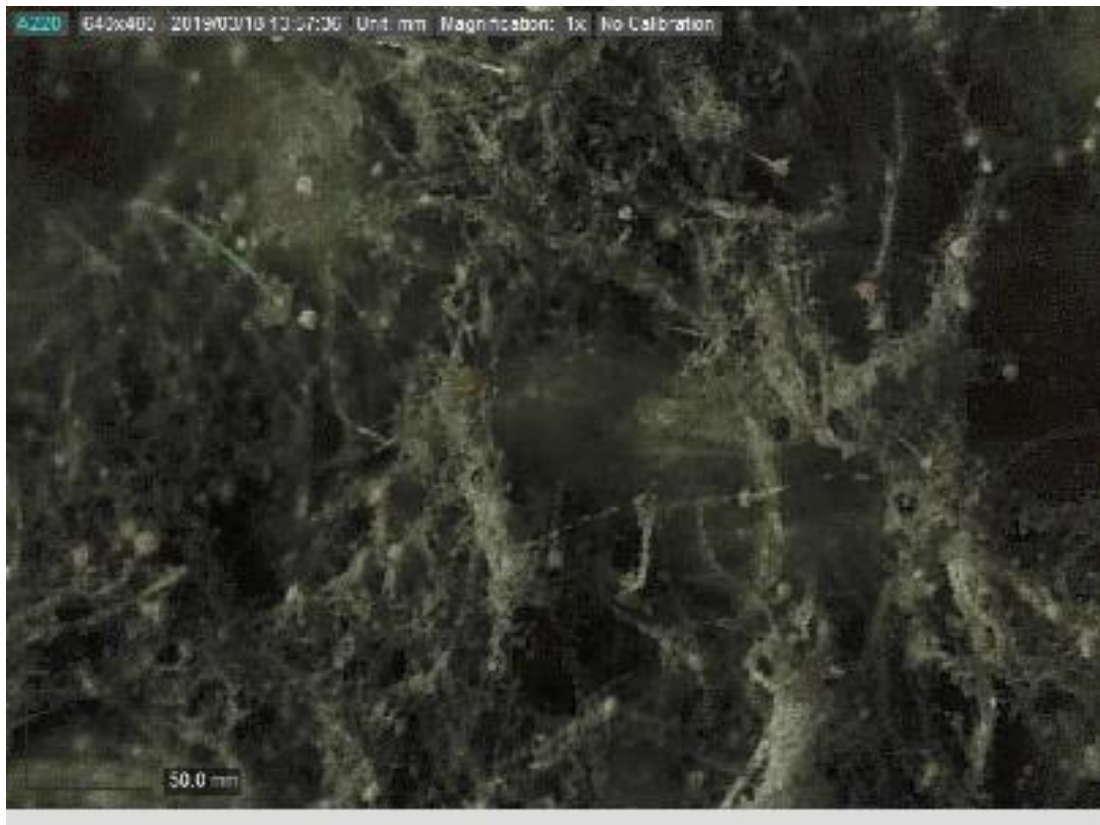


Figura 15. Moho verde oscuro



Figura 16. Moho blanco con esporas visibles

3.4.1.3. SUPUESTO 3

En el Supuesto 3 el biodeterioro se encuentra en el reverso, concentrándose sobre todo a la derecha y en la parte superior. Además, en este caso el biodeterioro ha atravesado el soporte y las capas de preparación y pictóricas, manifestándose ligeramente en el anverso en forma de velo blanquecino sobre la cabeza a la izquierda.



Ilustración 2. Composición del anverso y del reverso para demostrar la coincidencia del velo blanco del anverso con la presencia de moho en el reverso. El anverso se encuentra en su posición original y el reverso al contrario.

El biodeterioro se concentra en la mitad superior del reverso y sobre todo a la derecha. Al contrario del caso anterior, el crecimiento en este caso no es tan homogéneo, sino que se concentra en forma de escamas en algunas zonas.

Por otra parte, las fluorescencias naranjas presentes en el caso anterior son también fácilmente reconocibles en esta obra incluso sin necesidad de utilizar la luz ultravioleta, aunque con esta siempre se evidencia de forma más clara.



Figura 17. Detalle 3 en visible. Distintas intensidades en el color

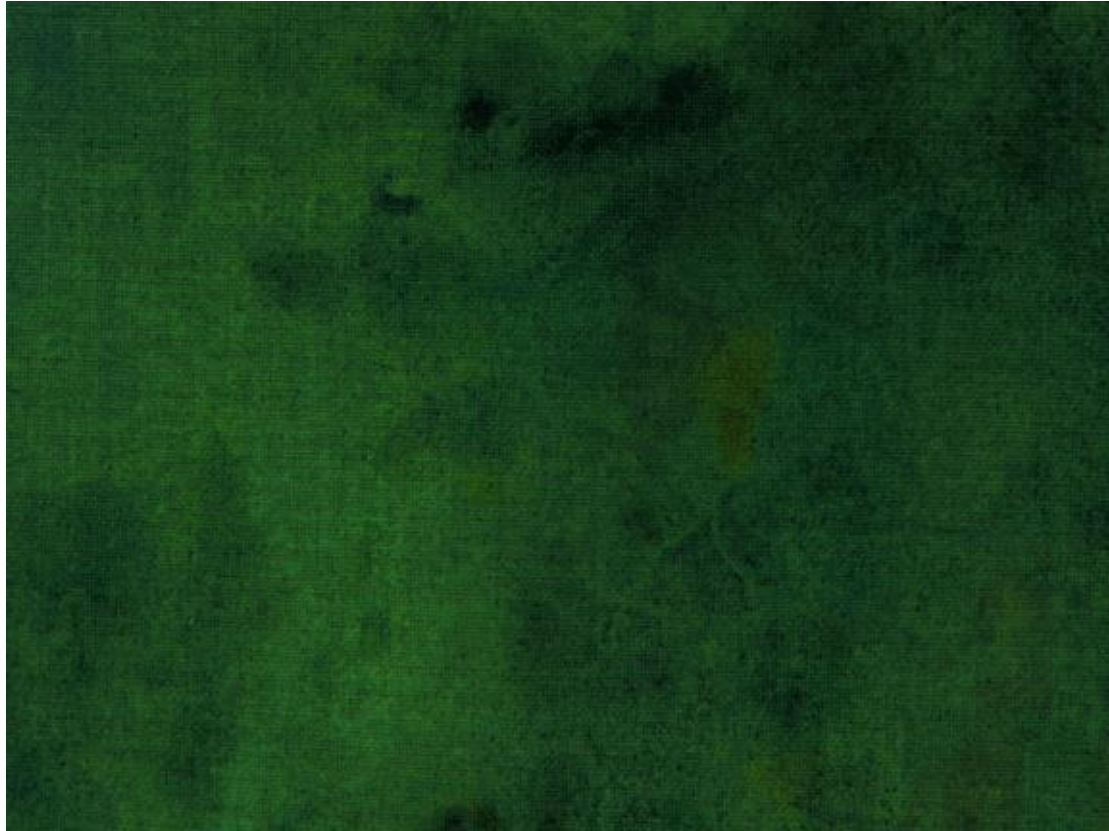


Figura 18. Detalle 3 en fluorescencia UV. Intensidades y fluorescencias diferentes



Figura 19. Detalle 4 en visible. Distintas intensidades de color

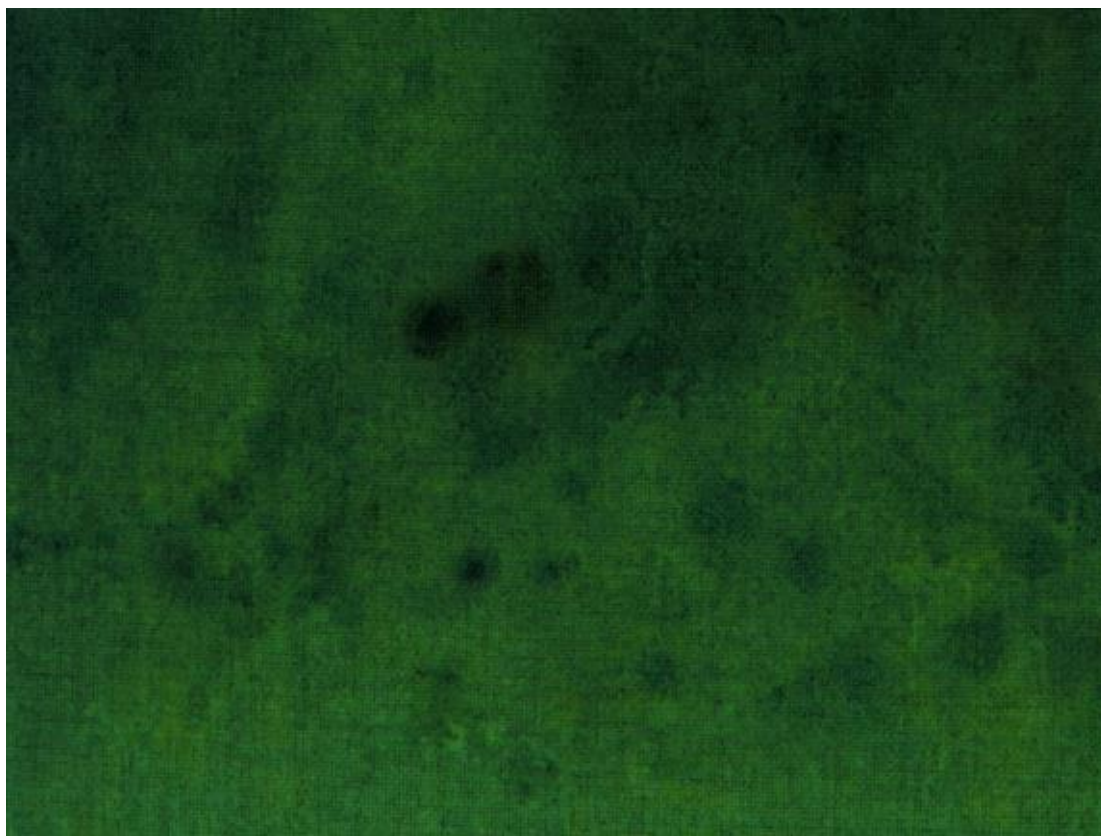


Figura 20. Detalle 4 en fluorescencia UV. Intensidades y fluorescencias diferentes

A escala micro pueden distinguirse tres formaciones: hifas transparentes, moho verde oscuro con presencia de esporas y moho blanco. Así, también en este caso se toman tres muestras para su posterior análisis en el laboratorio.



Figura 21. Hifas transparentes

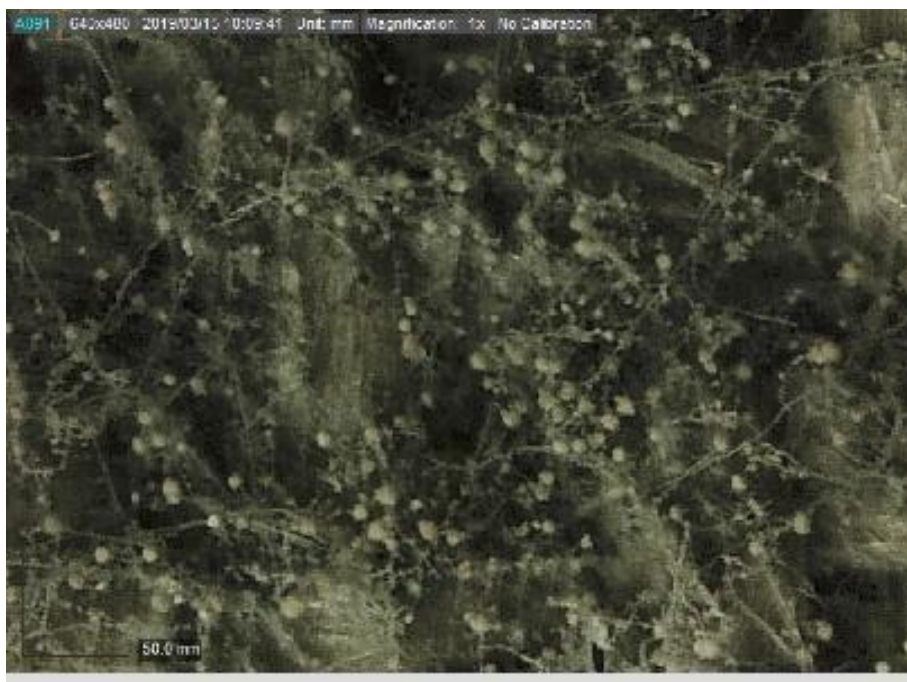


Figura 22. Moho verde oscuro con presencia de esporas



Figura 23. Moho blanco

3.4.2. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES

3.4.2.1. TOMA DE MUESTRAS Y CULTIVOS

La toma de muestras se realizó partiendo de las diferentes zonas de crecimiento microbiano detectadas mediante el análisis con el microscopio digital.

Con un hisopo estéril, se frotó cada zona a muestrear hasta impregnar el hisopo con la mayor cantidad posible de material biológico y, seguidamente, cada hisopo se guardó y se identificó para su transporte al laboratorio (Figuras 24 y 25). Para la correcta identificación de las muestras se adoptó una nomenclatura basada en la identificación de cada supuesto (S1, S2 ó S3), seguida del número de muestra y, en algunos casos de un tercer dígito indicativo de que utilizando el mismo hisopo se tomaron muestras a partir de dos o más zonas.



Figura 24. Toma de la muestra S3_3 con hisopo.



Figura 25. Hisopos identificados después de la toma de muestras.

En total, las muestras recogidas fueron siete: una única muestra a partir del Supuesto 1, tres del Supuesto 2 y tres del Supuesto 3. Durante el proceso de toma de muestras, los puntos exactos a partir de los que se tomaron las muestras fueron identificados en una fotografía (Figuras 26, 29 y 34). Además, para tratar de identificar con mayor exactitud la presencia microbiana, se obtuvo una imagen con el microscopio digital de cada zona de muestreo (Figuras 27-28, 30-33, 35-38).

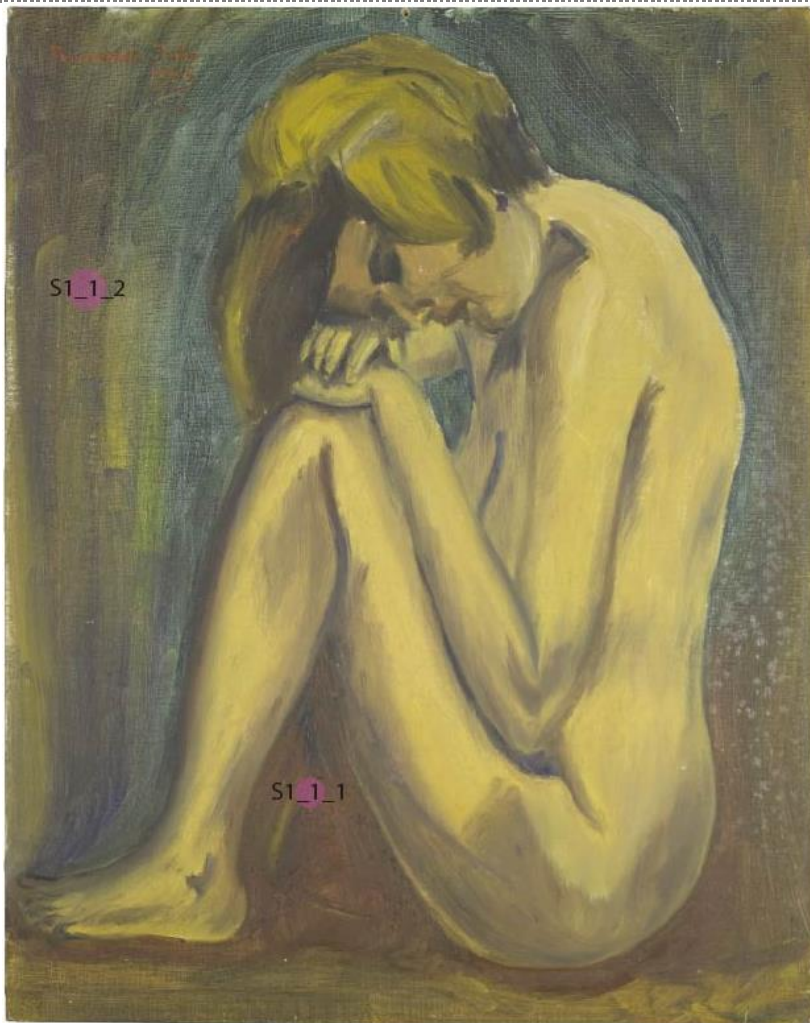


Figura 26. Localización de las zonas de muestro seleccionadas en el Supuesto 1.



Figura 27. Fotografía con el microscopio digital de la zona de muestro S1_1_1.



Figura 28. Fotografía con el microscopio digital de la zona de muestro S1_1_2.

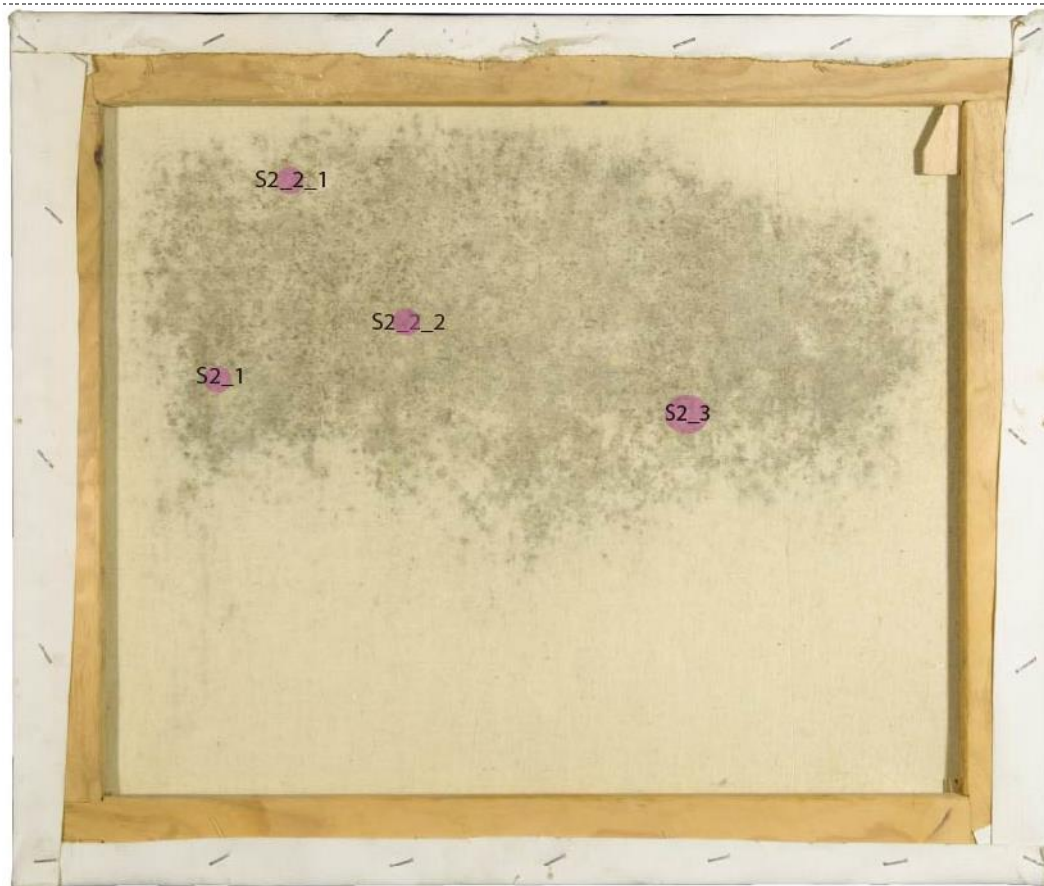


Figura 29. Localización de las zonas de muestreo seleccionadas en el Supuesto 2.



Figura 30. Fotografía con el microscopio digital de la zona de muestreo S2_1.

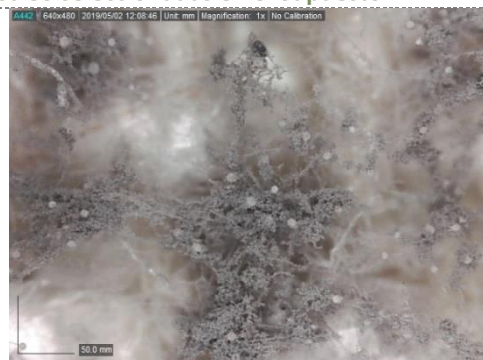


Figura 31. Fotografía con el microscopio digital de la zona de muestreo S2_2_1.

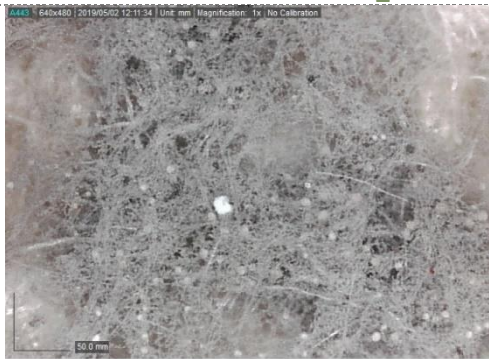


Figura 32. Fotografía con el microscopio digital de la zona de muestreo S2_2_2.



Figura 33. Fotografía con el microscopio digital de la zona de muestreo S2_3.

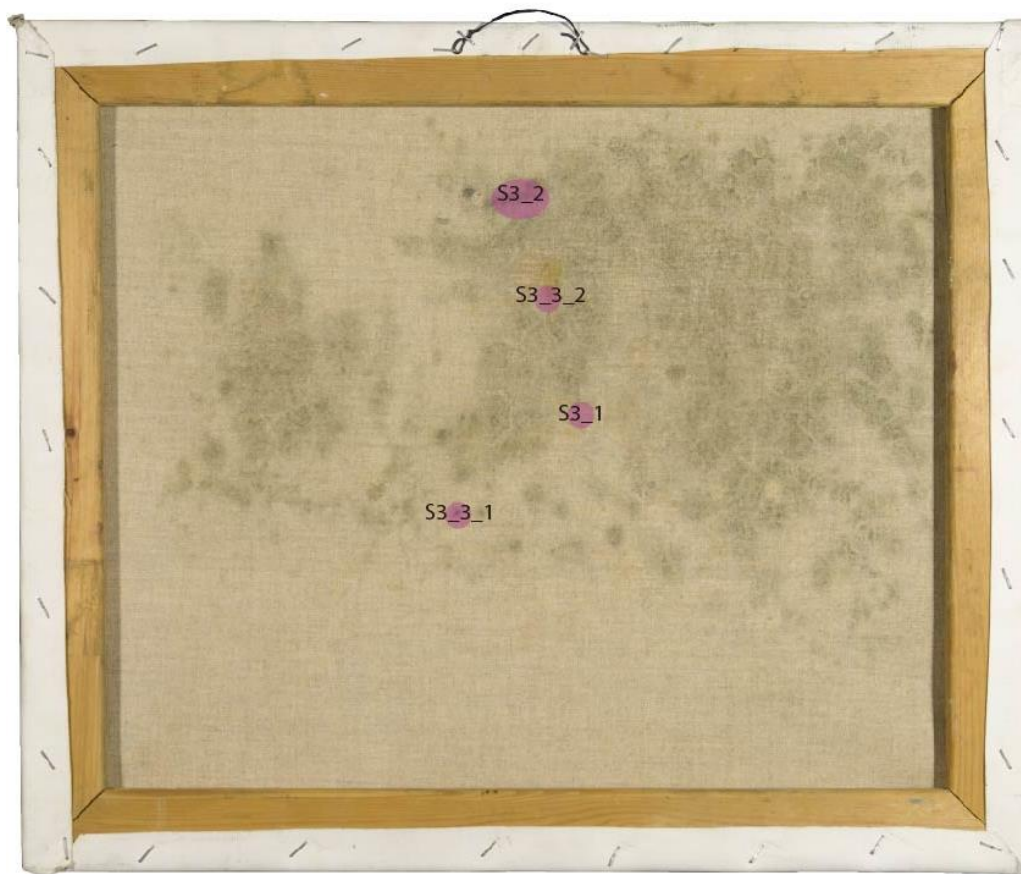


Figura 34. Localización de las zonas de muestreo seleccionadas en el Supuesto 3.

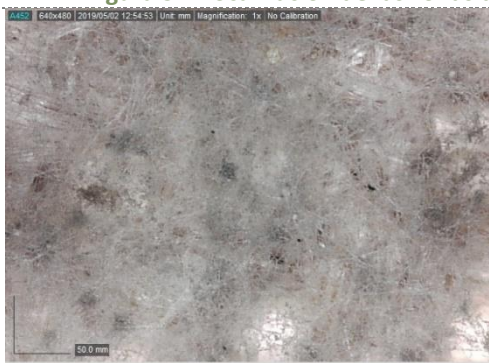


Figura 35. Fotografía con el microscopio digital de la zona de muestreo S3_1.

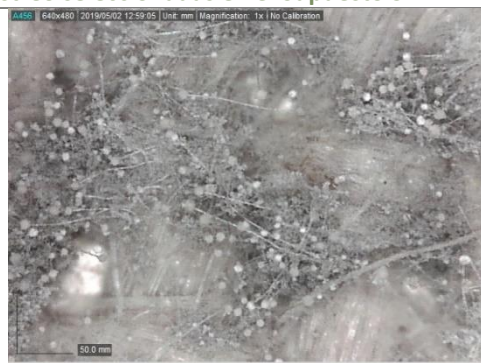


Figura 36. Fotografía con el microscopio digital de la zona de muestreo S_3_2.



Figura 37. Fotografía con el microscopio digital de la zona de muestreo S3_3_1.

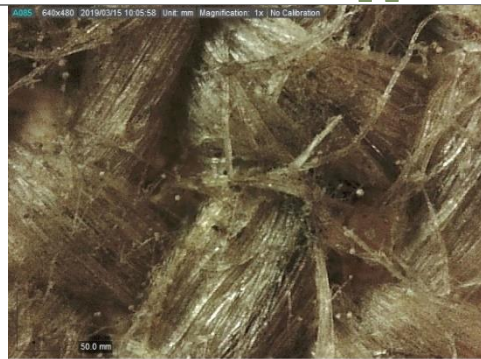


Figura 38. Fotografía con el microscopio digital de la zona de muestreo S3_3_2.

Las muestras fueron trasladadas en los hisopos herméticamente cerrados al Servicio de Genómica (SEGAI-ULL), donde el siguiente paso consistió en su siembra en medio de cultivo ricos, para favorecer el crecimiento de todas las posibles especies microbianas presentes en los hisopos. Con el objetivo de aislar de manera diferencial, por una parte las posibles especies de bacterias, y por otra los posible hongos y levaduras, se utilizaron dos medios de cultivo:

- TSA + 25 µg/ml Nistatina: Agar Triptona de Soja (*Tryptic Soy Agar*). Medio rico que favorece el crecimiento de bacterias. Se suplementa con nistatina, un antifúngico de amplio espectro que impide el crecimiento de hongos y levaduras.
- MEA + 25 µg/ml Cloranfenicol: Extracto de Malta Agar (*Malt Extract Agar*). Medio rico que favorece el crecimiento de hongos y levaduras, se suplementa con Cloramfenicol, un antibiótico de amplio espectro que limita el crecimiento bacteriano.

Los cultivos fueron incubados a 28 °C durante 2 días y, a continuación, se llevó a cabo el repicado y la resiembra en medios de cultivo frescos para la obtención de cultivos puros. Para ello, se utilizó una punta de pipeta estéril, con la que se picaron las diferentes especies visibles según la morfología. En el caso de las bacterias, basta con picar una colonia aislada con la punta y transferirla a la nueva placa con medio fresco. Sin embargo, en el caso de los hongos, es necesario extraer un trozo de agar con micelio.

En total, se aislaron 18 microorganismos con ciertas características morfológicas diferenciales, que fueron nuevamente incubados a 28 °C, esta vez durante 7 días, para así favorecer el crecimiento en cultivo puro hasta obtener suficiente cantidad de material biológico. Una vez que se apreció crecimiento suficiente en cultivo puro, se procedió a una nueva selección en función de la morfología de las colonias, de manera que finalmente fueron seleccionadas 5 cepas con diferente aspecto (Figuras 39-43).



Figura 39. Microorganismo seleccionado. Muestra S1_1A

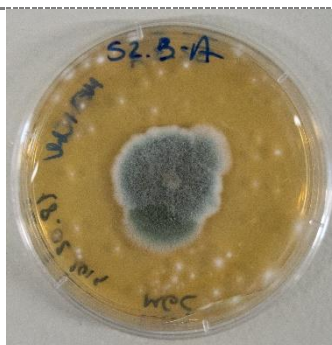


Figura 40. Microorganismo seleccionado. Muestra S2_3A



Figura 41. Microorganismo seleccionado. Muestra S3_1A



Figura 42. Microorganismo seleccionado. Muestra S3_2D

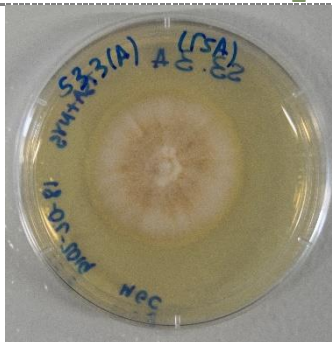


Figura 43. Microorganismo seleccionado. Muestra S3_3A

A continuación, con una pipeta estéril, se raspó aproximadamente 1 cm² de micelio y se traspasó a un tubo Eppendorf identificado correctamente. Una vez realizado este procedimiento, se congelaron las muestras a -20°C para la posterior extracción de ADN genómico. Para facilitar el trabajo en el laboratorio, se asignó un número a cada una de las muestras, con la siguiente correspondencia:

Nombre original de la muestra	Número asignado
S1_1 A	1
S3_1 A	2
S2_3 A	3
S3_2 D	4
S3_3 A	5

Tabla 4. Relación de los nombres originales de las muestras con los asignados posteriormente en el laboratorio para facilitar su manejo.

3.4.2.2. EXTRACCIÓN DE ADN Y ELECTROFORESIS

La extracción de ADN se basa en una serie de procesos físico-químicos, que permiten romper células, eliminar los contaminantes y finalmente obtener una preparación que contiene el ADN genómico disuelto en agua. En este caso, la purificación del ADN se llevó a cabo con el kit comercial E.Z.N.A. Plant DNA Kit (Omega bio-tek), siguiendo las instrucciones del fabricante, aunque añadiendo un paso extra durante la lisis celular, que consistió en la adición de 5 μ L de 10 mg/mL Proteinasa-K al buffer de lisis, y la posterior incubación a 56°C durante 5 minutos, para después continuar con el proceso según el protocolo suministrado con el kit.

Las muestras de ADN genómico resultante fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v, para comprobar la pureza e integridad del ADN. Para la preparación del gel de agarosa, se utilizaron 0,8 g de agarosa y 80 mL de tampón TAE (Tris-Acético EDTA). Además, para la visualización del ADN se añadió 1X GelRed™ (Biotium), un colorante fluorescente que se intercala entre la doble hélice del ADN, y emite una luz visible cuando es excitado por luz UV en un transiluminador. La electroforesis se desarrolló durante 20 min a 90 V y 140 mA, y el gel fue seguidamente visualizado utilizando un transiluminador UVP TFM-20. Los resultados de la electroforesis se muestran en la Figura 44.

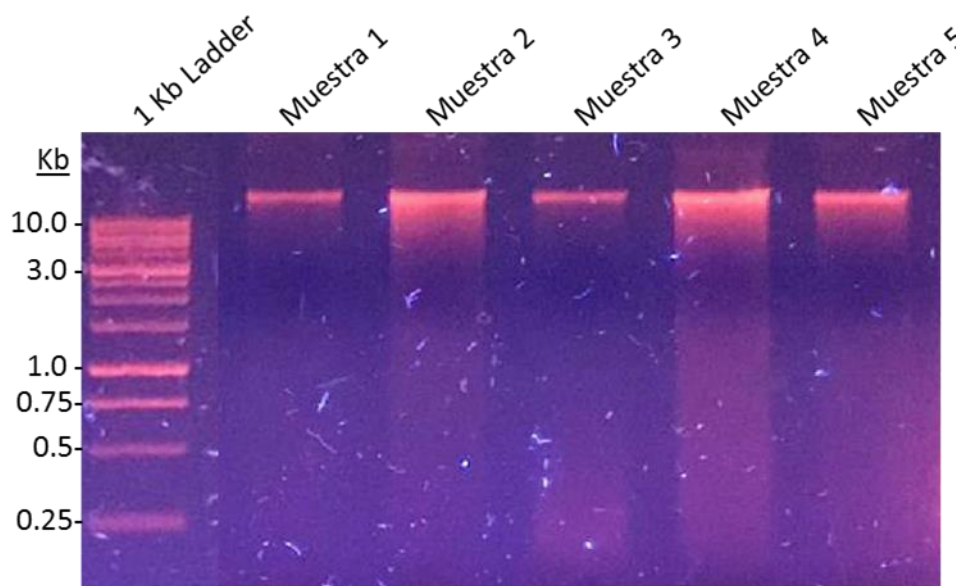


Figura 44. Resultado de la purificación de ADN genómico. Se muestra el marcador de peso molecular utilizado para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN purificados (1Kb Ladder) y el ADN genómico obtenido para cada una de las muestras analizadas. Kb = Kilobases.

3.4.2.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) Y ELECTROFORESIS

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR; *Polymerase Chain Reaction*) es una técnica que permite amplificar, es decir, copiar exponencialmente, un fragmento de ADN de interés, a partir de muy poca cantidad de partida.

La identificación molecular de hongos a nivel de especie se lleva a cabo mediante la amplificación y posterior secuenciación de ciertas regiones del genoma denominadas *Internal Transcribed Spacer* (ITS) 1 y 2. Estas regiones están estandarizadas por la comunidad científica internacional, dado que presentan una elevada variabilidad interespecífica y una baja variabilidad intraespecífica, lo que permite discernir entre especies en función de su secuencia de nucleótidos. Para la amplificación por PCR de la región ITS, existen diferentes cebadores universales. En este caso, se seleccionaron los cebadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), mediante los cuales es posible amplificar un fragmento de ADN correspondiente a la región ITS1-2, cuyo tamaño oscila entre 500-700 pb, en función de la especie.

Para la amplificación se utilizó el kit de PCR VWR Taq DNA polymerase (VWR Int.). En primer lugar, se prepararon diluciones del ADN genómico purificado previamente, a una concentración final de 100-200 ng/ μ L, y se utilizó 1 μ L de dichas disoluciones como molde para cada reacción de PCR. Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 25 μ L, en tubos Eppendorf de 0,2mL, siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada reacción se incluyó lo siguiente:

Componente de la reacción de PCR	Volumen (μ L)
Taq DNA polymerase (2.5U/ μ l)	0,15
10X Taq Buffer	2,5
dNTPs mix (2.0 mM each)	2,5
Primer 1 (10 μ M)	1,0
Primer 2 (10 μ M)	1,0
DNA molde (100-200 ng/ μ L)	1,0
H ₂ O	16,85

Tabla 5. Componentes y volúmenes utilizados para la preparación de reacciones de PCR.

Una vez preparadas las reacciones de PCR, se colocaron en un termociclador iCycler (BIORAD), y se sometieron al siguiente programa de ciclos térmicos:

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Nº Ciclos
95	2,0	1
95	0,5	35
53	0,5	
72	1,0	
72	10,0	1
4	∞	1

Tabla 6. Programa de ciclos térmicos utilizado para la amplificación mediante PCR de las regiones ITS1-2.

Después del programa de ciclos térmicos, se mezcló 2,5 µL de cada producto de PCR con 2,5 µL de 2X Loading Dye (Geneall), y la mezcla fue sometida a continuación a electroforesis en gel de agarosa, tal como se ha descrito anteriormente, para determinar la presencia de producto de amplificación, así como el tamaño del fragmento amplificado (Figura 45).

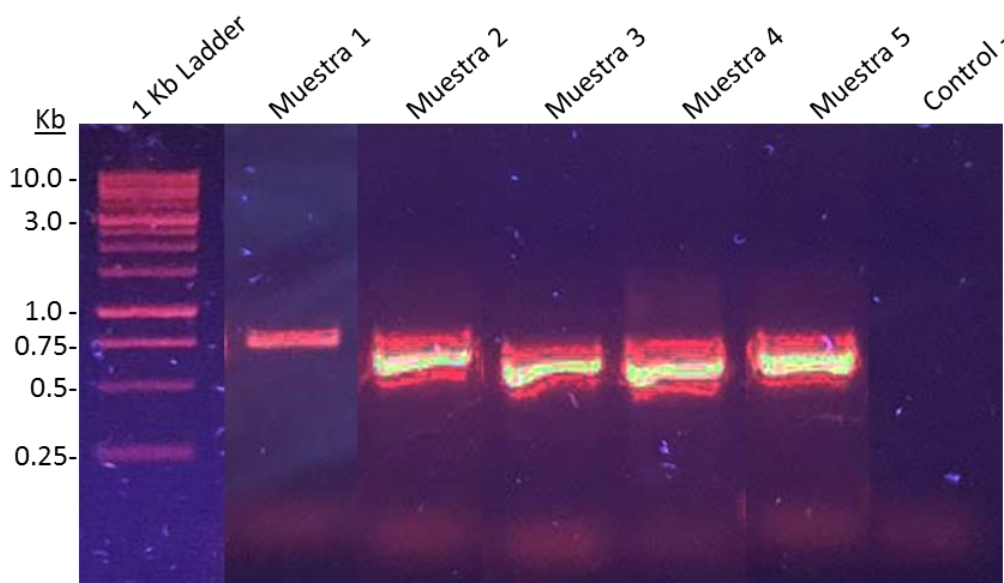


Figura 45. Resultado de la amplificación mediante PCR de la región ITS1-2. Se muestra el marcador de peso molecular (1Kb Ladder) y el producto de amplificación para cada una de las muestras analizadas, así como el control negativo (Control -).

3.4.2.4. SECUENCIACIÓN SANGER

La secuenciación de ADN tiene como objetivo determinar el orden de bases de un fragmento de ADN. En el presente trabajo, la tecnología utilizada para la secuenciación se denomina *Secuenciación de ADN mediante el uso de terminadores marcados*, más conocida como *Secuenciación Sanger*. Este método es el más utilizado para la identificación molecular de especies en todo el mundo.

En primer lugar, se realizó la purificación de los productos de PCR para eliminar el exceso de cebadores y nucleótidos. Para ello se utilizó el kit EXO-SAP-IT (Affimetrix-USB), siguiendo las instrucciones del fabricante. En segundo lugar, se utilizó el kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) para preparar la reacción de secuenciación de cada producto de PCR. Para obtener unos resultados de mayor calidad, cada uno de los productos de PCR fue secuenciado desde ambos extremos, utilizando en cada reacción de secuenciación uno de los cebadores utilizados durante la PCR: ITS1 (FW) e ITS4 (RV). Después de la precipitación indicada por el fabricante del kit se secuenciación, las reacciones de secuenciación fueron resuspendidas en 8 µL de HiDi Formamide (Thermo Fisher Scientific) previamente a la inyección en el secuenciador 3500 Series Genetic Analyzer (Thermo FisherScientific).

Por último, la electroforesis capilar fue realizada utilizando un capilar de 50 cm estándar (Thermo Fisher Scientific) y el polímero POP7 (Thermo Fisher Scientific). Se utilizó el protocolo de referencia para dichas condiciones (FastSeq50_POP7).

3.4.2.5. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

Los electroferogramas proporcionados por el analizador genético fueron visualizados y editados con el software gratuito Chromas LITE³⁰ (<http://technelysium.com.au/wp/>). Con este programa es posible llevar a cabo una primera comprobación de las secuencias obtenidas, lo que permite determinar el número de pares de bases correctamente identificadas, así como la calidad de la secuencia obtenida. Durante este paso, además,

³⁰ CHROMA: consensus-based colouring of multiple alignments for publication. *Bioinformatics*. 2001 septiembre, v. 17, n. 9, p. 845-846.

se lleva a cabo una revisión manual de las secuencias, lo que permite identificar posibles errores de identificación de bases, así como completar aquellas que no han sido identificadas automáticamente por el software asociado al analizador genético.

En segundo lugar, se llevó a cabo el alineamiento de las secuencias revisadas para cada microorganismo, denominadas forward (FW) y reverse (RV). Para ello se utilizó el servidor Clustal Omega³¹ (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). De esta manera, se determinó la correcta coincidencia de ambas secuencias, y se obtuvo finalmente una única secuencia consenso para cada muestra a partir del alineamiento.

Por último, la secuencia consenso obtenida para cada muestra se utilizó para la identificación a nivel de especie mediante análisis BLAST³² en la base de datos del *National Library of Medicine* (NCBI)³³ (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) y el *Barcode Of Life Database* (BOLD)³⁴ (<http://www.boldsystems.org/index.php>). Este análisis consiste en la comparación de la secuencia problema con el conjunto de secuencias contenidas en toda la base de datos. A modo de esquema, el procedimiento de análisis se resume en la Figura 46.

En el caso de las muestras 3 y 5, en las que se obtuvo una sola secuencia, reverse en ambos casos, se omitió el paso de alineamiento de las secuencias y se llevó a cabo la comparación en la base de datos con la única secuencia obtenida.

³¹ Sievers, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 2011 octubre, v. 11, n. 9, p.539.

³² Zhang, Z. et al. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 2000 febrero, v. 7, n. 1-2, p. 203-214.

³³ Morgulis, A. et al. Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*, 2008, v. 24, n. 16, p. 1757-1764.

³⁴ Ratnasingham, S., Hebert, P. D. N. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 2007 enero, v. 7, n. 3, p. 355-364.

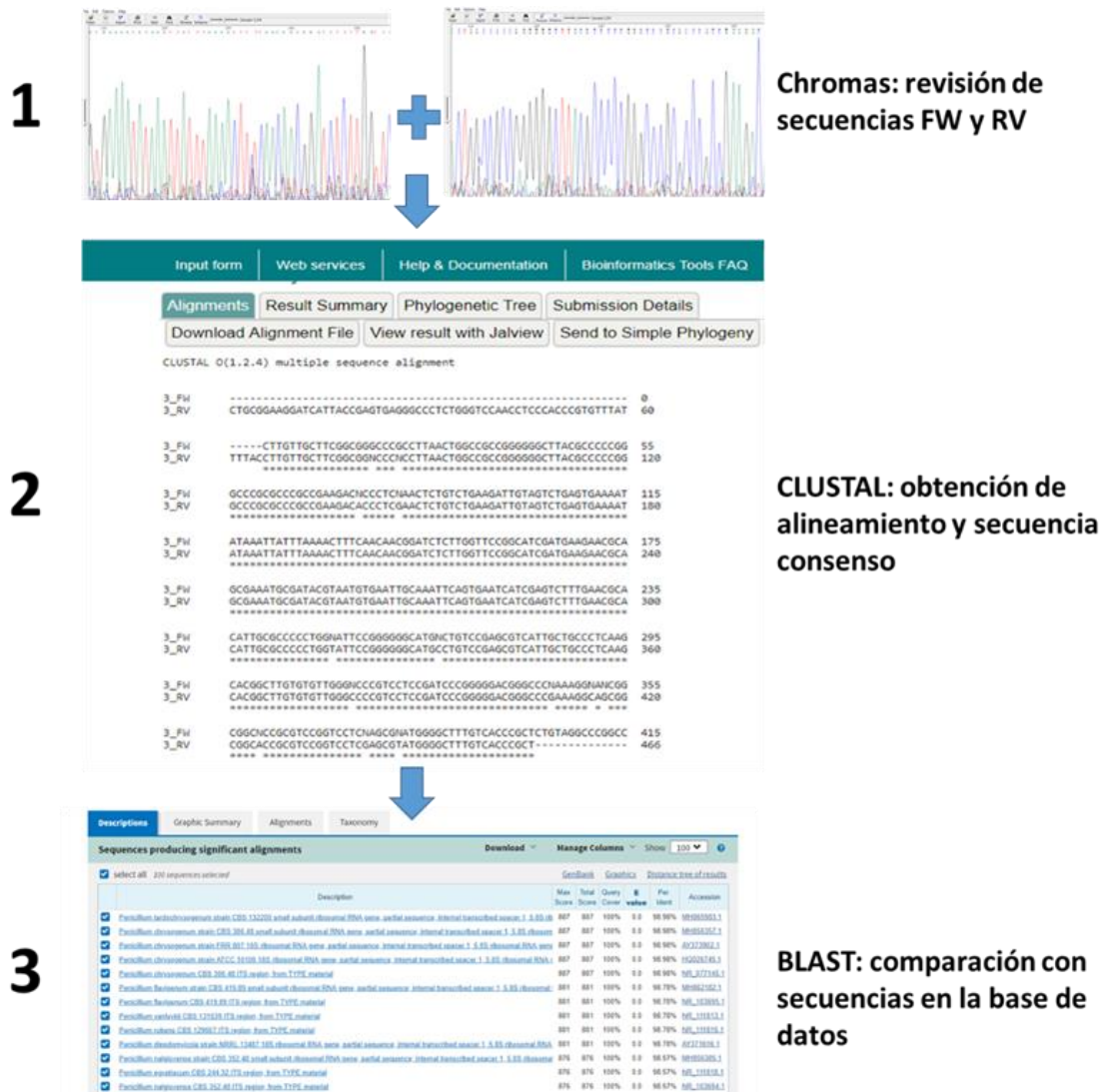


Figura 46. Descripción gráfica de los pasos a seguir en el análisis de las secuencias para la identificación molecular de especies. 1. Los electroferogramas obtenidos son revisados utilizando el software Chromas. 2. Las secuencias FW y RV son alineadas utilizando el servidor CLUSTAL, para obtener una única secuencia consenso a partir del alineamiento. 3. La secuencia consenso es comparada con todas las contenidas en la base de datos mediante el algoritmo BLAST, para obtener una lista de las secuencias según su porcentaje de identidad.

3.4.3. RESULTADOS

Los resultados obtenidos tras la búsqueda en las bases de datos del NCBI y el BOLD (Anexo 11), fueron analizados en profundidad y, una vez analizados y realizada una comparación en ambas bases de datos, se identificaron las siguientes especies presentes en cada una de las muestras (Tabla 7):

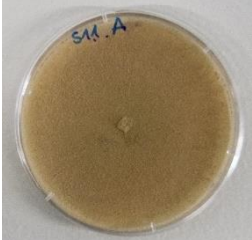


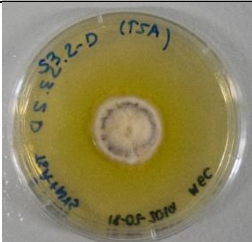

Número de muestra	Especie identificada	Fotografía del cultivo
1	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	
2	<i>Penicillium chrysogenum</i>	
3	<i>Penicillium tardo-chrysogenum</i>	
4	<i>Penicillium tardo-chrysogenum</i>	
5	<i>Aspergillus calidoustus</i>	

Tabla 7. Identificación molecular de especies. Se muestra el número de cada muestra, las posibles especies identificadas tras la comparación de la secuencia en varias bases de datos, así como la fotografía del cultivo puro.

En el caso de la muestra 1, la especie identificada se corresponde con *Byssochlamys spectabilis* (96,82 y 97,14% de identidad en las bases de datos BOLD y NCBI, respectivamente). Se trata de un hongo perteneciente a la familia *Thermoascaceae*, contenida en el grupo de los hongos ascomicetos. Este hongo es comúnmente encontrado en suelos, ambientes interiores, plantas, animales y alimentos. De manera interesante, es capaz de crecer con niveles bajos de oxígeno y en presencia de conservantes. Además, es muy resistente a los tratamientos térmicos y al calor debido a la gruesa pared de sus hifas y la producción de estructuras de resistencia y dispersión denominadas clamidosporas³⁵. Estas características lo convierten en una especie muy frecuente, capaz de contaminar alimentos, por lo que incluso se han desarrollado métodos de detección rápida basados en la PCR que podrían ser aplicados para su detección futura de forma rápida y económica en obras artísticas³⁶.

Tras llevar a cabo la búsqueda en la base de datos BOLD con las secuencias obtenidas para las muestras 2, 3 y 4, se identificó una especie de hongo perteneciente al género *Penicillium*, aunque no fue posible determinar la especie con exactitud. Sin embargo, tras realizar la búsqueda en la base de datos del NCBI, que contiene un mayor número de secuencias, el análisis ha permitido reducir la identificación a dos posibles especies de dicho género: *P. chrysogenum* y *P. tardochrysogenum*. Los porcentajes de identidad y cobertura obtenidos para ambas especies fueron exactamente iguales, lo que indica que poseen la misma secuencia ITS1-2. De hecho, esta característica concuerda con lo descrito en la bibliografía acerca de la identificación de estas dos especies del género *Penicillium*³⁷. Por lo tanto, en este caso la identificación se basa en la morfología de ambos hongos cuando crecen en cultivo puro. *Penicillium chrysogenum* crece formando colonias con alto grado de esporulación y con un micelio que se expande rápidamente,

³⁵ Houbraken, J. et al. Sexual Reproduction as the Cause of Heat Resistance in the Food Spoilage Fungus *Byssochlamys spectabilis* (Anamorph *Paecilomyces variotii*). *Applied and Environmental Microbiology*. 2007 marzo, v. 74, n. 5, p. 1613-1619. [consulta: 27 junio 2019] Recuperado de: <https://aem.asm.org/content/74/5/1613>

³⁶ Hosoya, K., Nakayama, M., Matsuzawa, T., Imanishi, Y., Hitomi, J., & Yaguchi, T. (2012). Risk analysis and development of a rapid method for identifying four species of *Byssochlamys*. *Food control*, 26(1), 169-173.

³⁷ Houbraken J, Frisvad JC, Seifert KA, et al. New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section *Chrysogena*. *Persoonia*. 2012;29:78–100. doi:10.3767/003158512X660571

mientras que *P. tardochrysogenum* genera colonias mucho más restringidas y flocosas³⁸. Esto hace sospechar que en el caso de la muestra 2 se trata de *P. chrysogenum*, mientras que en el caso de las muestras 3 y 4 se trata de *P. tardochrysogenum*. De manera general, a los hongos del género *Penicillium* se les llama mohos azules o verdes, puesto que producen enormes cantidades de esporas verdosas, azuladas y amarillas que les dan sus colores característicos. Es la especie más común en ambientes interiores y es un indicador de humedad.³⁹ Por su parte, *P. chrysogenum* es una especie de hongo que se encuentra en todo el mundo y que, además, es muy conocida debido a su utilización para la elaboración de la penicilina. Se encuentra en el suelo, en la vegetación en descomposición, en el aire y es un contaminante común de muchas sustancias, causando el deterioro de alimentos y objetos de cuero o tela, entre otros.

Finalmente, en el caso de la secuencia obtenida para la muestra 5, ha permitido identificar a la cepa aislada como *Aspergillus calidoustus*. Se trata de un hongo filamentoso común que se encuentra en los alimentos, en el suelo y en el aire en todo el mundo. Las colonias de esta especie pueden variar desde marrón hasta el gris. Además, cabe destacar que *Aspergillus calidoustus* es capaz de causar infecciones en humanos inmunocomprometidos, y se ha detectado una disminución de su susceptibilidad a varios medicamentos antifúngicos.⁴⁰

De manera general, en base a la identificación molecular y a la morfología observada en los cultivos, es posible concretar en cuántos de los supuestos se encontraba cada especie. Así, *Byssochalamys spectabilis* se encuentra en el Supuesto 1; *Penicillium chrysogenum* los Supuestos 2 y 3; *Penicillium tardochrysogenum* en los Supuestos 1, 2 y 3; y *Aspergillus calidoustus* solamente en el supuesto 3.

³⁸ Houbraken J, Frisvad JC, Seifert KA, et al. New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section *Chrysogena*. *Persoonia*. 2012;29:78–100. doi:10.3767/003158512X660571

³⁹ Kung'u, J. (2017). *Penicillium* [en línea]. En: Mold & Bacteria Consulting Laboratories. Ontario: Mold & Bacteria Consulting Laboratories. [consulta: 27 junio 2019] Recuperado de <https://www.moldbacteria.com/mold/penicillium.html>

⁴⁰ Varga, J. et al. *Aspergillus calidoustus* sp. nov., Causative Agent of Human Infections Previously Assigned to *Aspergillus ustus*. *Eukaryot Cell*, 2008 abril, v. 7, n. 4, p. 630-638. [consulta: 27 junio 2019] Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2292628/>

4. CONCLUSIONES

El análisis multiespectral permite determinar la presencia de biodeterioro y el alcance del mismo, destacando entre todas las técnicas la fluorescencia ultravioleta debido a la capacidad de algunos hongos de emitir fluorescencia al ser excitados por una luz ultravioleta. Esto nos permite no solo ver la distribución de los hongos en las obras, sino diferenciar distintos tipos de fluorescencia que podrían suponer la presencia de especies diferentes. En el Supuesto 1 ha sido especialmente importante la fluorescencia ultravioleta para comprobar la distribución del biodeterioro en el fondo de la obra, rodeando perfectamente la figura. Esto nos hace pensar que es un componente del fondo que no se utilizó para la figura el que propicia el crecimiento del hongo *Byssochlamys spectabilis*. En los Supuestos 2 y 3 la extensión del biodeterioro parecía estar más clara debido a las características cromáticas del *Penicillium chrysogenum* y *tardochrysogenum*. Sin embargo, gracias a la fluorescencia ultravioleta se distinguió un cierto tono anaranjado debajo del verde característico de *Penicillium* que se extendía en una mayor superficie. El análisis con infrarrojo no ha aportado información sobre el biodeterioro, aunque proporciona información importante para el estudio de la técnica del artista, como pueden ser los dibujos preparatorios y las cuadrículas.

El microscopio digital con luz visible permite apreciar la morfología y la forma de crecimiento de los hongos, poniendo de manifiesto las hifas y las esporas, y cómo las hifas se entrelazan con las fibras del tejido. Además, también permite comprobar la extensión del biodeterioro. En el caso de los Supuestos 2 y 3, el microscopio digital permitió comprobar que la fluorescencia anaranjada percibida en la fluorescencia ultravioleta era efectivamente un hongo. Y en el caso del Supuesto 1, también dejó ver la forma de crecimiento del agente biodeteriígeno y cómo está penetrando en la capa pictórica.

Por último, la identificación molecular de especies permitió identificar cuatro especies diferentes: *Byssochlamys spectabilis* en el Supuesto 1, *Penicillium chrysogenum* en el Supuestos 2, *Penicillium tardochrysogenum* en los supuestos 2 y 3, y *Aspergillus calidoustus* en el Supuesto 3. Tras el estudio de las especies se puede concluir que en los Supuestos 2 y 3 es segura la ausencia de bacterias debido a la presencia de los hongos

Penicillium chrysogenum y *tardochrysogenum*, principales componentes de la penicilina. Además, la característica de resistencia a altas temperaturas de la especie *Byssochlamys spectabilis* y la inmunidad ante muchos de los antifúngicos del hongo *Aspergillus calidoustus* hacen evidente la imposibilidad de un tratamiento general para todas las especies de hongos, y apoyando de esta manera la importancia de la realización de estos análisis y la necesidad de tratamientos individualizados para cada caso.

En definitiva, el análisis del biodeterioro y la identificación de las especies que degradan las obras del patrimonio cultural es importante porque nos proporciona información precisa sobre el microorganismo concreto, permitiendo llevar a cabo tratamientos específicos para cada obra que aseguren la eliminación total del agente biodeteriígeno.

5. BIBLIOGRAFÍA

Aleksandr Morgulis, George Coulouris, Yan Raytselis, Thomas L. Madden, Richa Agarwala, Alejandro A. Schäffer (2008), "Database Indexing for Production MegaBLAST Searches", *Bioinformatics* 24:1757-1764.

Biodeterioro del Patrimonio Cultural. (2019). Recuperado de <https://www.iaph.es/web/canales/Ciencias Experimentales y Patrimonio Cultural/biologia/biodeterioro/index.html>

Caneva, G., Nugari, M. P., Salvadori, O. (2000). *La biología en la restauración*. Guipúzcoa: Nerea.

CHROMA: consensus-based colouring of multiple alignments for publication. *Bioinformatics*. 2001 Sep;17(9):845-6.

Espinosa Ipinza, F., Rivas Poblete, V. (2011). Fluorescencia visible inducida por radiación UV. Sus usos en conservación y diagnóstico de colecciones. Una revisión crítica. *Conserva* (nº16). Recuperado de:

http://www.patrimoniocultural.gob.cl/dinamicas/DocAdjunto_1736.pdf

Fotografía científica - Fotogasull. (2019). Recuperado de <https://fotogasull.art/es/fotografia-cientifica/>

Gómez, M, L. (1998) *La restauración. Examen científico aplicado a la conservación de obras de arte*. Madrid: Ediciones Cátedra.

Guillén Brufal, N. (2012). *Estudio comparativo de las metodologías de aplicación de sustancias fungicidas en los soportes de pintura sobre lienzo* (Trabajo Final de Máster). Universitat politècnica de València.

Hosoya, K., Nakayama, M., Matsuzawa, T., Imanishi, Y., Hitomi, J., & Yaguchi, T. (2012). Risk analysis and development of a rapid method for identifying four species of *Byssochlamys*. *Food control*, 26(1), 169-173.

Houbraken J, Frisvad JC, Seifert KA, et al. New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section *Chrysogena*. *Persoonia*. 2012;29:78–100. doi:10.3767/003158512X660571

Houbraken, J., Varga, J., Rico Munoz, E., Johnson, S., & Samson, R. A. (2007, 22 diciembre). Sexual Reproduction as the Cause of Heat Resistance in the Food Spoilage Fungus *Byssosclamyces spectabilis* (Anamorph *Paecilomyces variotii*). Recuperado 27 junio, 2019, de: <https://aem.asm.org/content/74/5/1613>

Kuhar, F., Castiglia, V., Papinutti, L. (2013). Reino Fungi: morfologías y estructuras de los hongos. Revista Boletín Biológica nº 28. Recuperado de: <https://core.ac.uk/download/pdf/52479411.pdf>

Kung'u, J. (2017, 26 febrero). Penicillium - Mold & Bacteria Consulting Laboratories. Recuperado 27 junio, 2019, de <https://www.moldbacteria.com/mold/penicillium.html>

Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. and Clark, D. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson Education.

Matteini, M., Moles, A. (2001). *Ciencia y restauración*. Guipúzcoa: Editorial Nerea.

Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7, 355-364. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x

Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D. and Higgins D.G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega.

Valgañón, V. (2008). *Biología aplicada a la conservación y restauración*. Madrid: Editorial Síntesis, S.A.

Varga, J., Houbraken, J., Van Der Lee, H. A. L., Verweij, P. E., & Samson, R. A. (2008, 1 abril). *Aspergillus calidoustus* sp. nov., Causative Agent of Human Infections Previously Assigned to *Aspergillus ustus*. Recuperado 27 junio, 2019, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2292628/>

Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14.

6. ANEXOS

ANEXO 1. IMÁGENES GENERALES SUPUESTO 1



Figura 47. Visible anverso

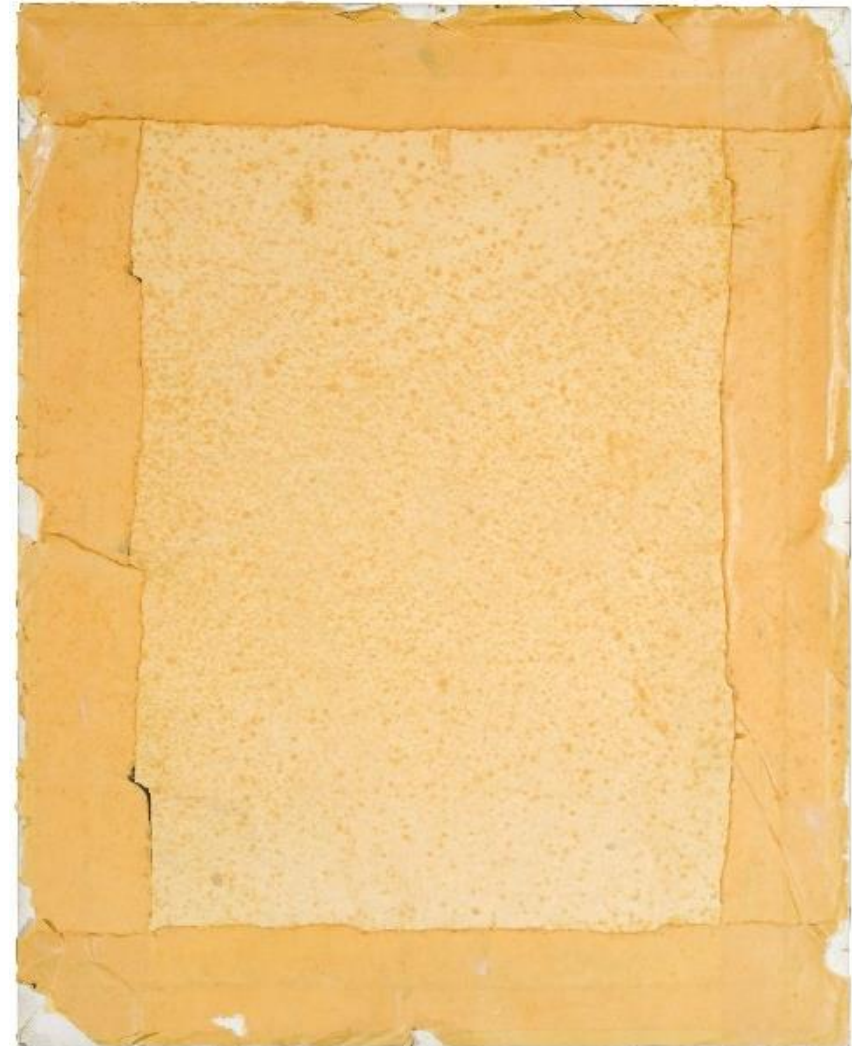


Figura 48. Visible reverso



Figura 49. Infrarrojo anverso

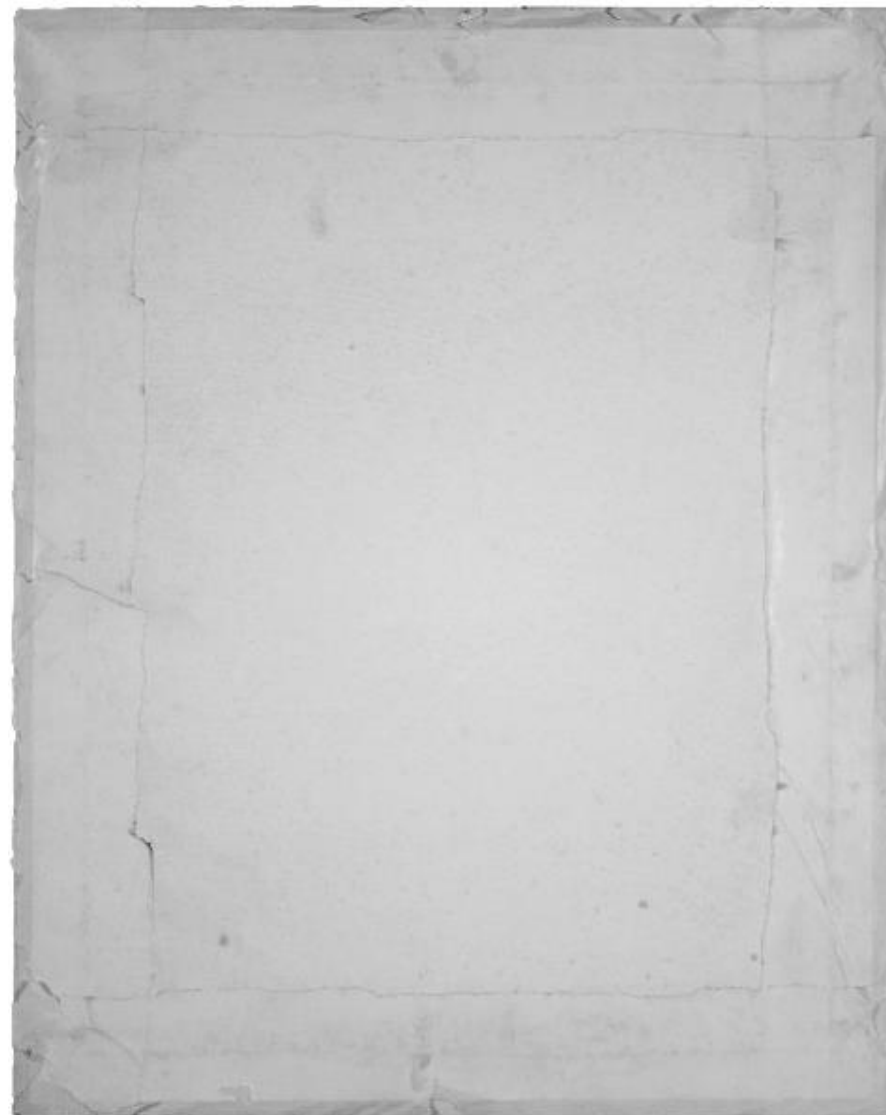


Figura 50. Infrarrojo reverso



Figura 51. Fluorescencia UV anverso

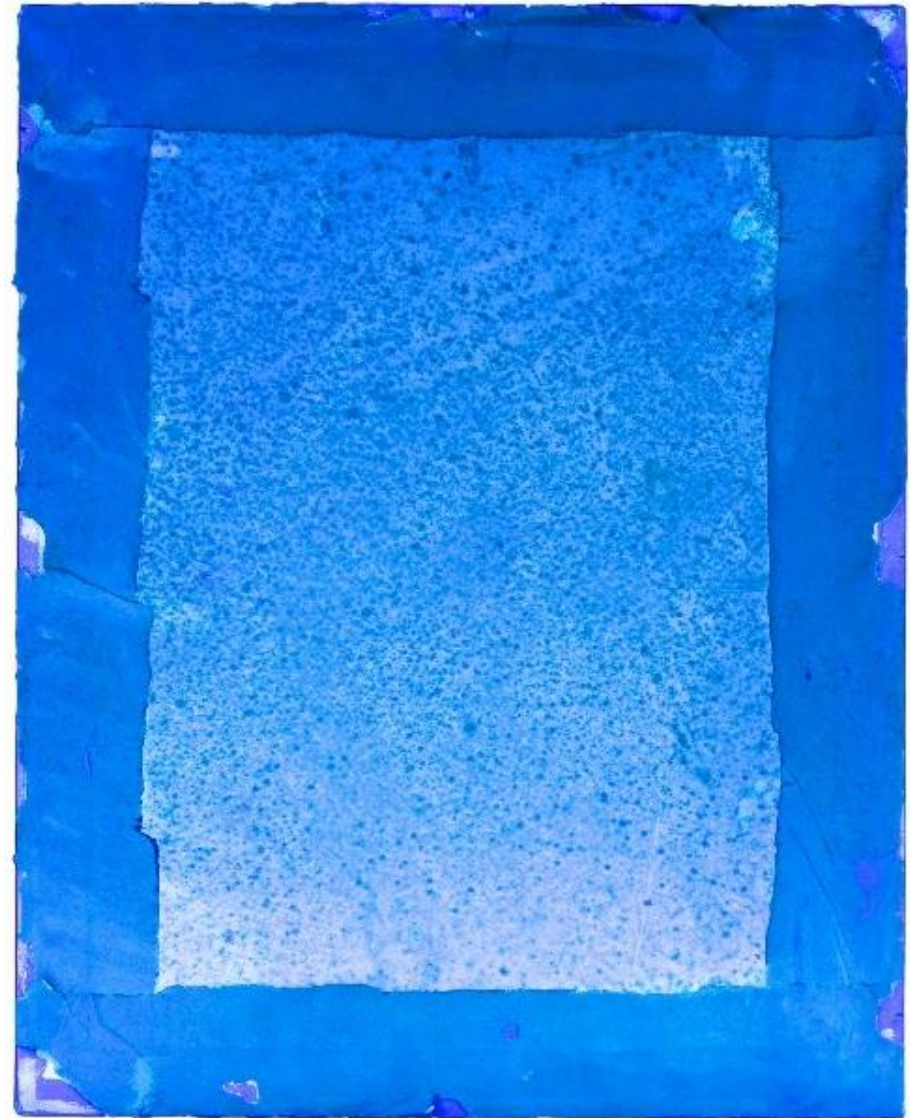


Figura 52. Fluorescencia UV reverso

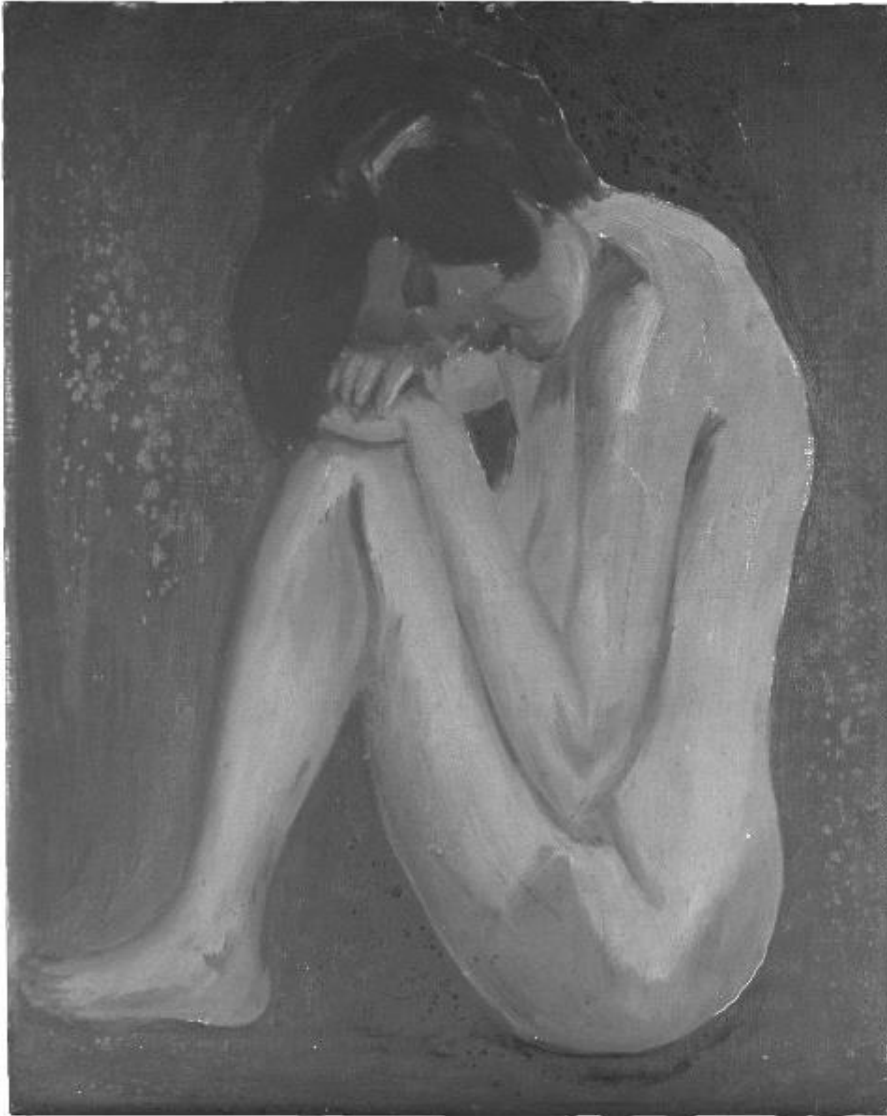


Figura 53. Reflectografía UV anverso

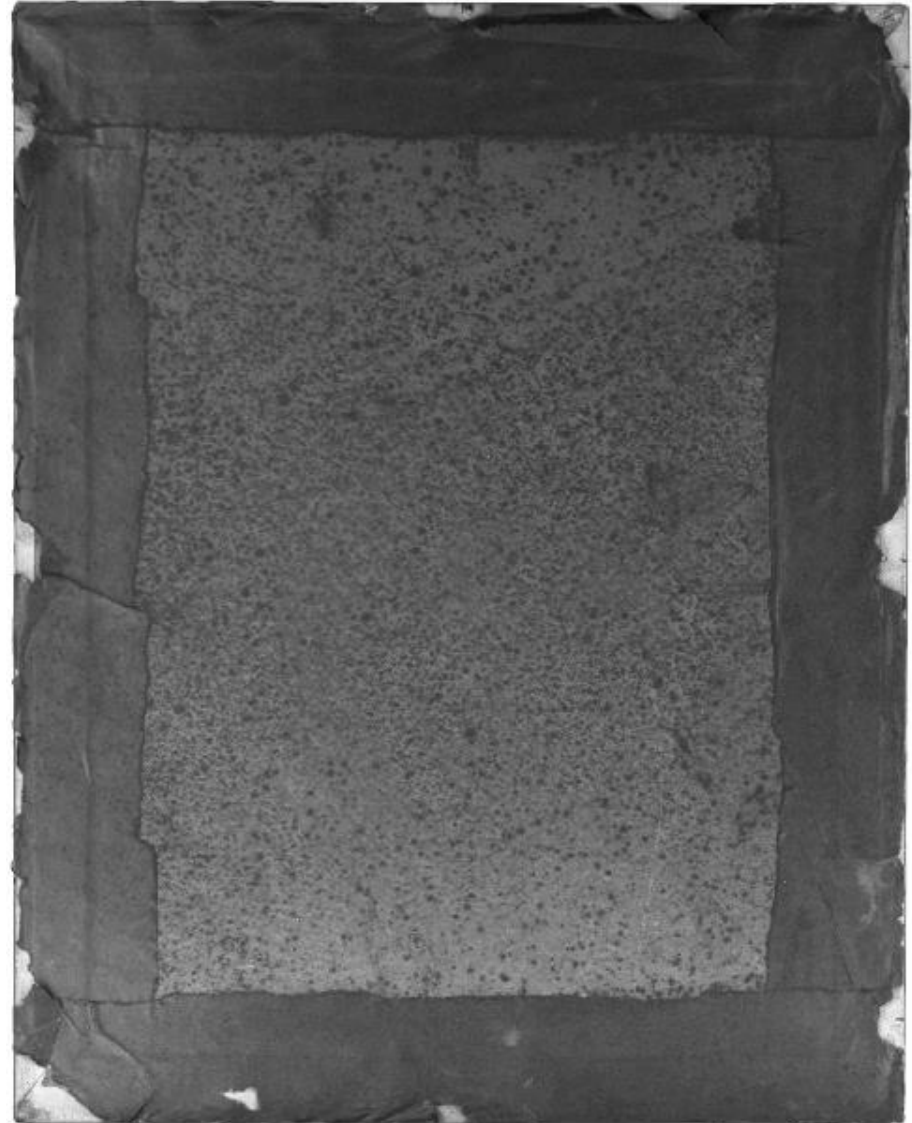


Figura 54. Reflectografía UV reverso

ANEXO 2. IMÁGENES DE DETALLE SUPUESTO 1



DETALLE 1



Figura 55. Visible

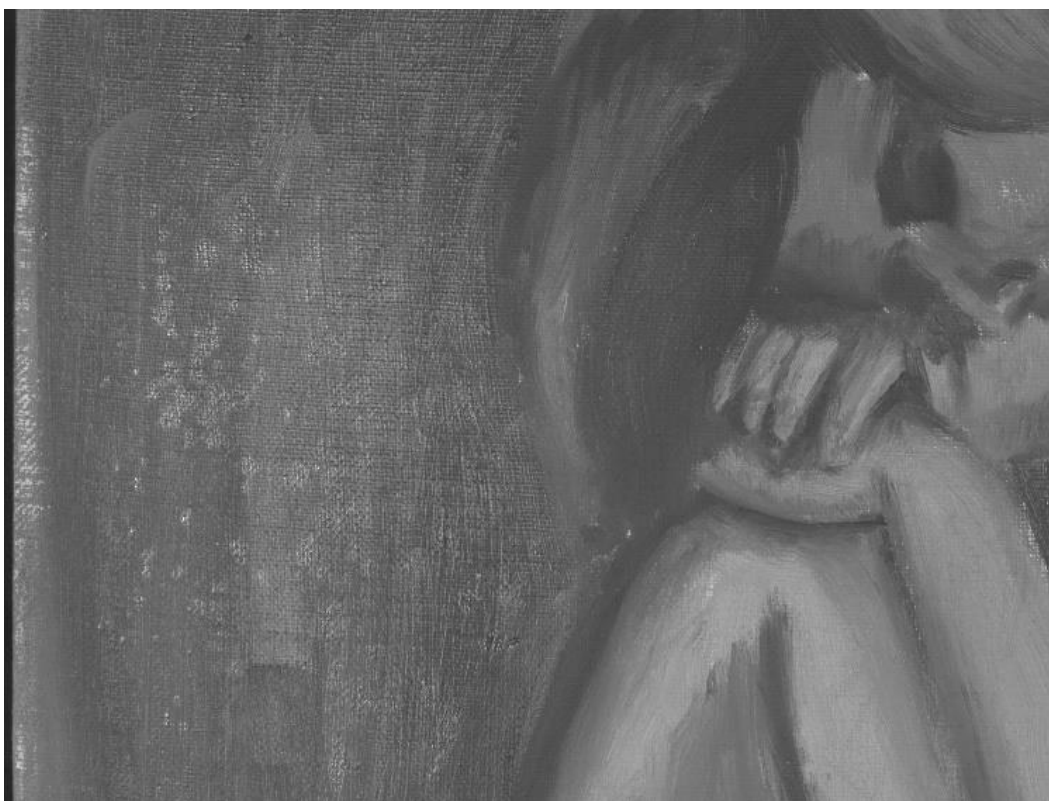


Figura 56. Visible en blanco y negro



Figura 57. Infrarrojo 1



Figura 58. Infrarrojo 2



Figura 59. Fluorescencia UV



Figura 60. Reflectografía UV

DETALLE 2



Figura 61. Visible

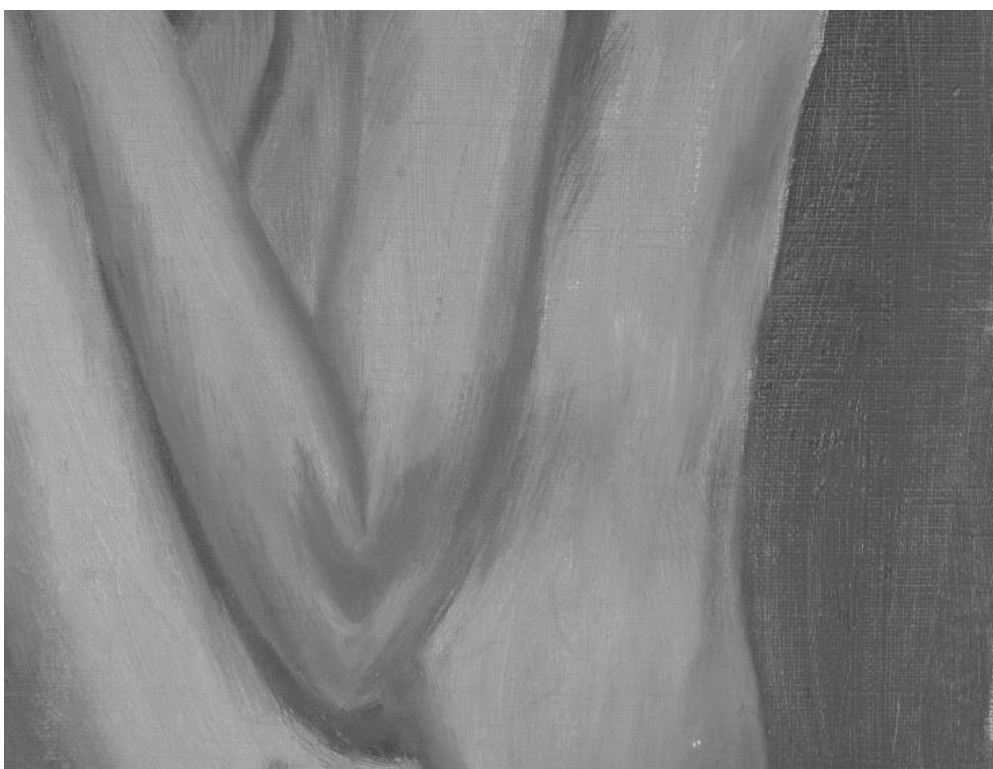


Figura 62. Visible en blanco y negro

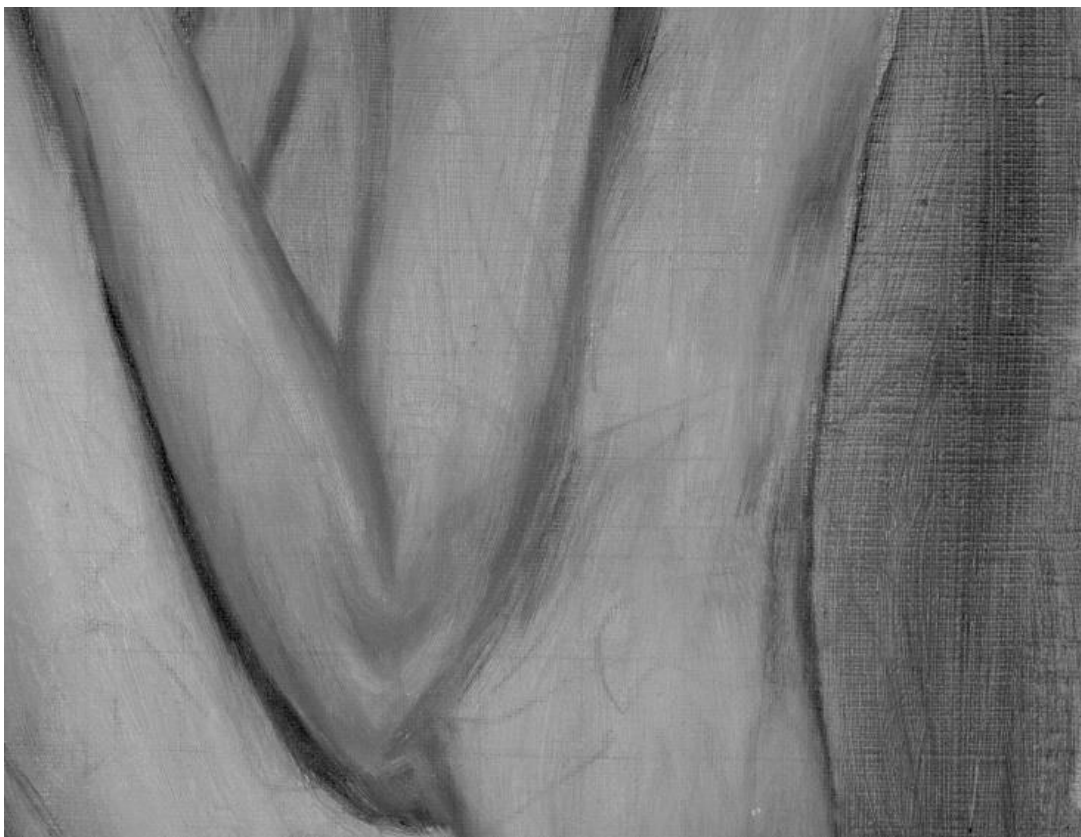


Figura 63. Infrarrojo 1

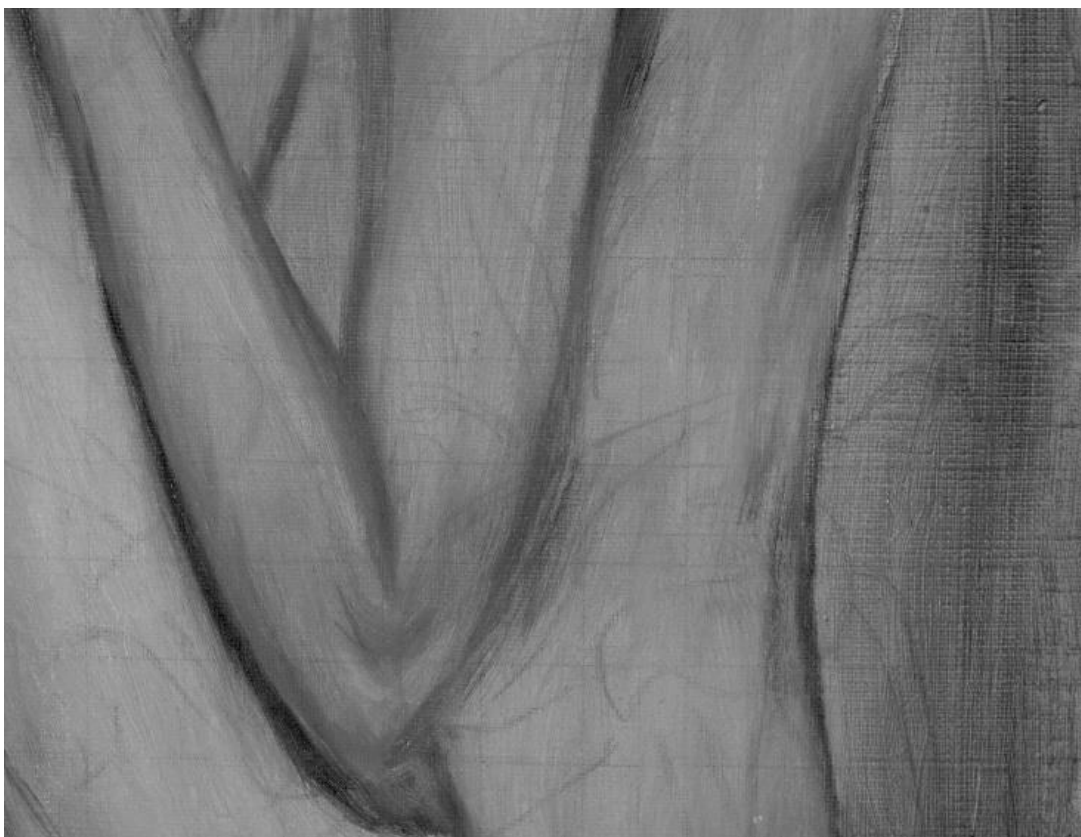


Figura 64. Infrarrojo 2



Figura 65. Fluorescencia UV

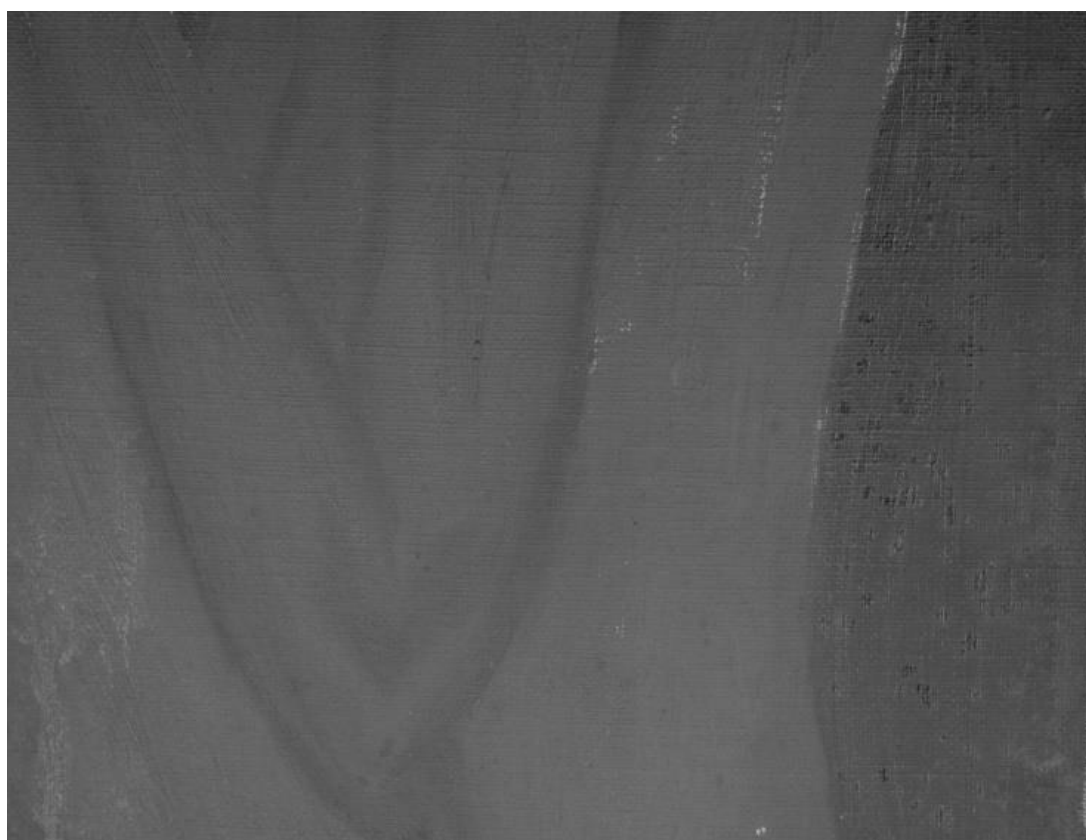


Figura 66. Reflectografía UV

ANEXO 3. FOTOGRAFÍAS CON MICROSCOPIO DIGITAL SUPUESTO 1

- Visible (x 60)
- Visible (x 210)



Figura 67. Localización de las fotografías realizadas con el microscopio digital

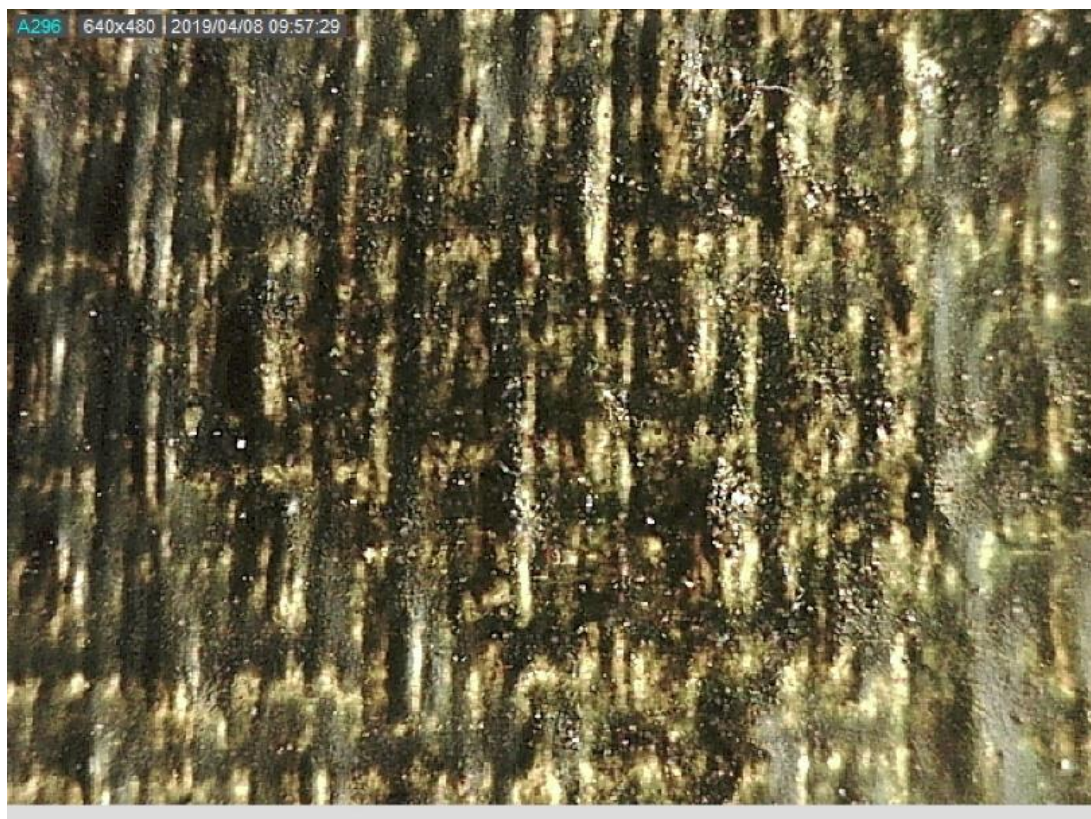


Figura 68. Micro número 1

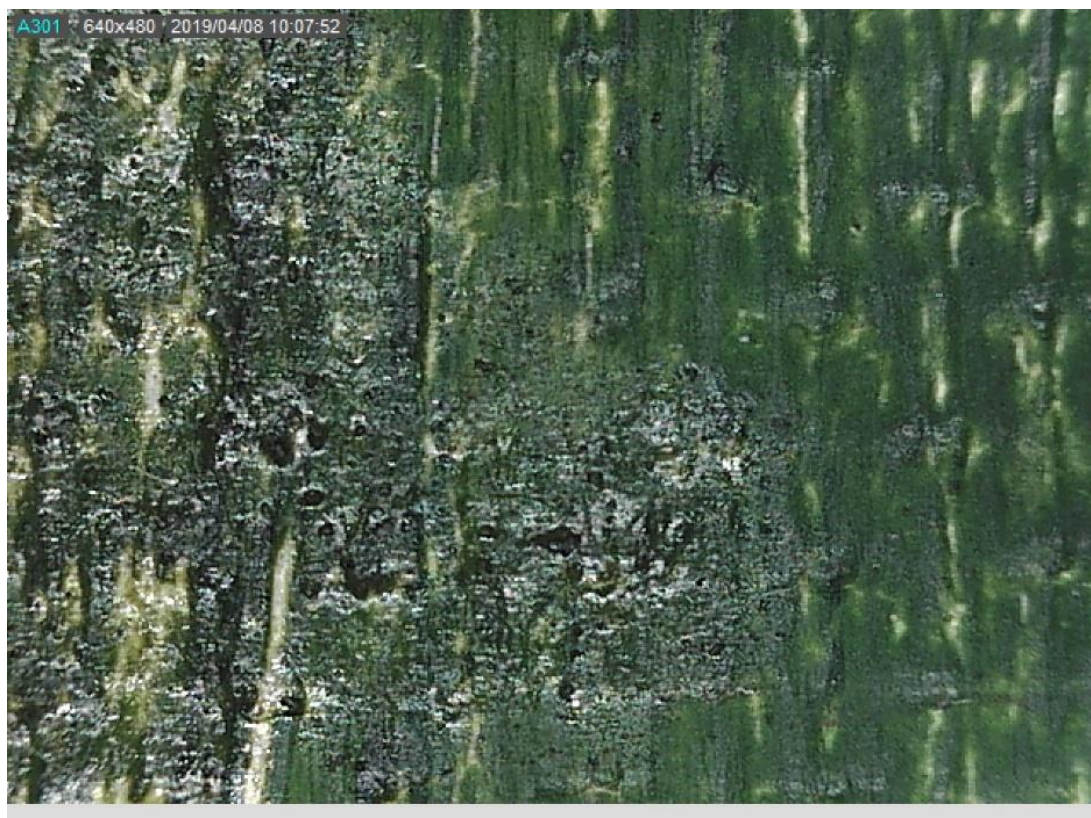


Figura 69. Micro número 2



Figura 70. Micro número 3

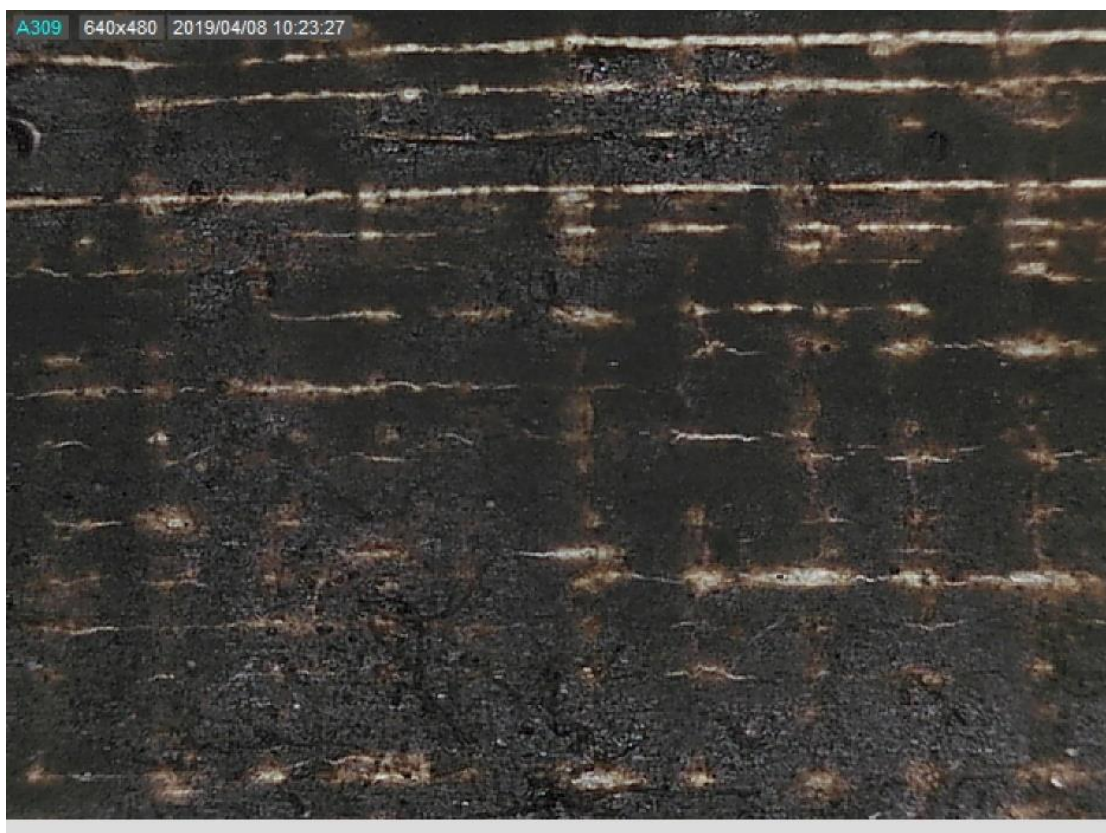


Figura 71. Micro número 4



Figura 72. Micro número 5



Figura 73. Micro número 6



Figura 74. Micro número 7



Figura 75. Micro número 8

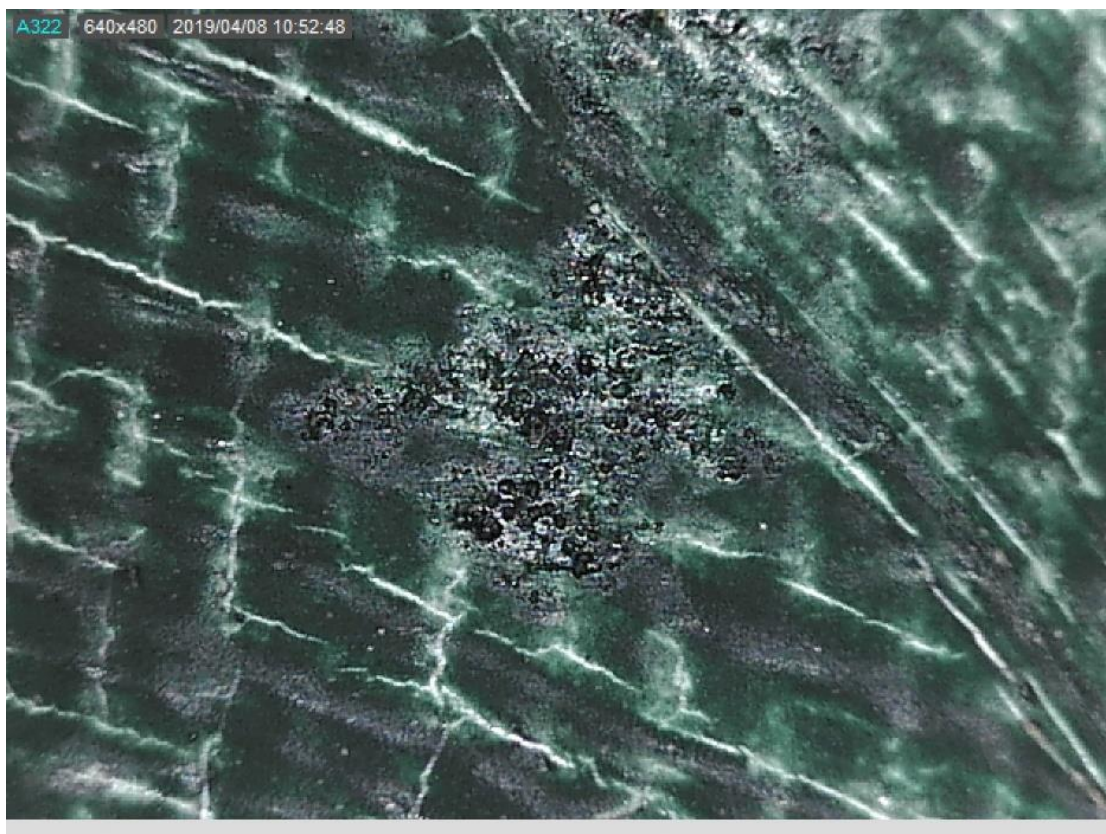


Figura 76. Micro número 9

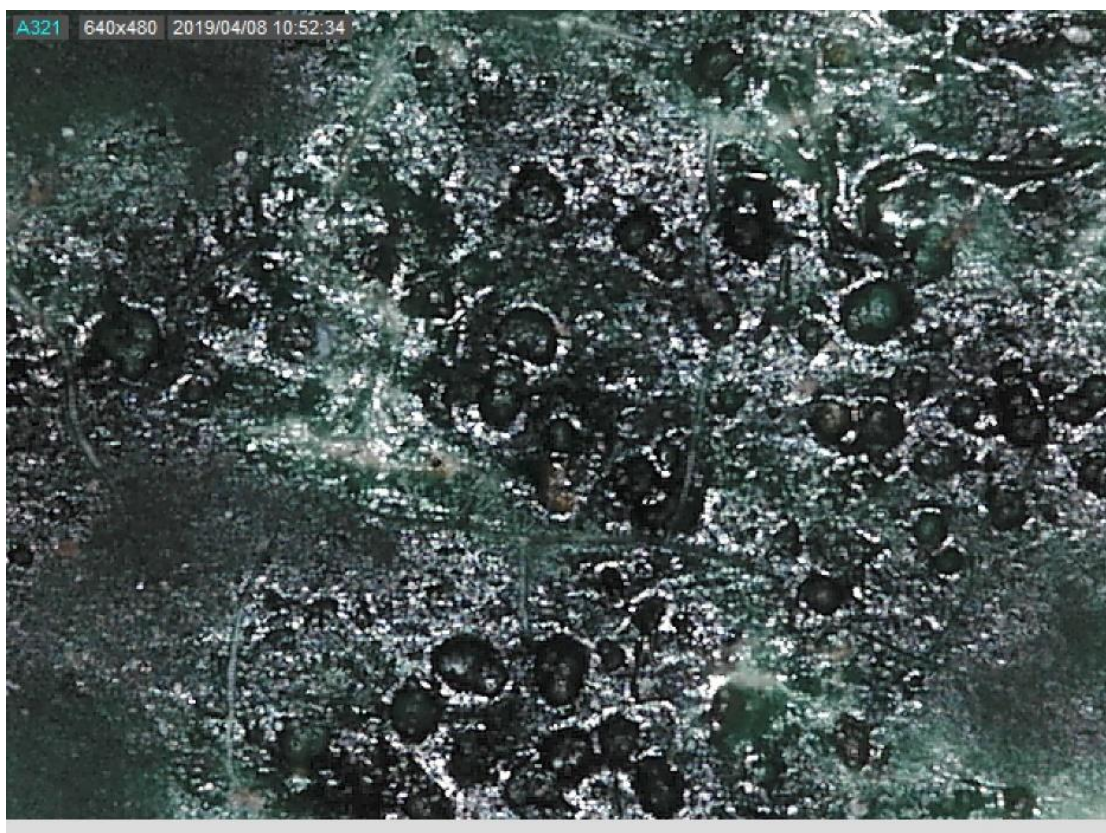


Figura 77. Micro número 10

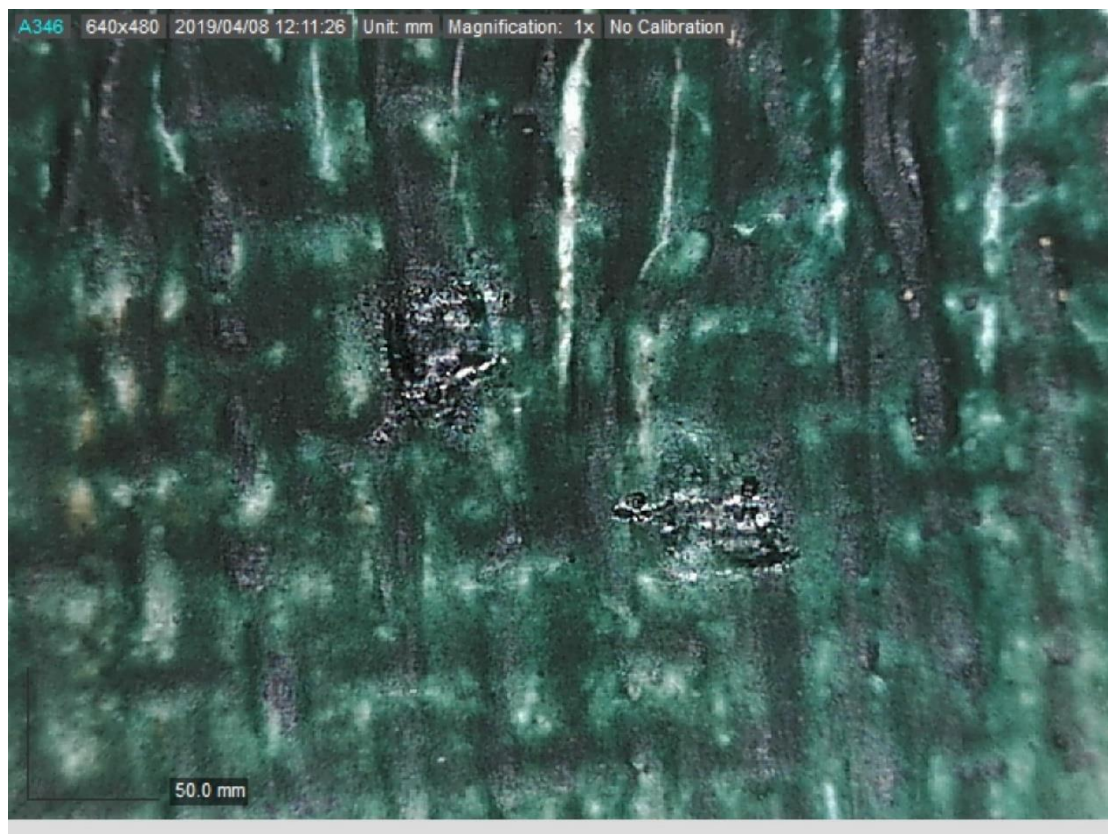


Figura 78. Micro número 11

ANEXO 4. IMÁGENES GENERALES SUPUESTO 2



Figura 79. Visible anverso



Figura 80. Visible reverso



Figura 81. Infrarrojo anverso

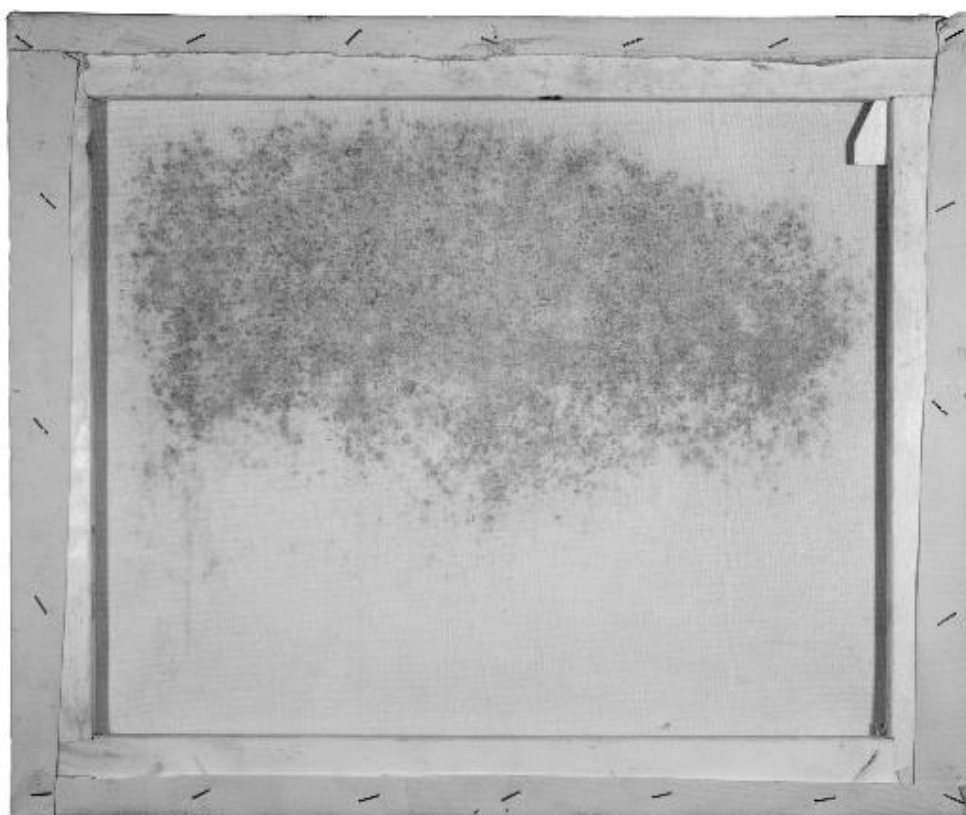


Figura 82. Infrarrojo reverso



Figura 83. Fluorescencia UV anverso

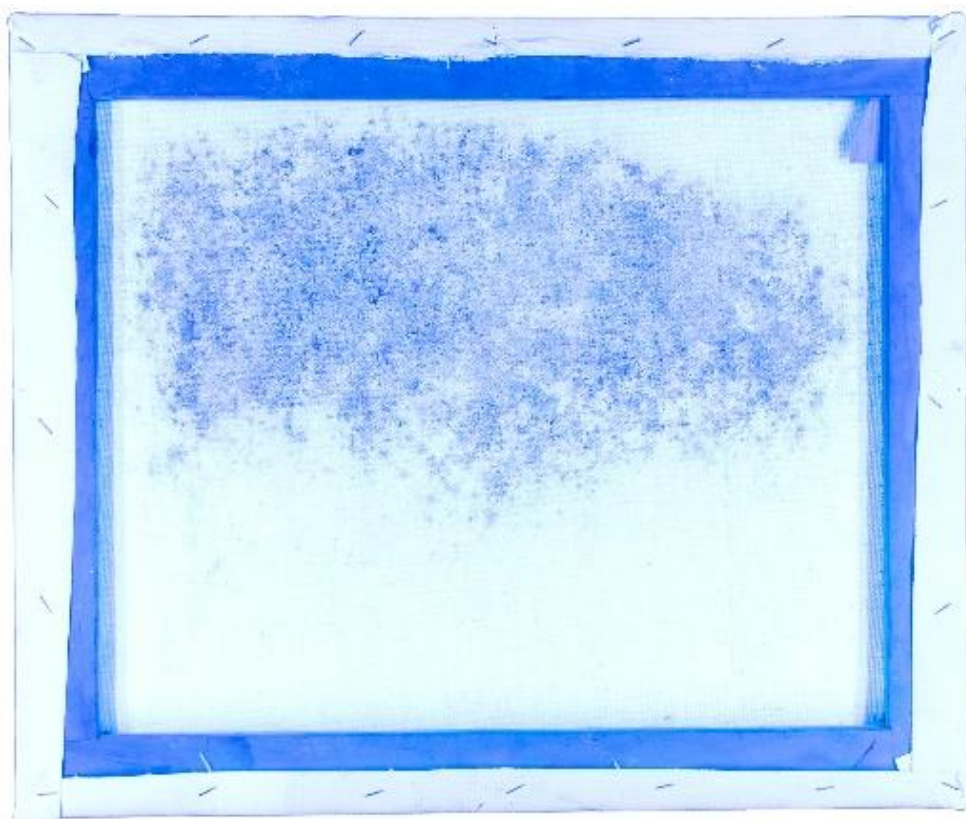


Figura 84. Fluorescencia UV reverso



Figura 85. Reflectografía UV anverso

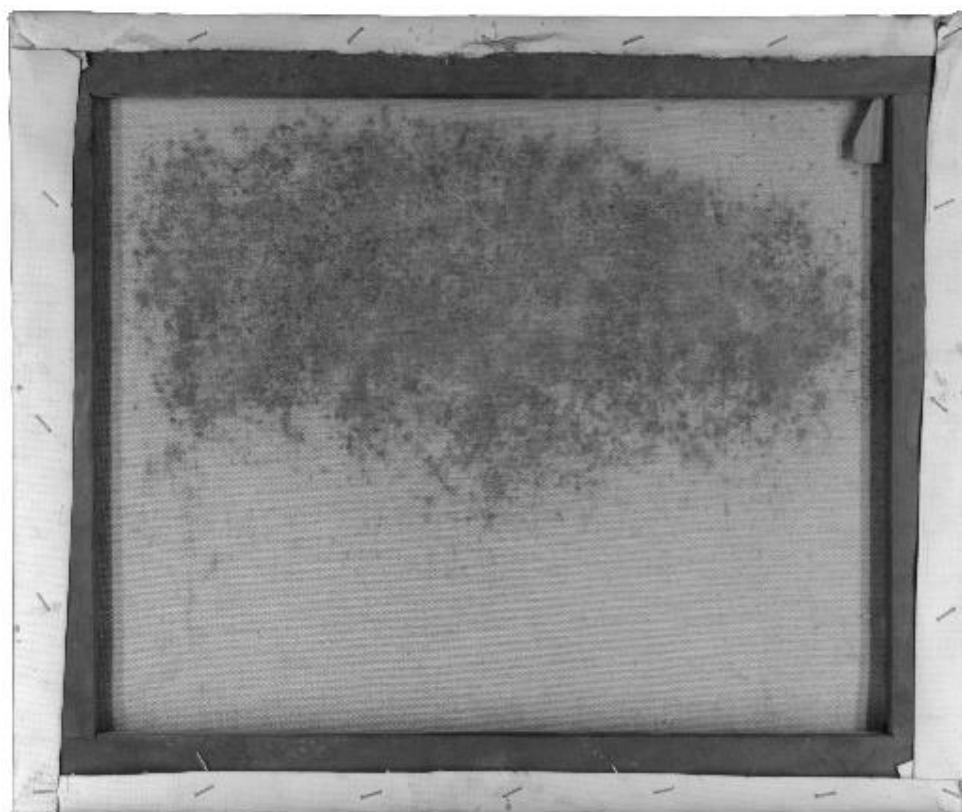


Figura 86. Reflectografía UV reverso

ANEXO 5. IMÁGENES DE DETALLE SUPUESTO 2

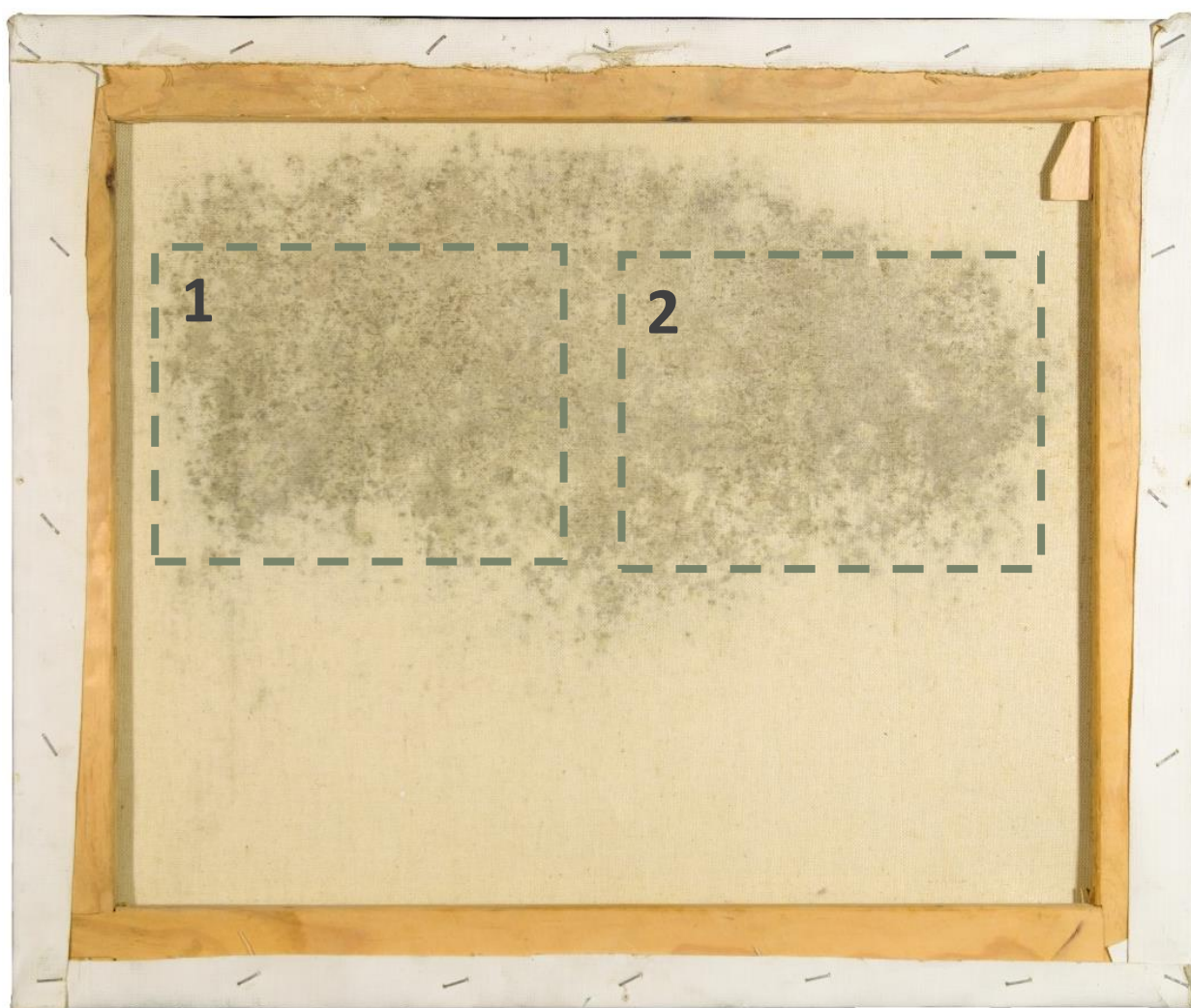


Figura 87. Localización de los detalles

DETALLE 1



Figura 88. Visible

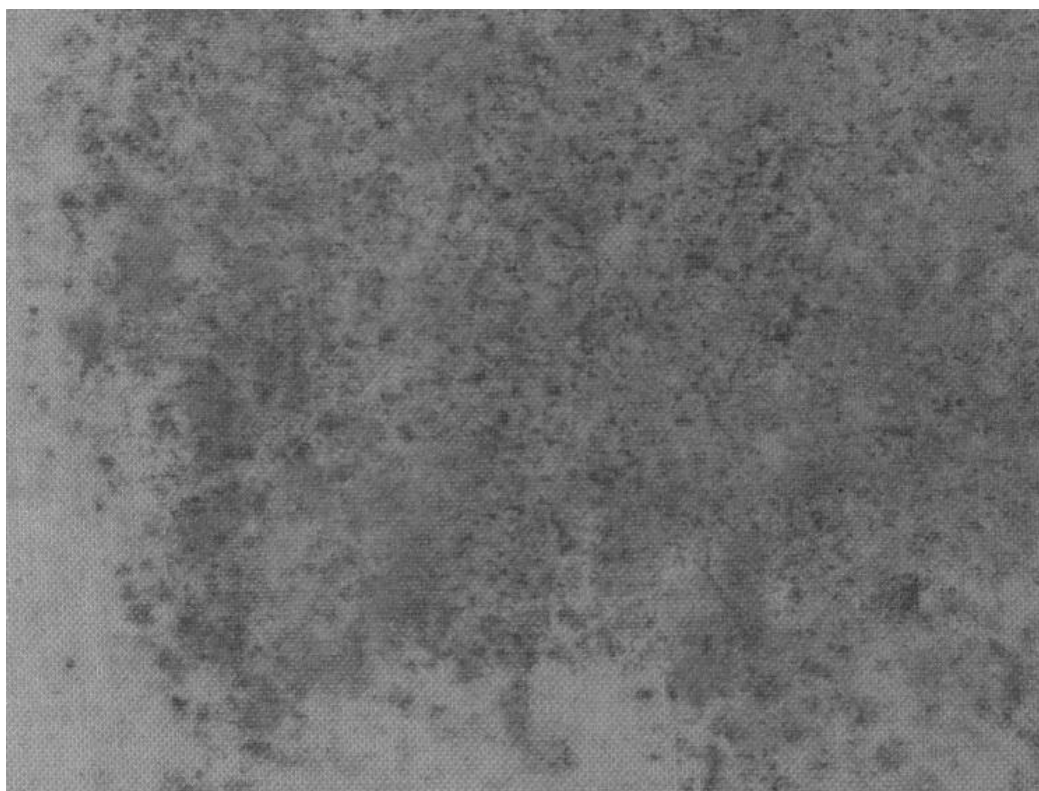


Figura 89. Visible en blanco y negro

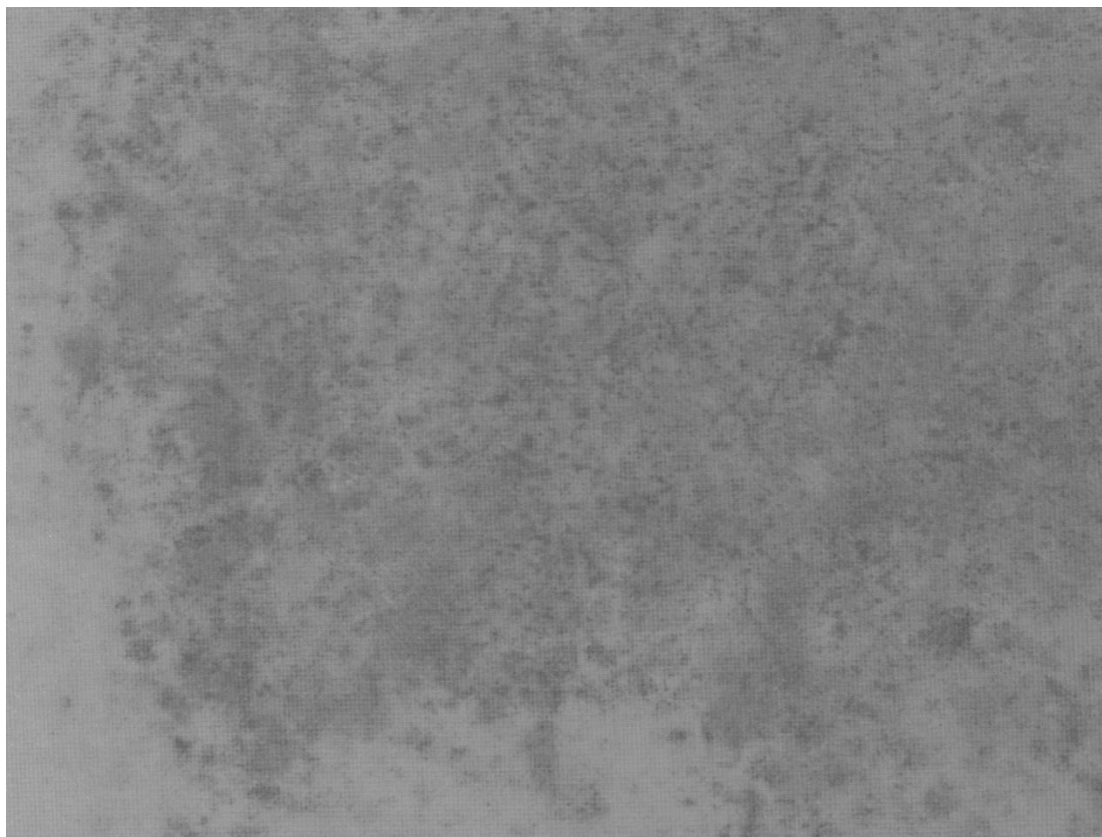


Figura 90. Infrarrojo 1



Figura 91. Infrarrojo 2

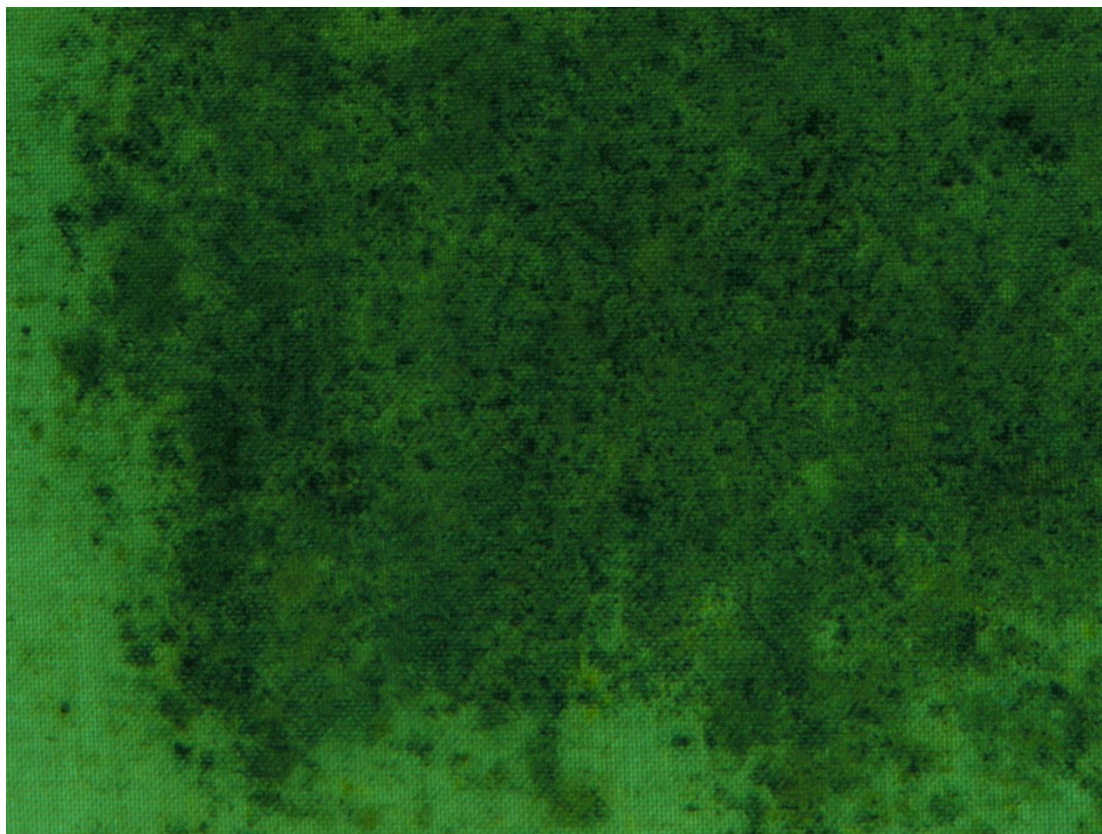


Figura 92. Fluorescencia UV



Figura 93. Reflectografía UV

DETALLE 2



Figura 94. Visible

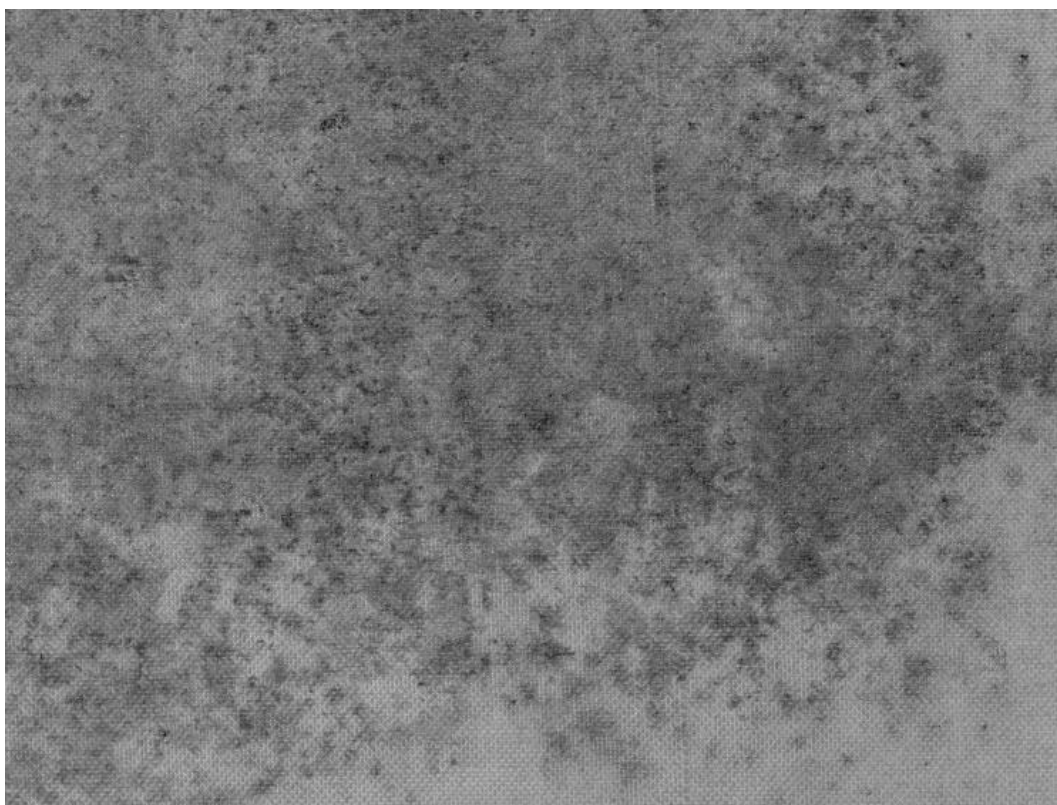


Figura 95. Visible en blanco y negro

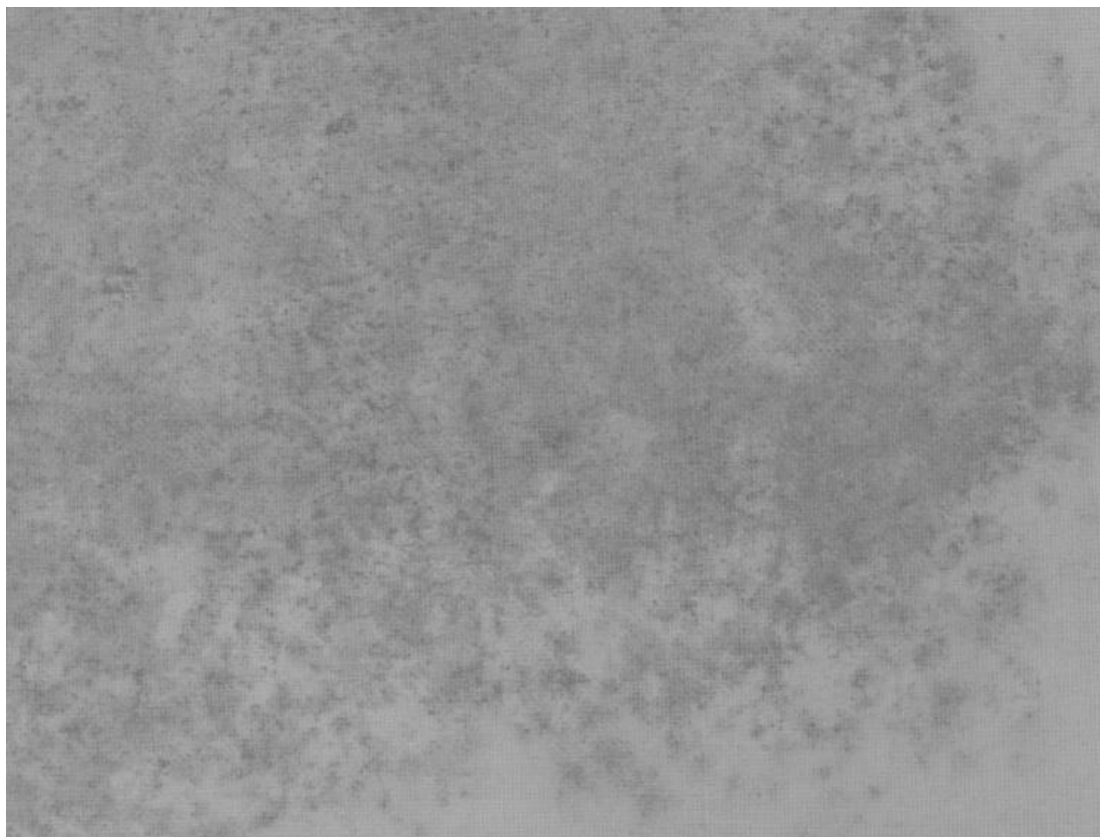


Figura 96. Infrarrojo 1



Figura 97. Infrarrojo 2

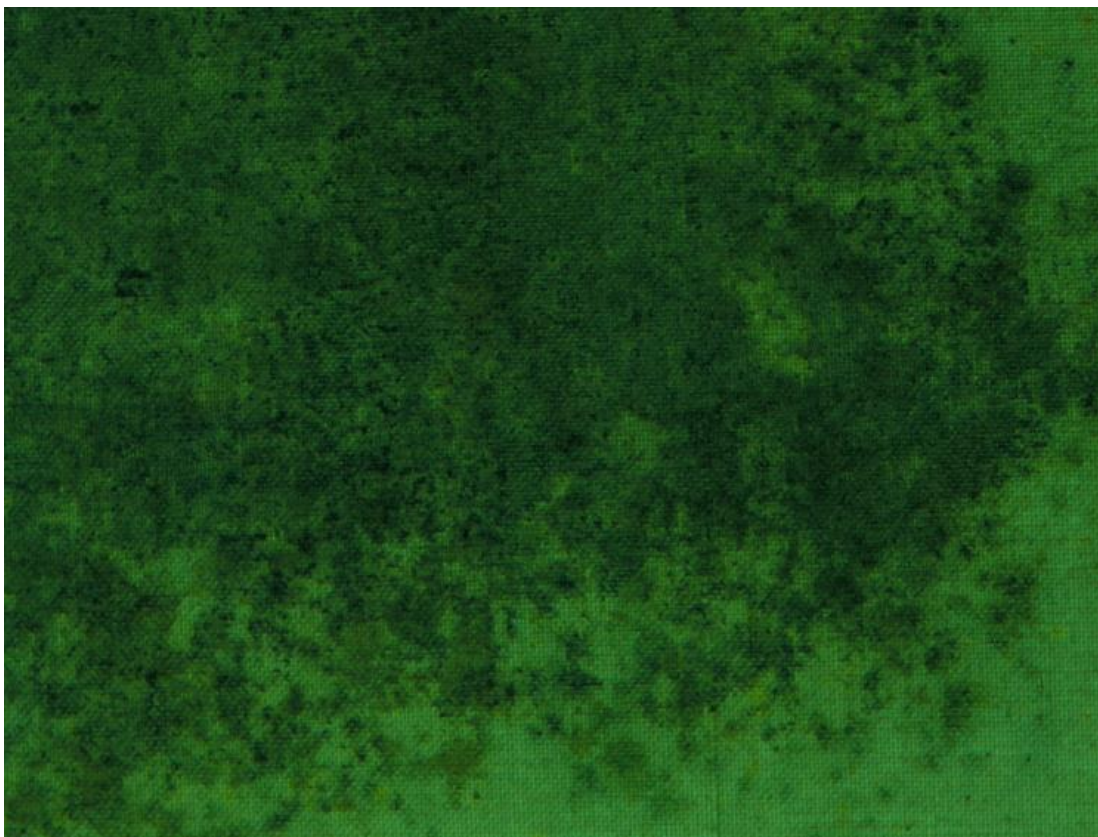


Figura 98. Fluorescencia UV



Figura 99. Reflectografía UV

ANEXO 6. FOTOGRAFÍAS CON MICROSCOPIO DIGITAL SUPUESTO 2

- Visible (x 60)
- Visible (x 210)



Figura 100. Localización de las fotografías con el microscopio digital

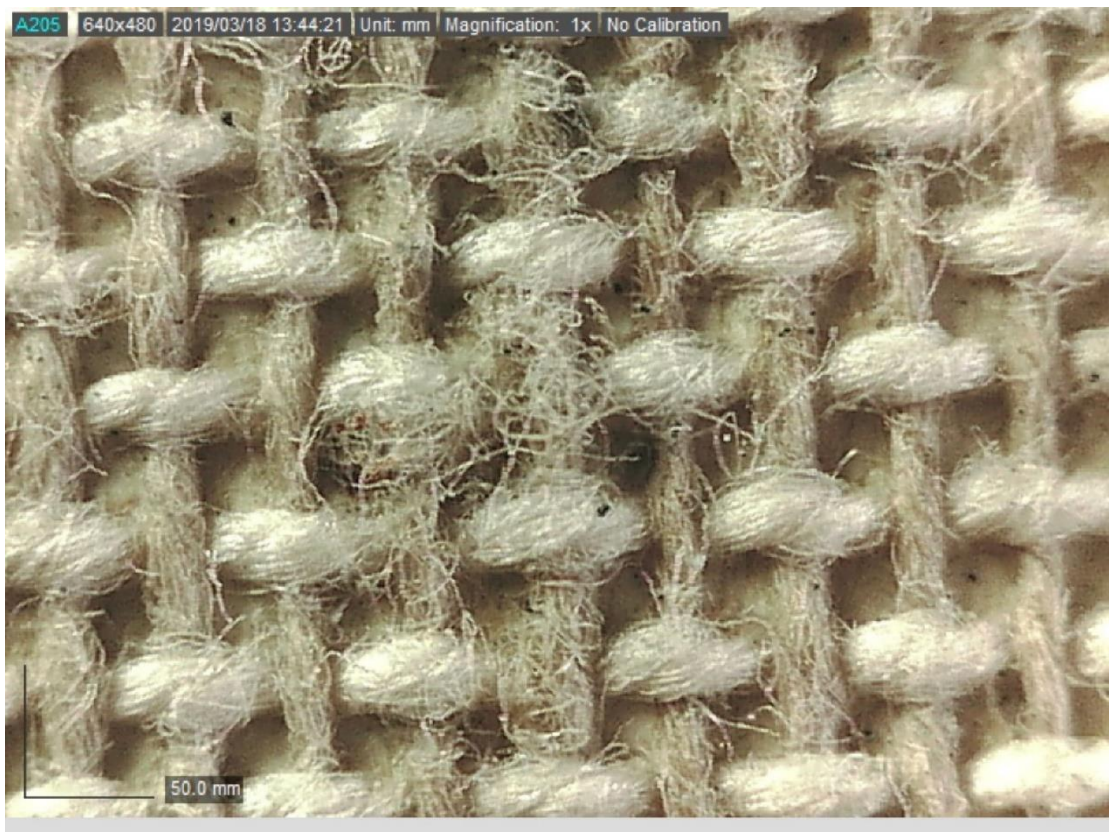


Figura 101. Micro número 1



Figura 102. Micro número 2



Figura 103. Micro número 3

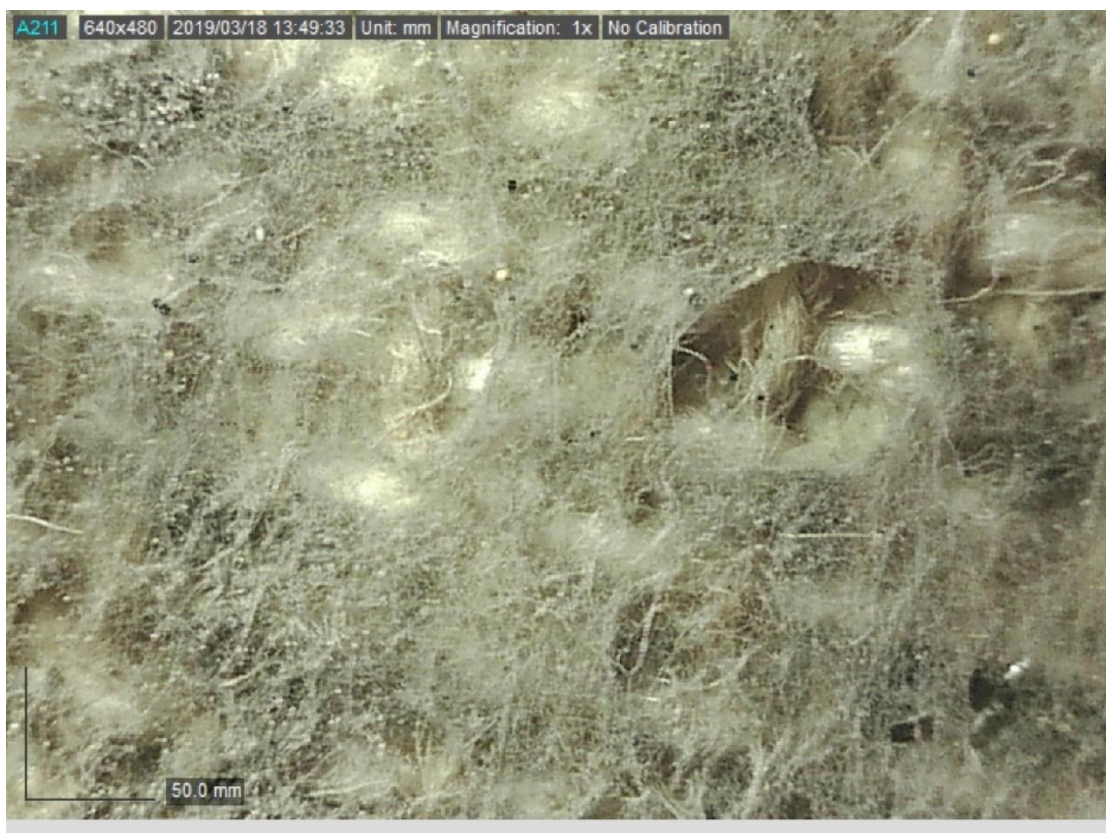


Figura 104. Micro número 4



Figura 105. Micro número 5

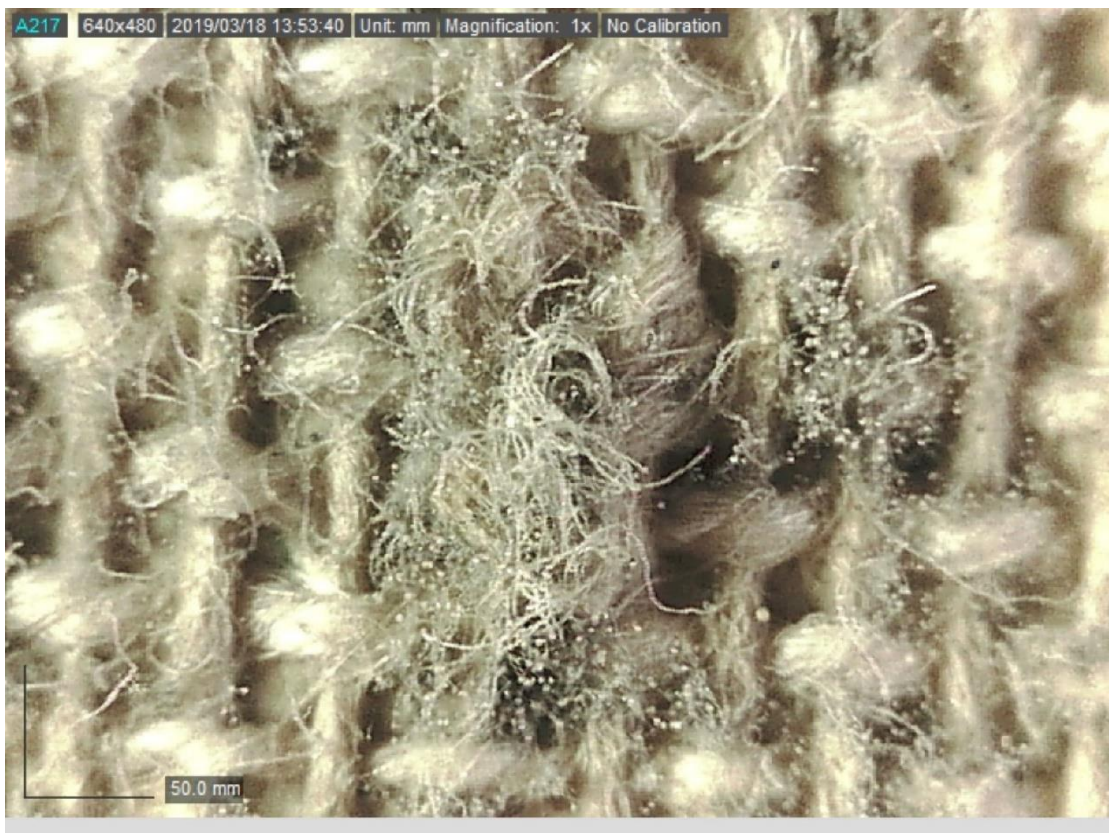


Figura 106. Micro número 6

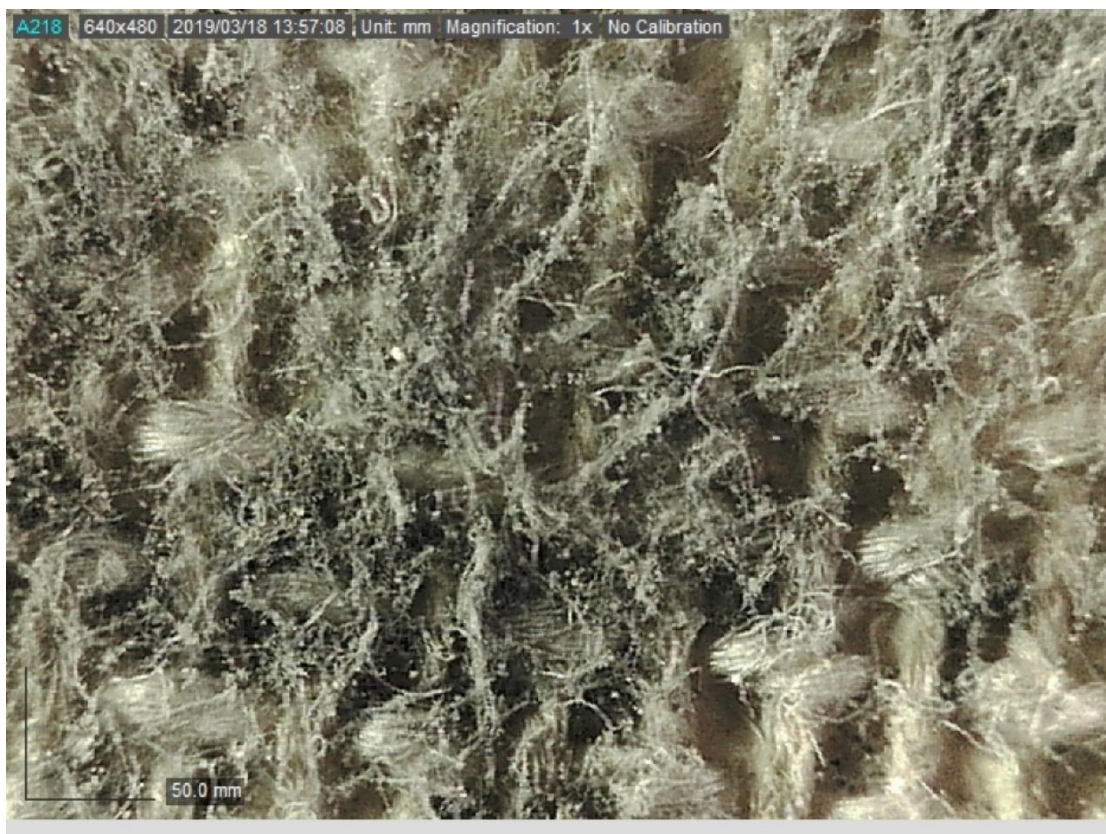


Figura 107. Micro número 7

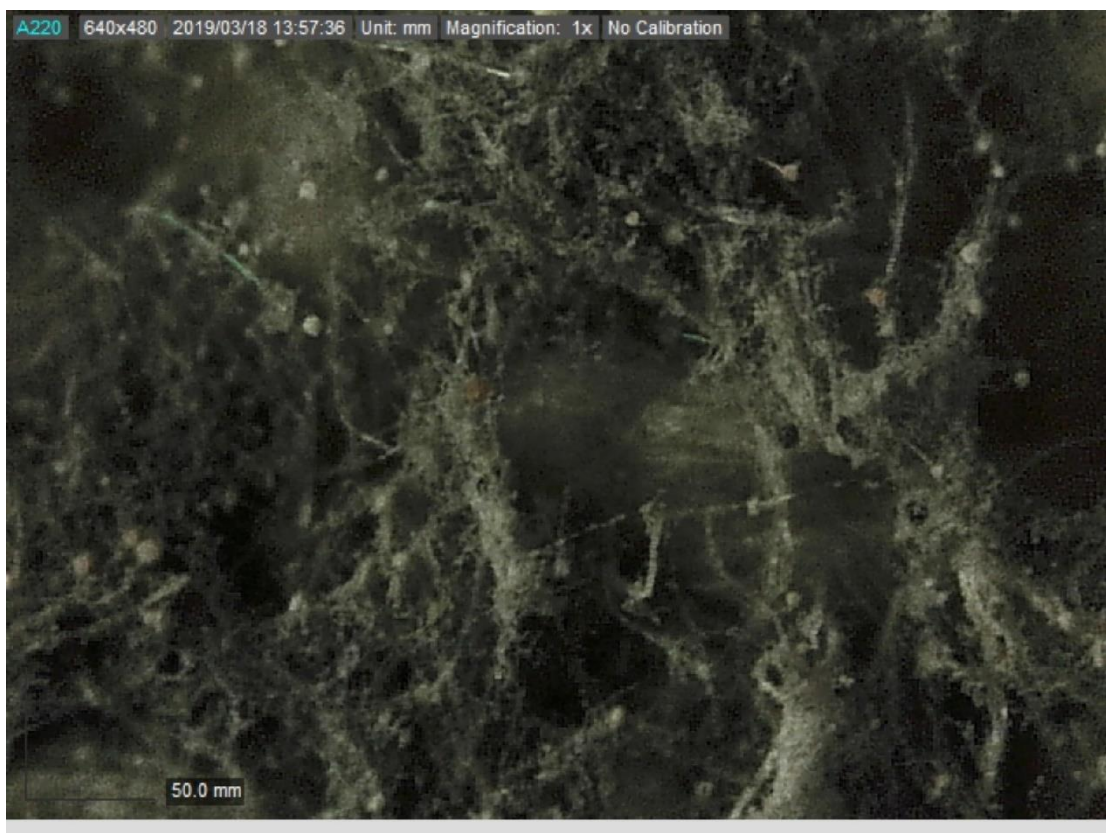


Figura 108. Micro número 8

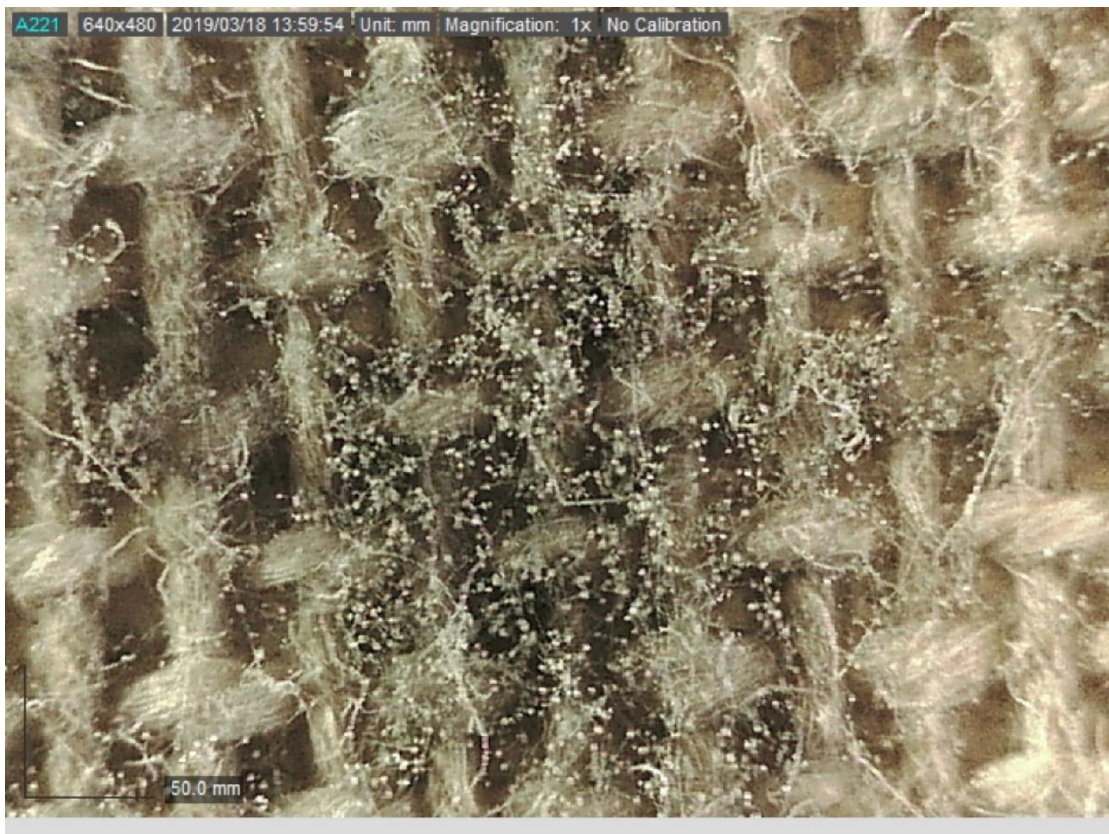


Figura 109. Micro número 9



Figura 110. Micro número 10

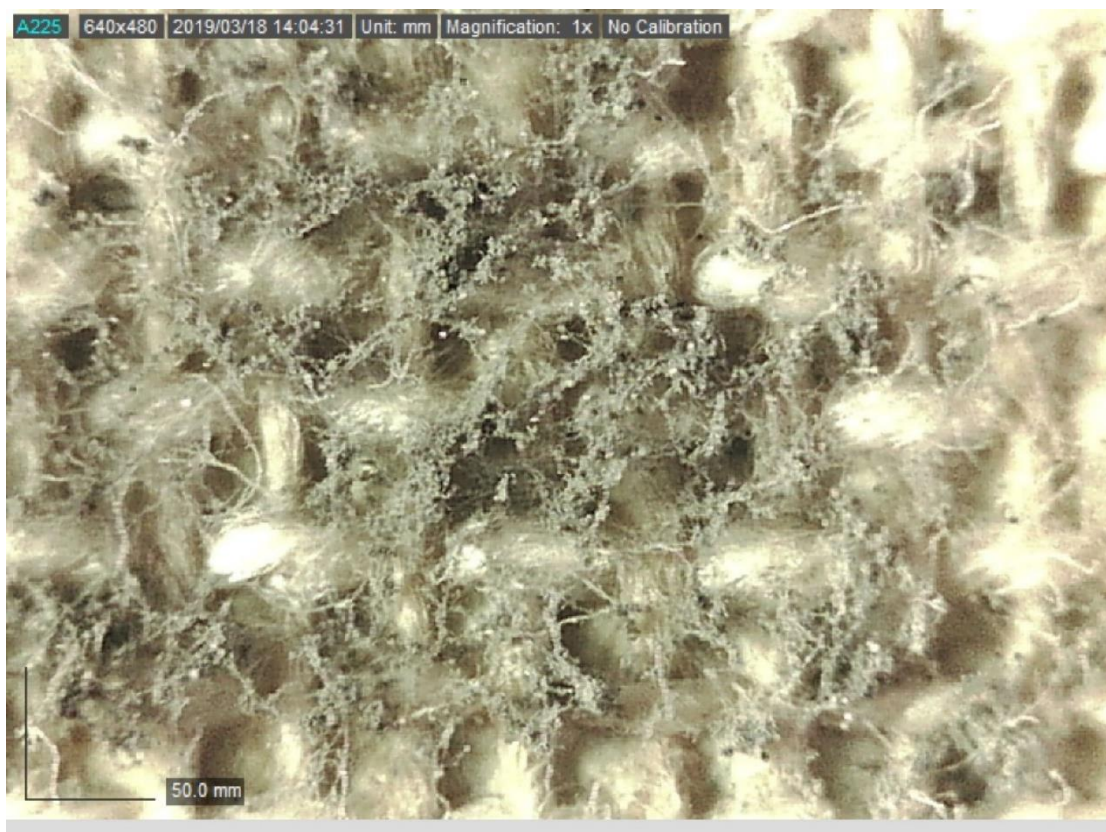


Figura 111. Micro número 11

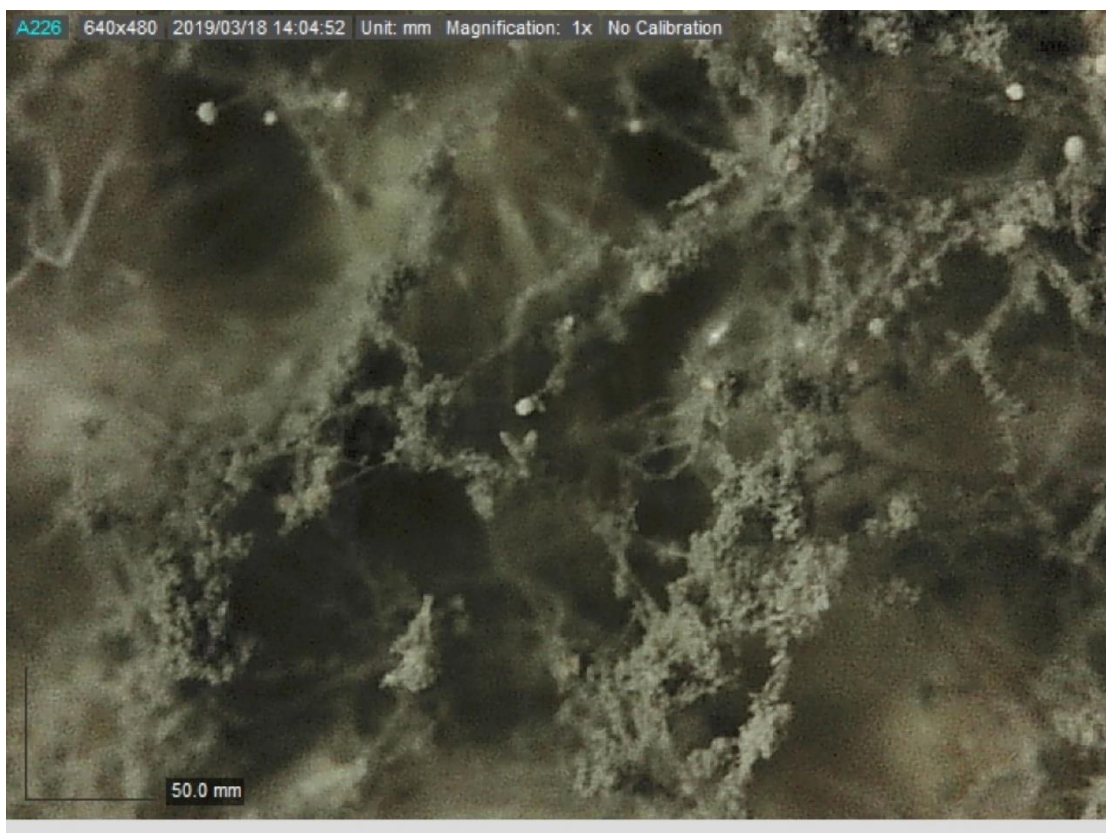


Figura 112. Micro número 12

ANEXO 7. IMÁGENES GENERALES SUPUESTO 3



Figura 113. Visible anverso



Figura 114. Visible reverso



Figura 115. Infrarrojo anverso

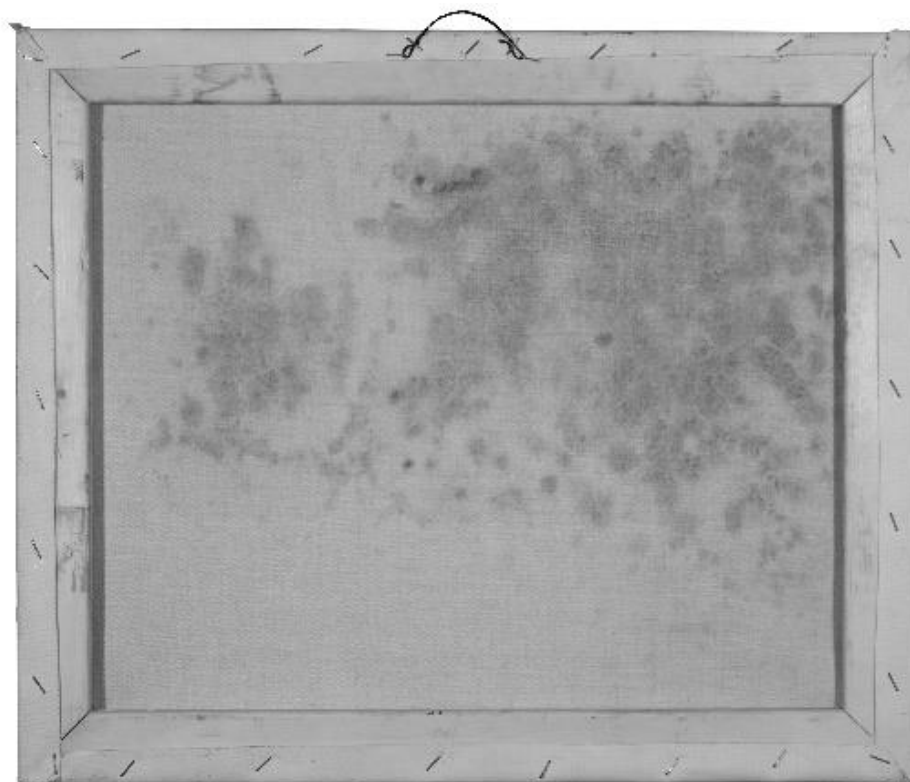


Figura 116. Infrarrojo reverso



Figura 117. Fluorescencia UV anverso

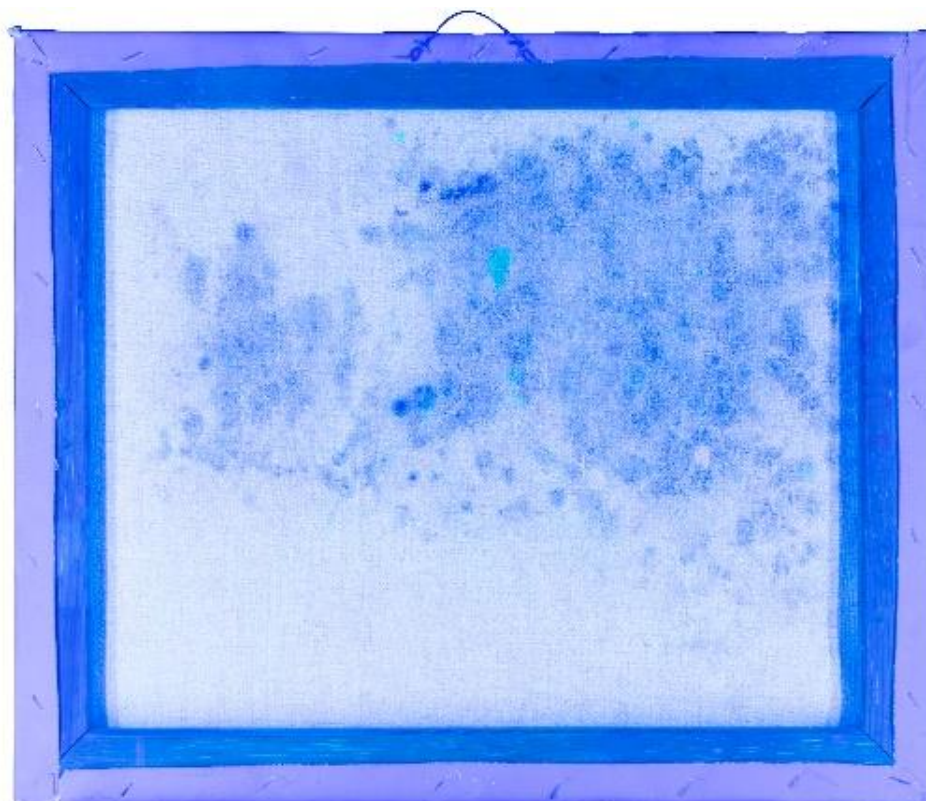


Figura 118. Fluorescencia UV reverso



Figura 119. Reflectografía UV anverso

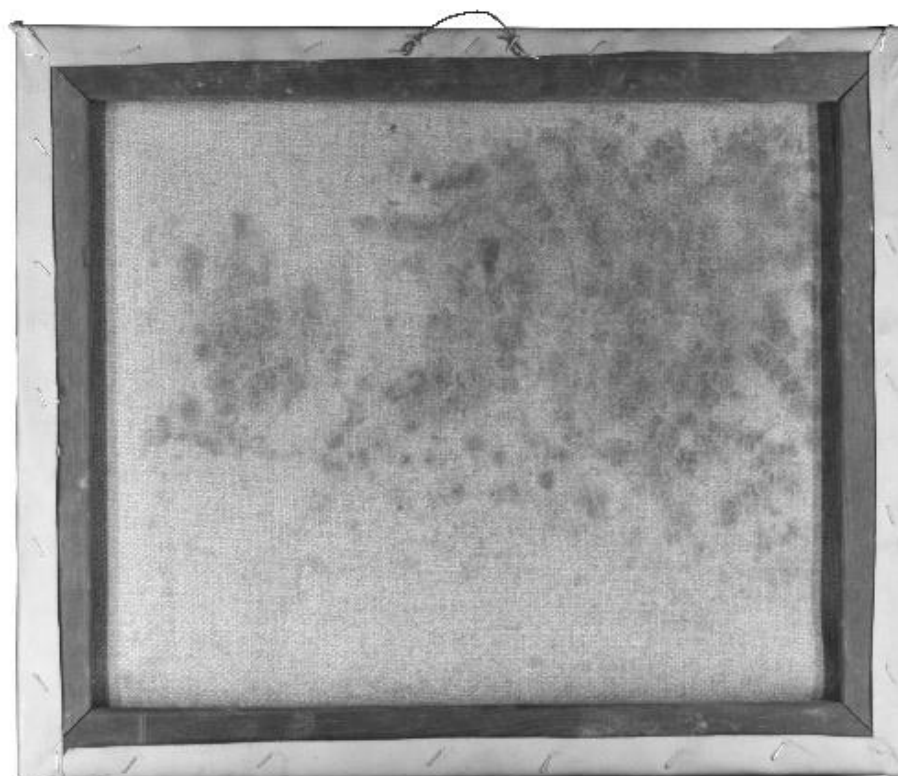
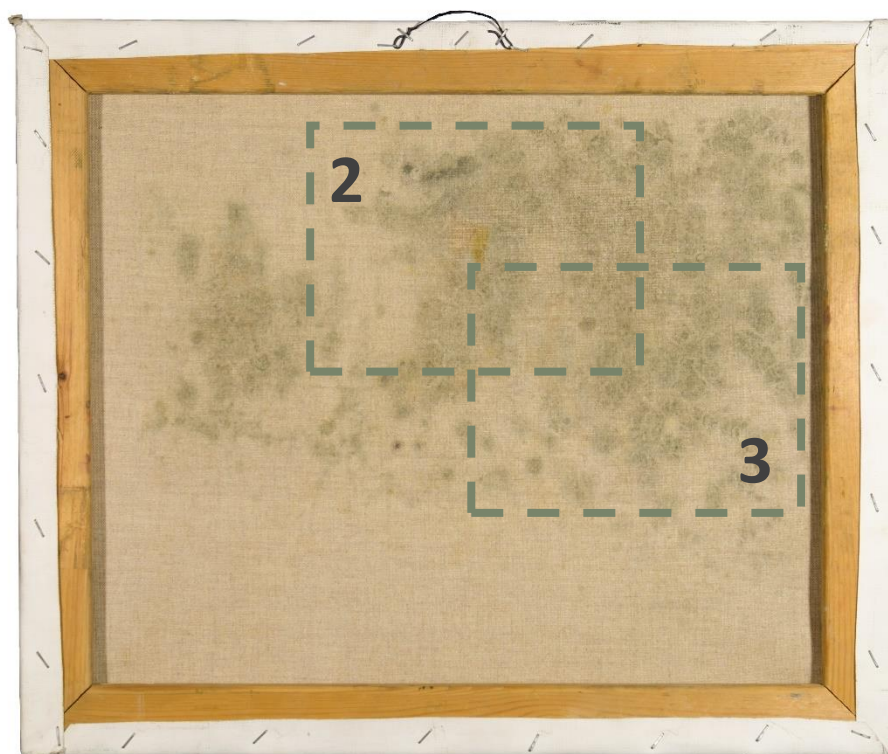


Figura 120. Reflectografía UV reverso

ANEXO 8. IMÁGENES DE DETALLES SUPUESTO 3



DETALLE 1

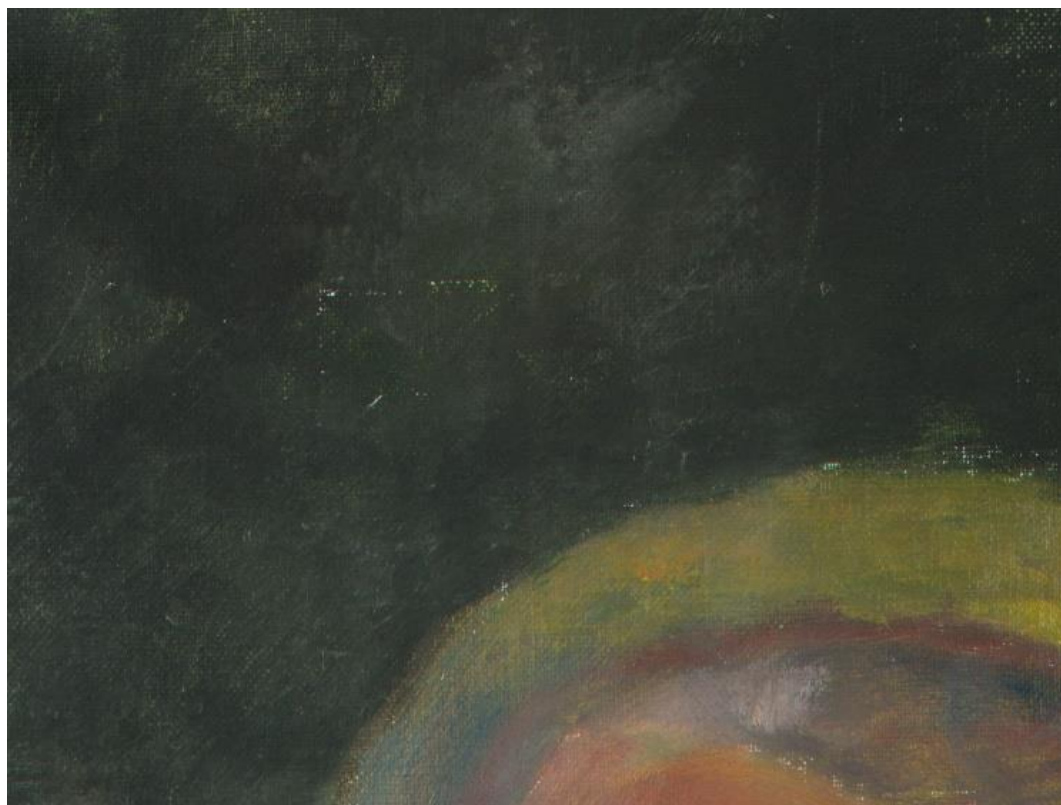


Figura 121. Visible

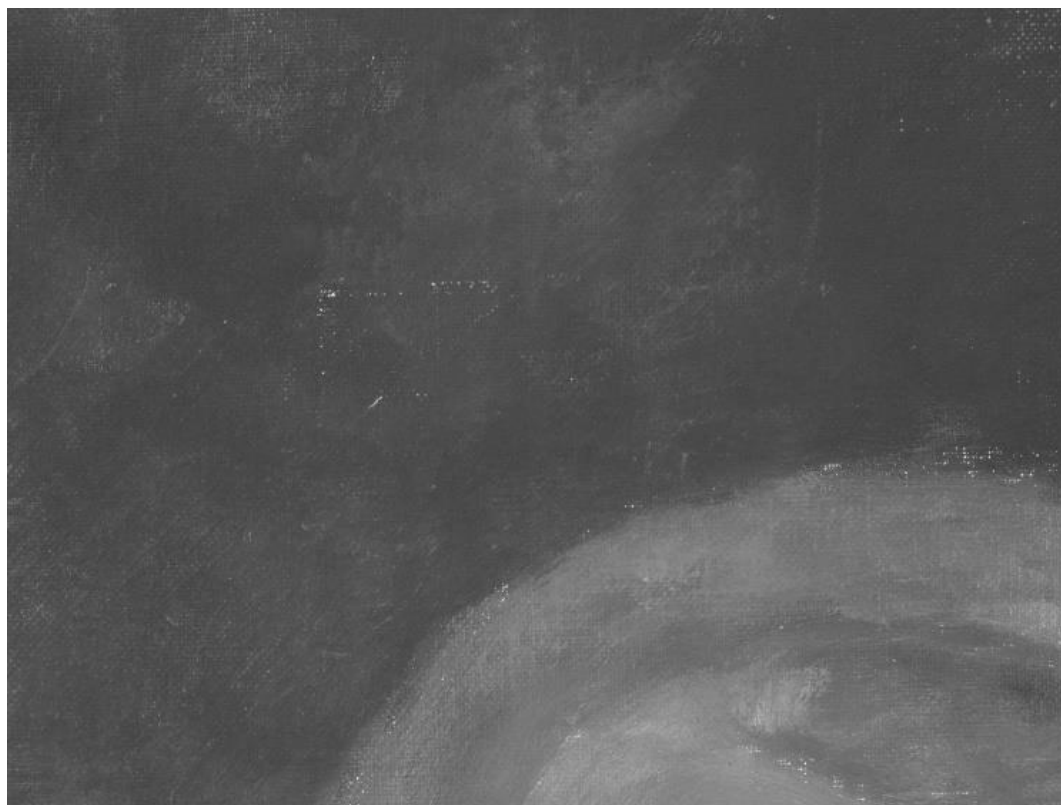


Figura 122. Visible en blanco y negro

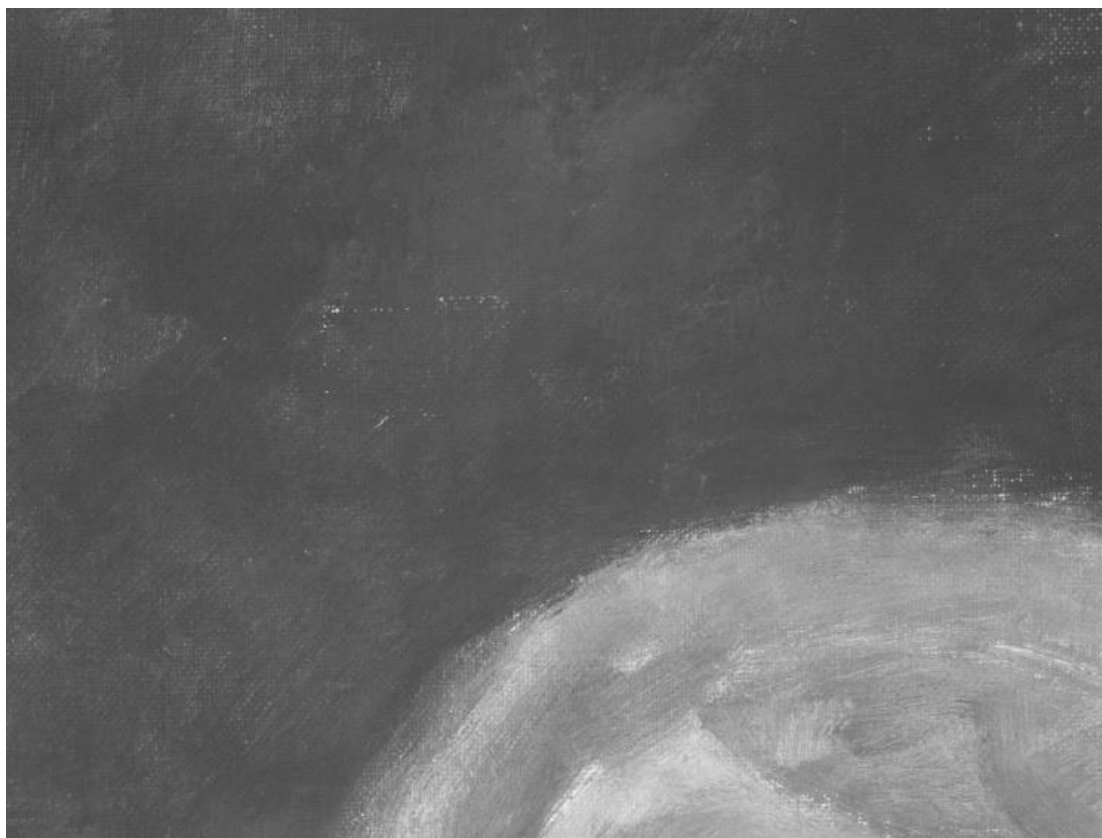


Figura 123. Infrarrojo 1



Figura 124. Infrarrojo 2

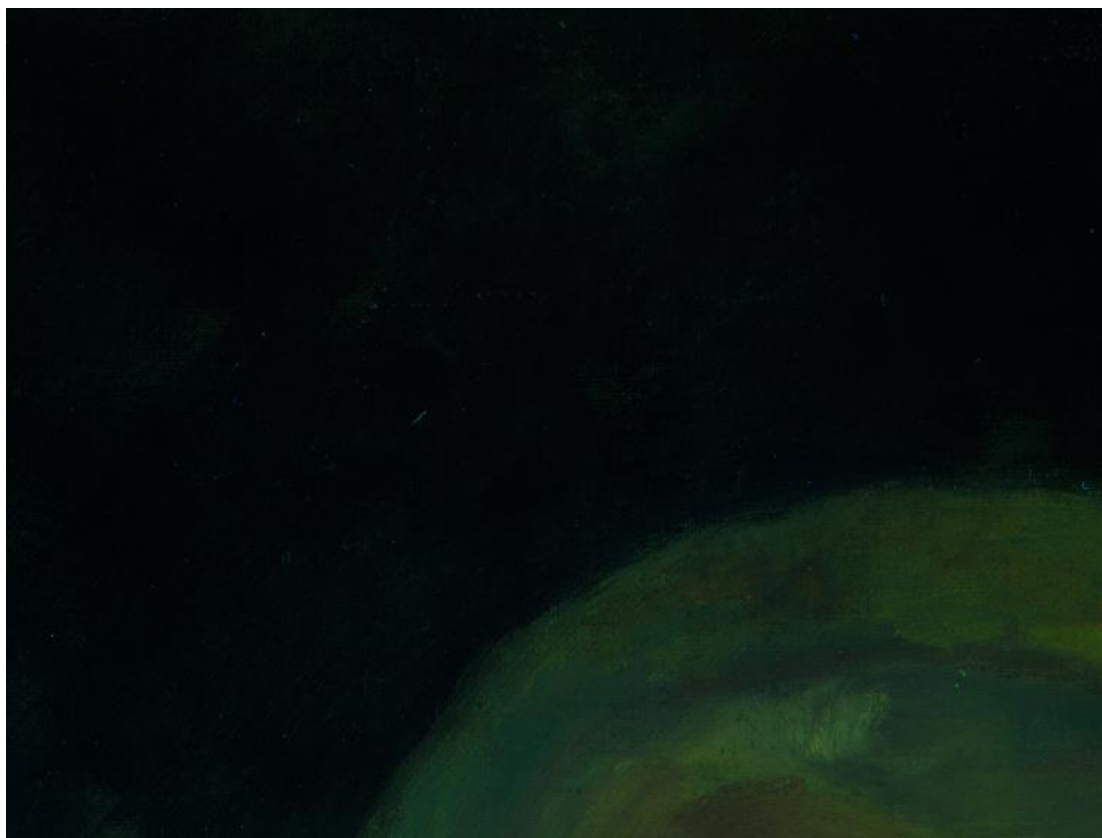


Figura 125. Fluorescencia UV



Figura 126. Reflectografía UV

DETALLE 2



Figura 127. Visible

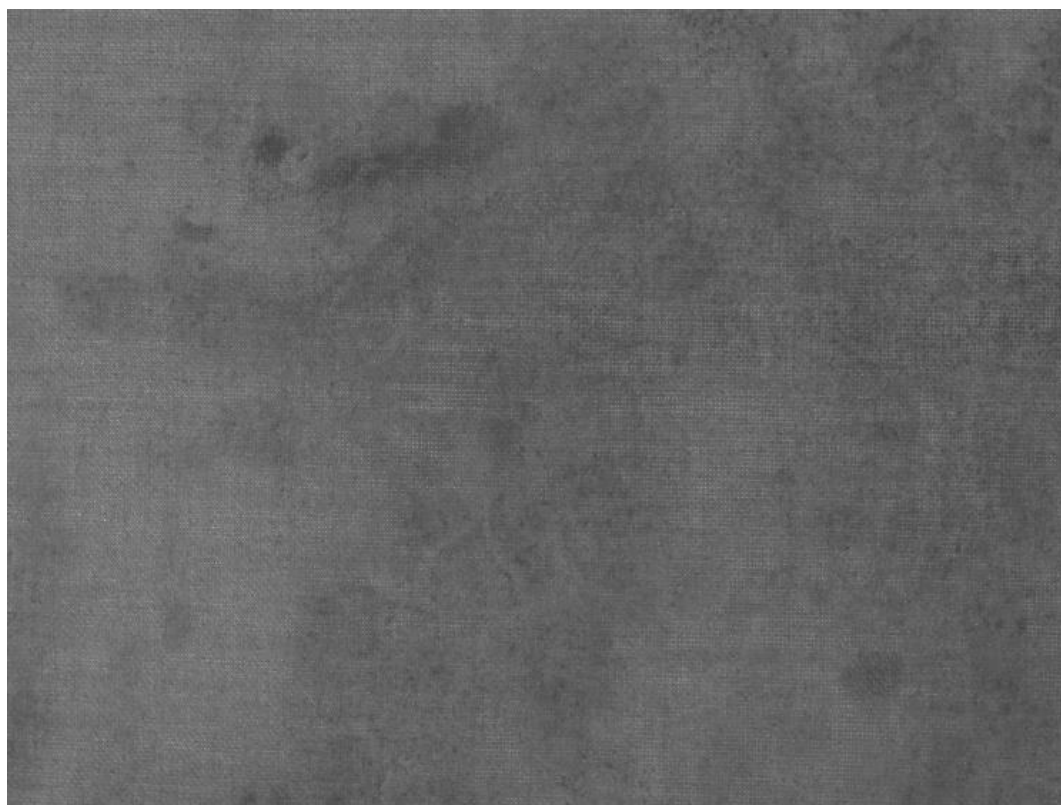


Figura 128. Visible en blanco y negro



Figura 129. Infrarrojo 1



Figura 130. Infrarrojo 2

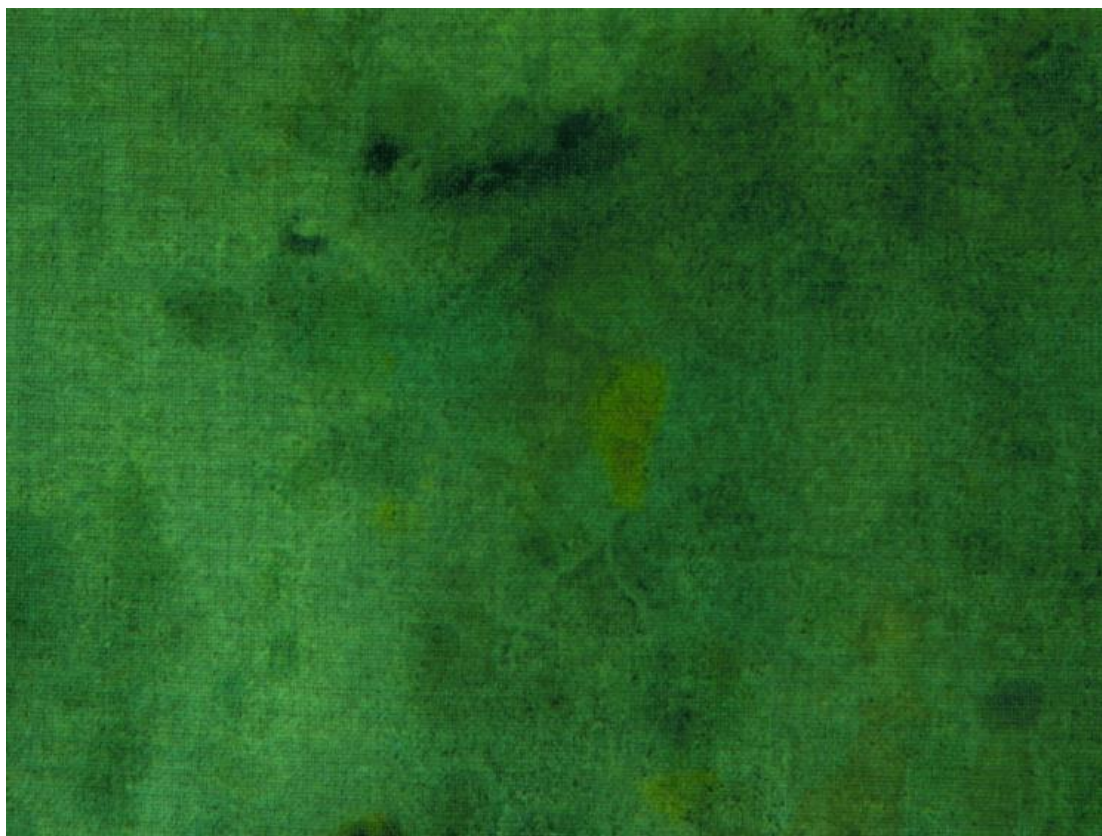


Figura 131. Fluorescencia UV



Figura 132. Reflectografía UV

DETALLE 3



Figura 133. Visible

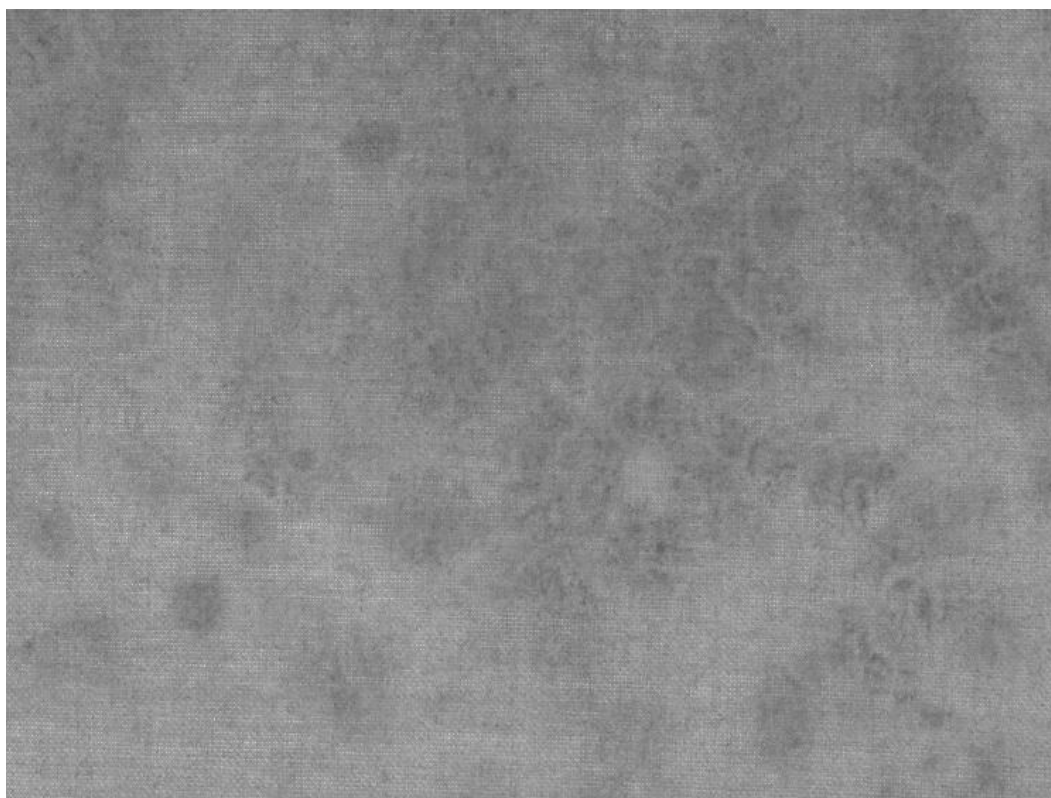


Figura 134. Visible en blanco y negro

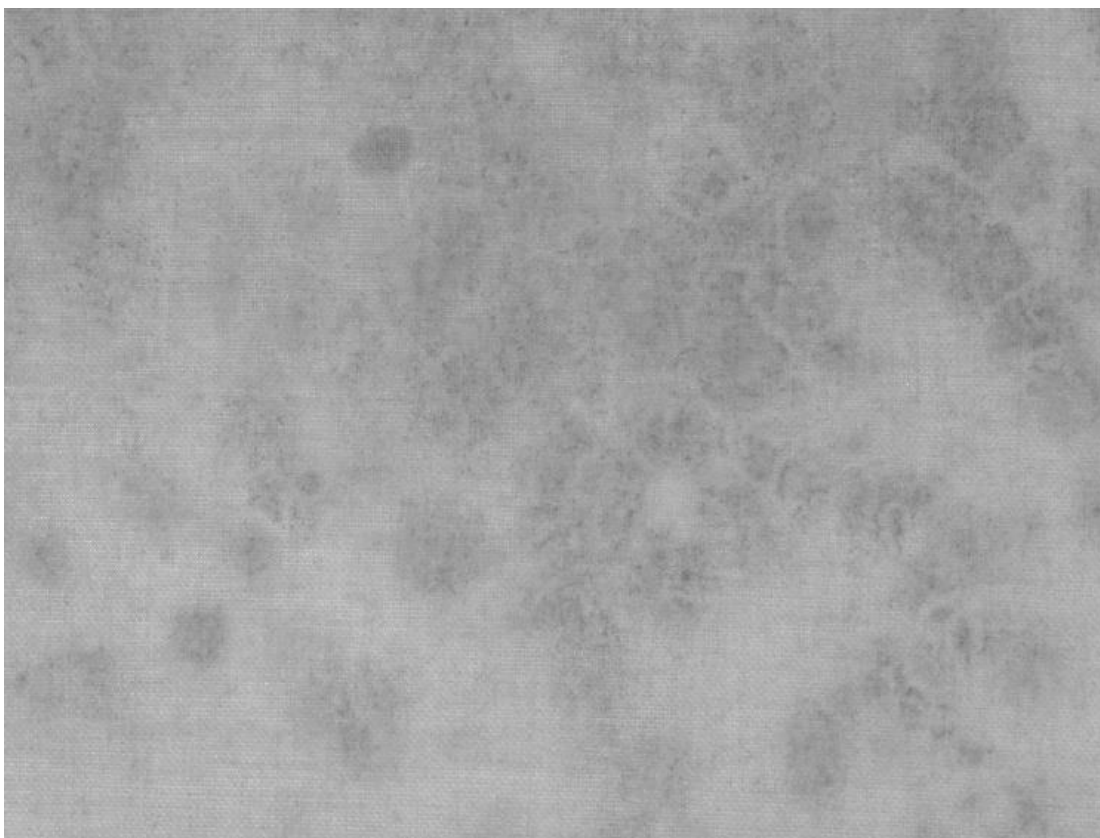


Figura 135. Infrarrojo 1

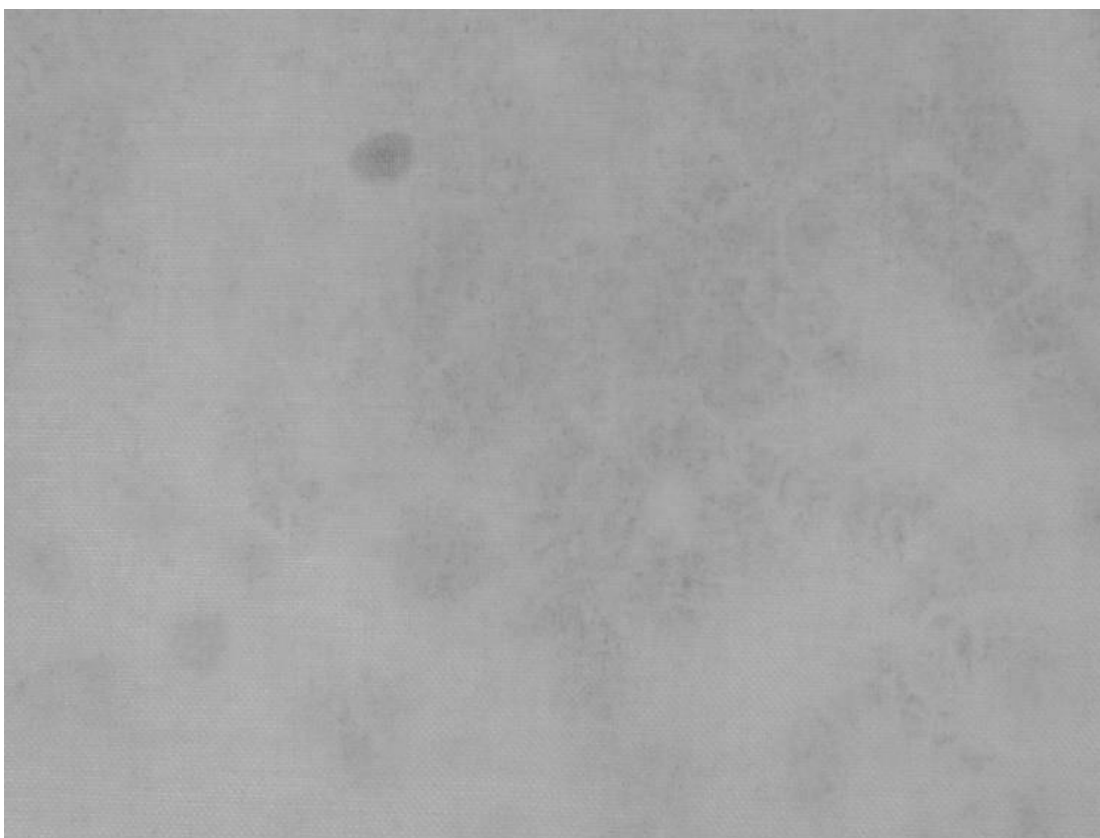


Figura 136. Infrarrojo 2

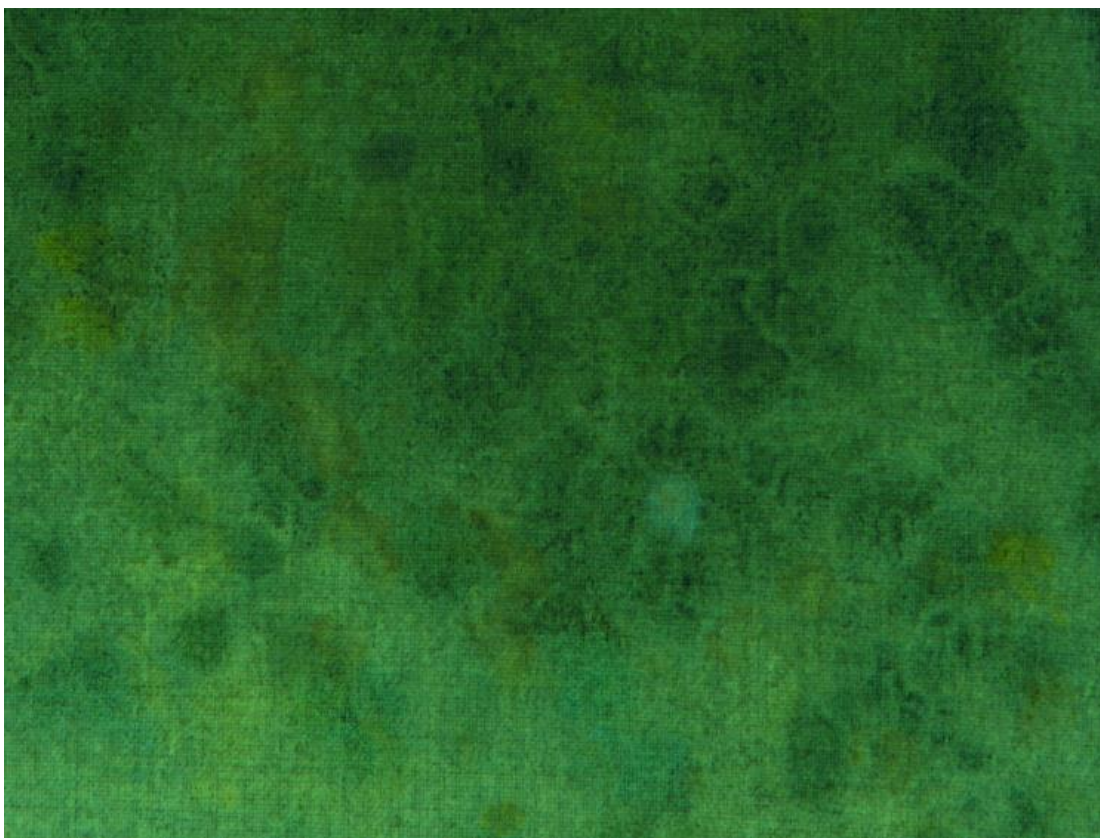


Figura 137. Fluorescencia UV

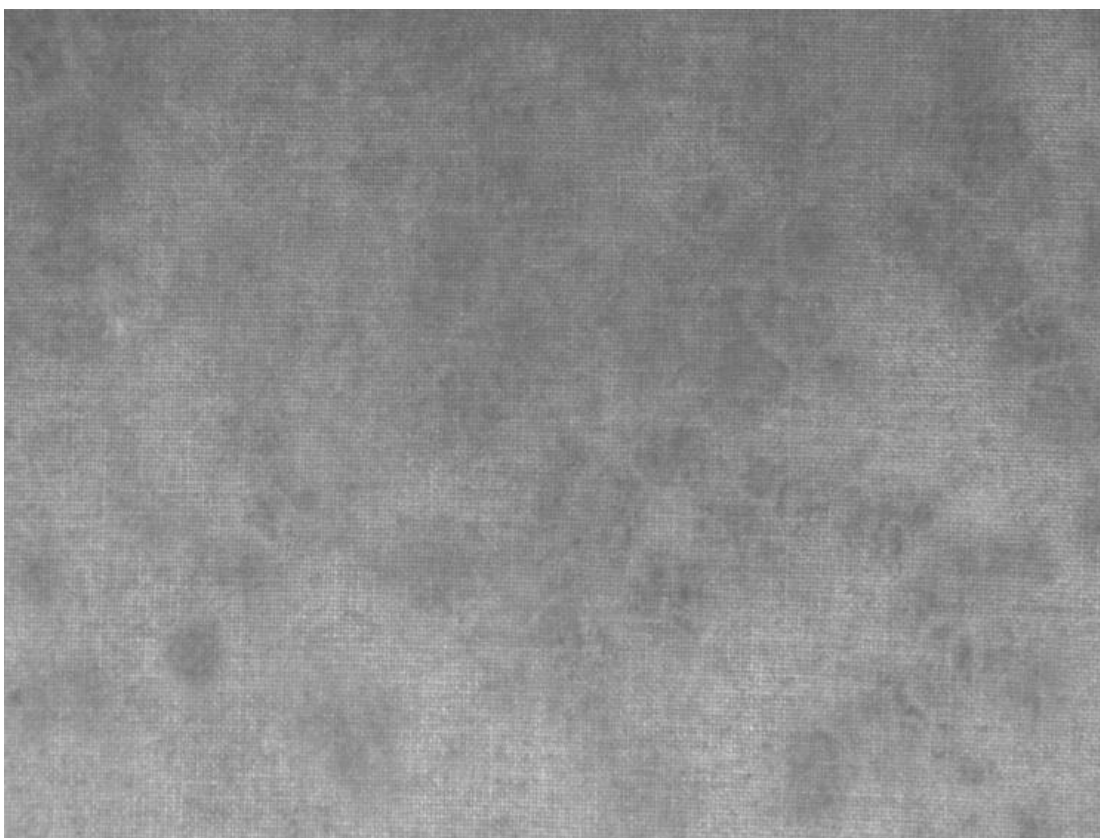


Figura 138. Reflectografía UV

ANEXO 9. FOTOGRAFÍAS CON MICROSCOPIO DIGITAL SUPUESTO 3

- Visible (x 60)
- Visible (x 210)



Figura 139. Localización fotografías micro anverso

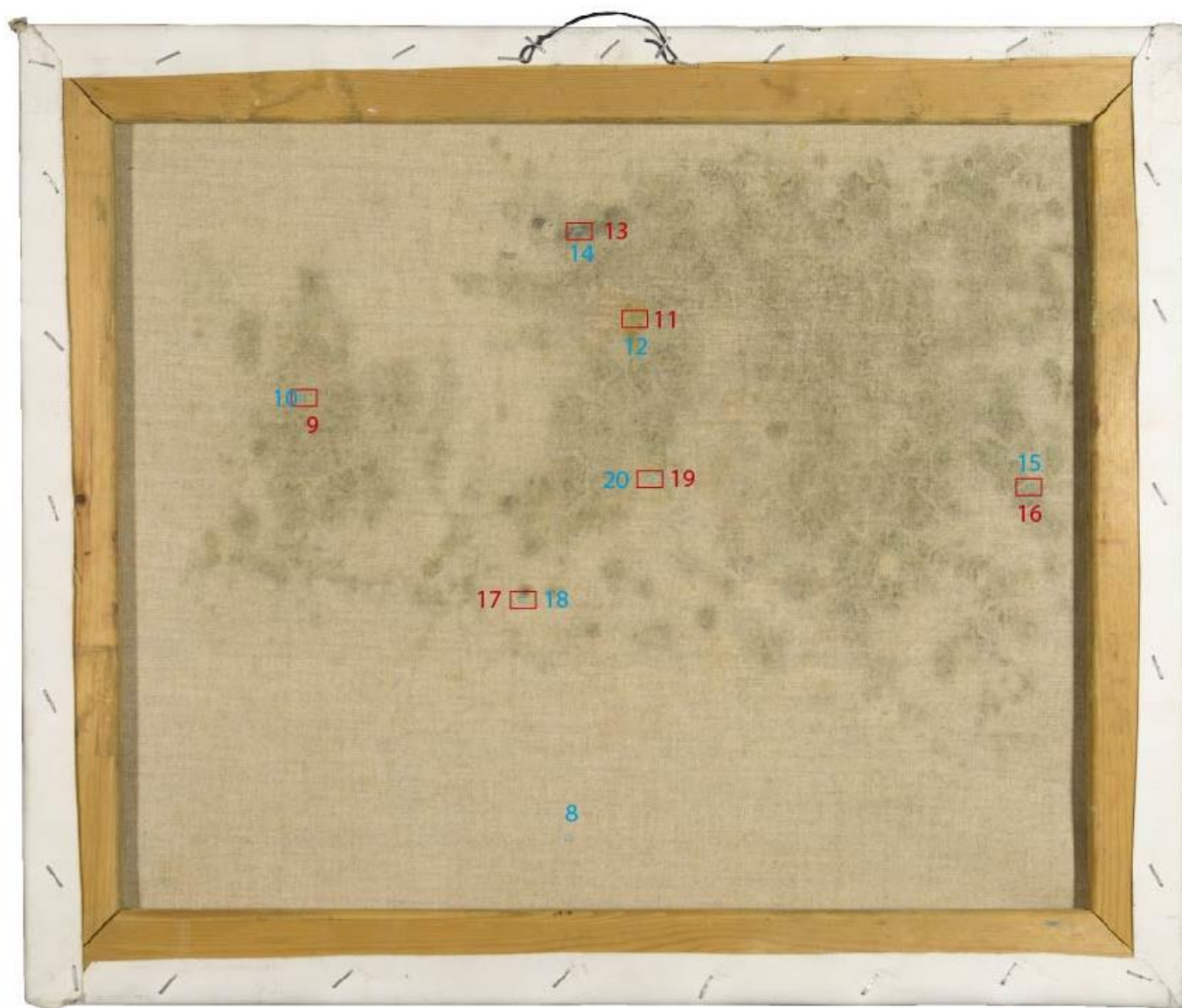


Figura 140. Localización fotografías micro reverso

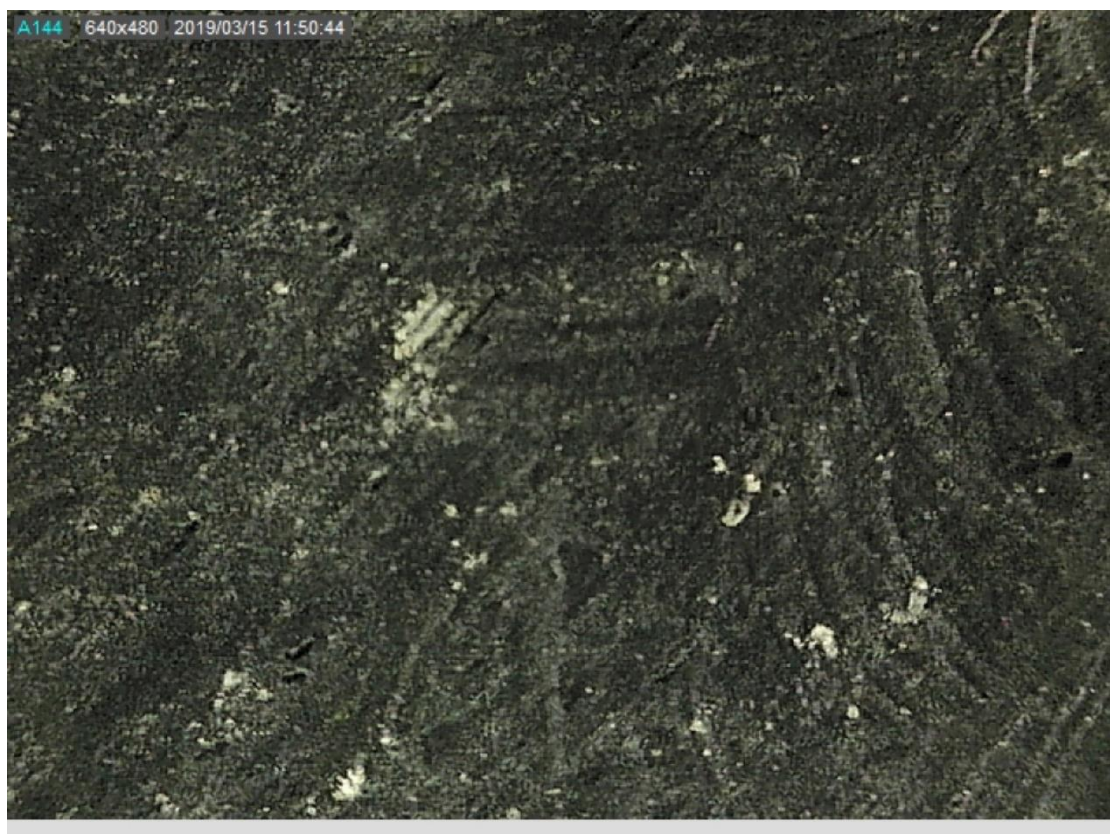


Figura 141. Micro número 1



Figura 142. Micro número 2



Figura 143. Micro número 3



Figura 144. Micro número 4

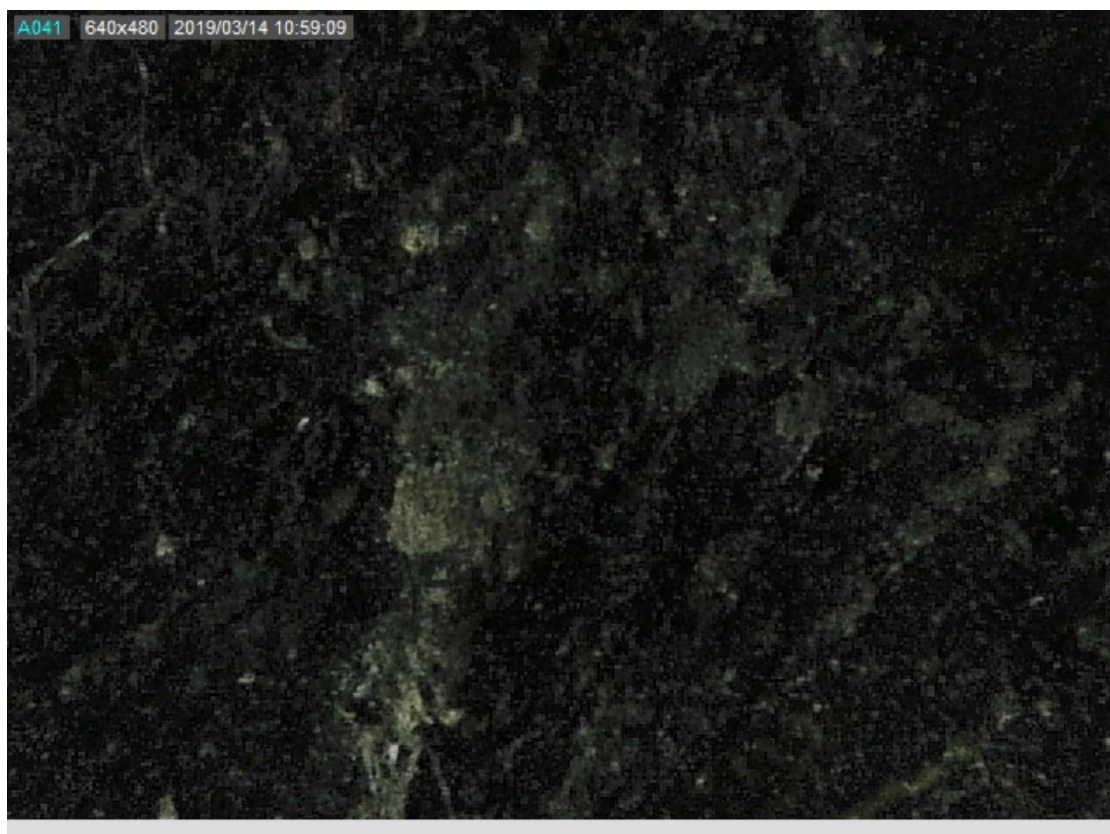


Figura 145. Micro número 5



Figura 146. Micro número 6



Figura 147. Micro número 7

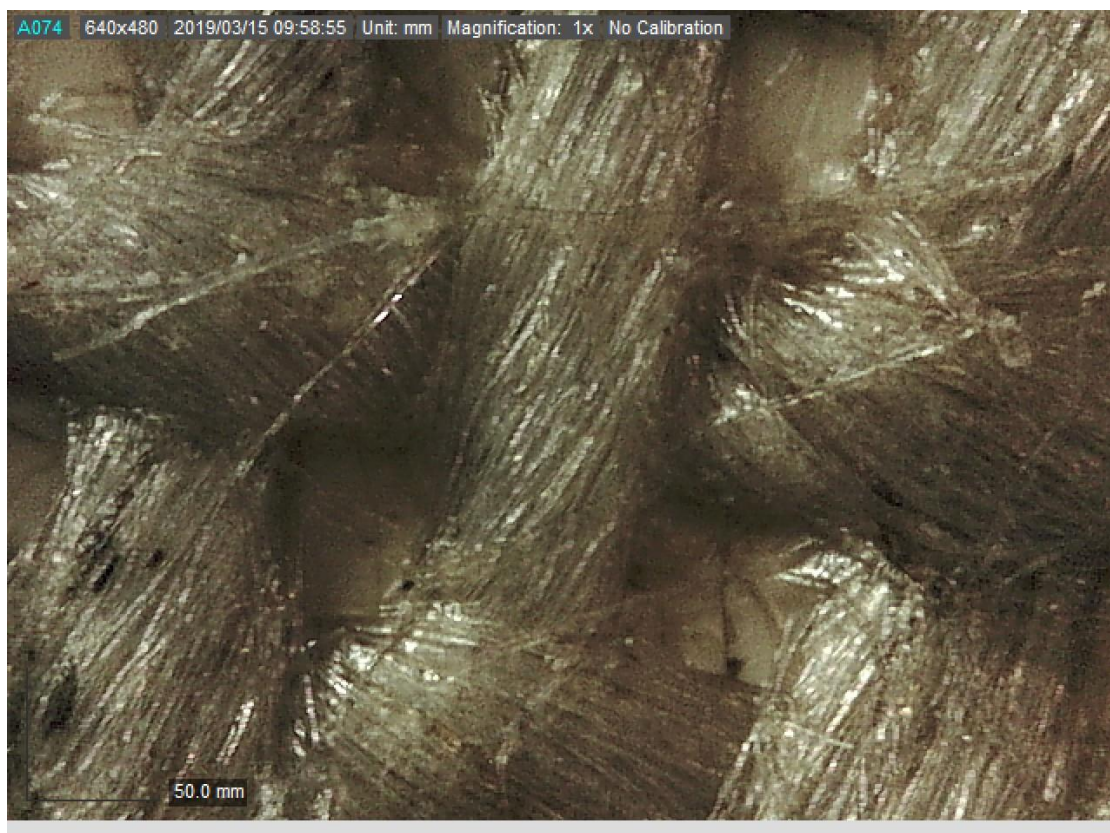


Figura 148. Micro número 8



Figura 149. Micro número 9

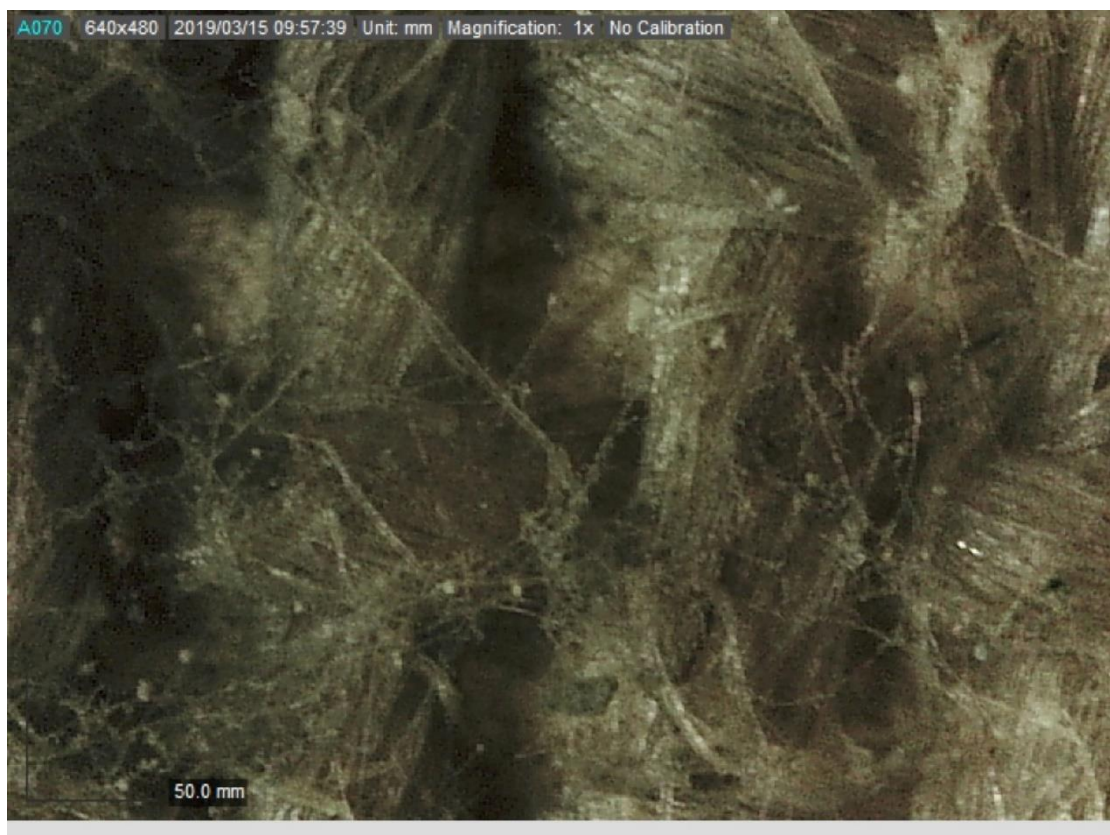


Figura 150. Micro número 10



Figura 151. Micro número 11

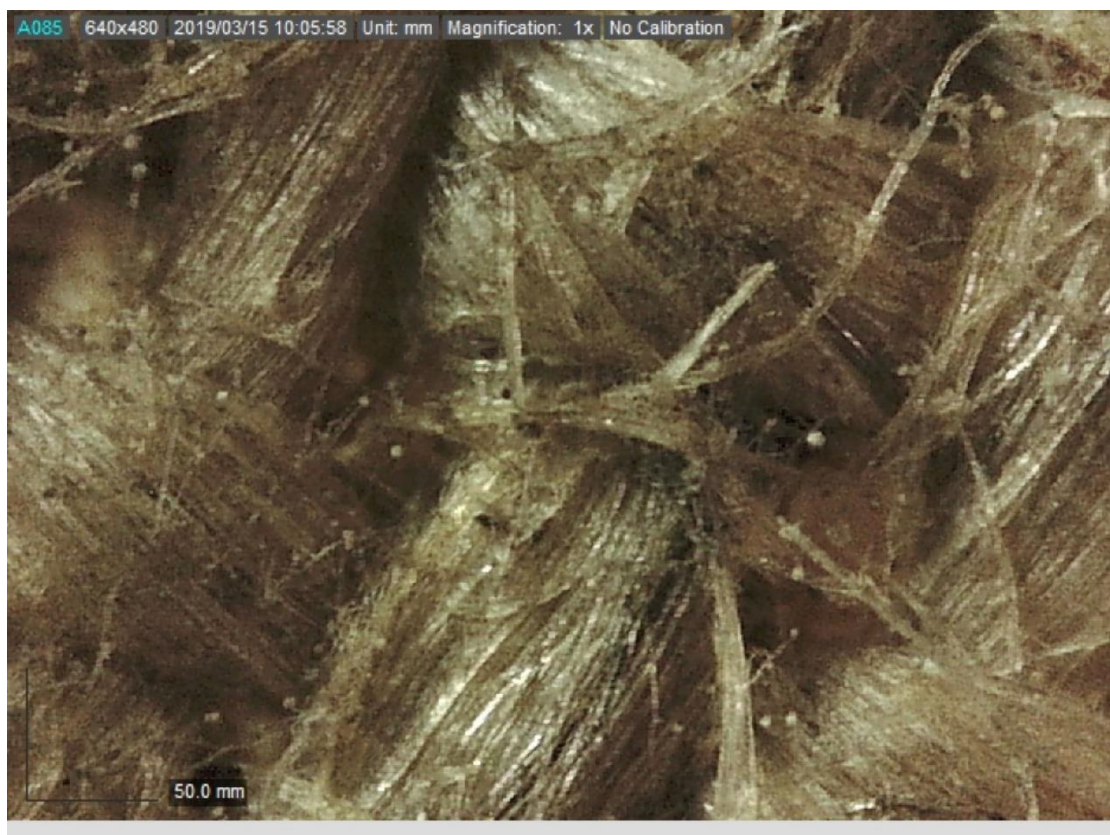


Figura 152. Micro número 12

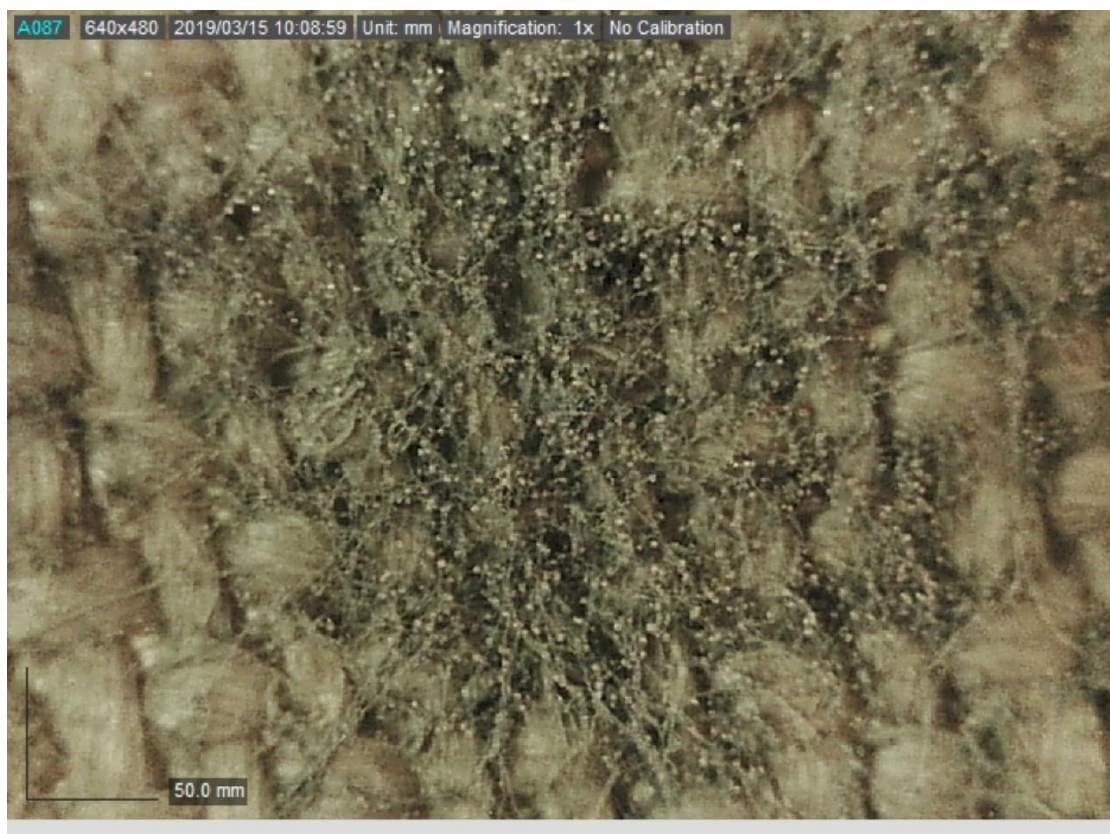


Figura 153. Micro número 13

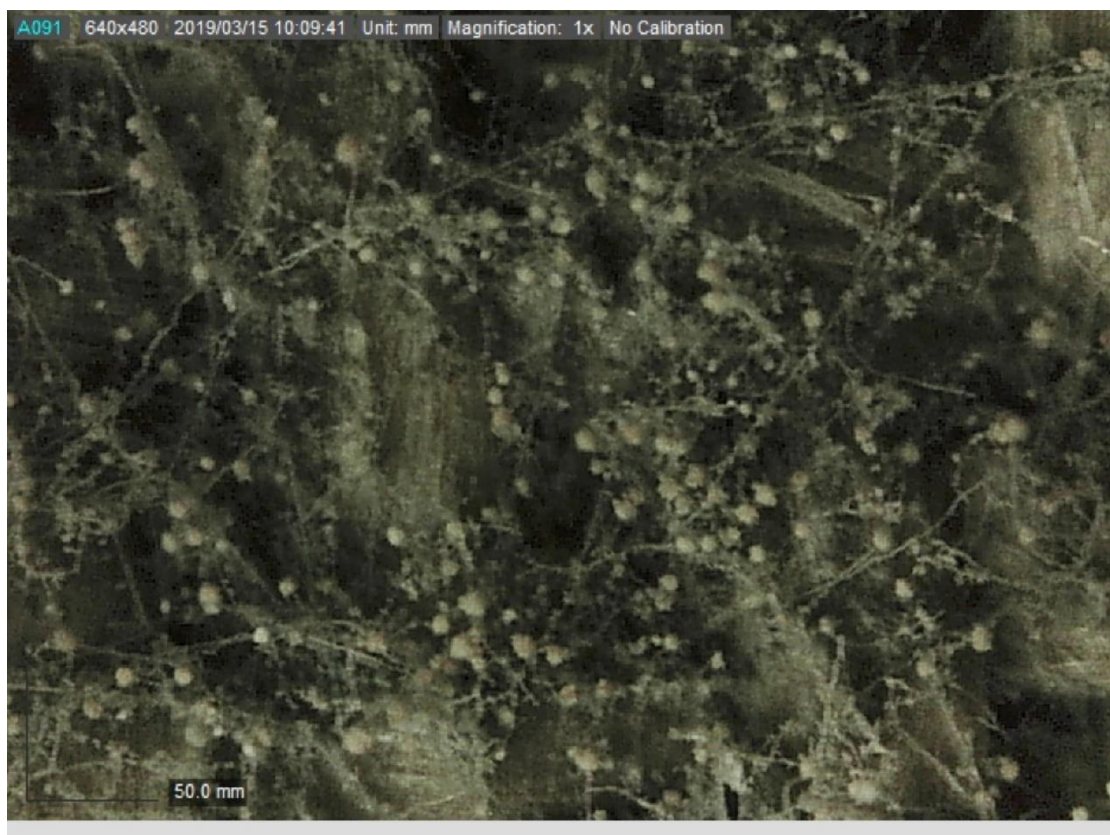


Figura 154. Micro número 14



Figura 155. Micro número 15

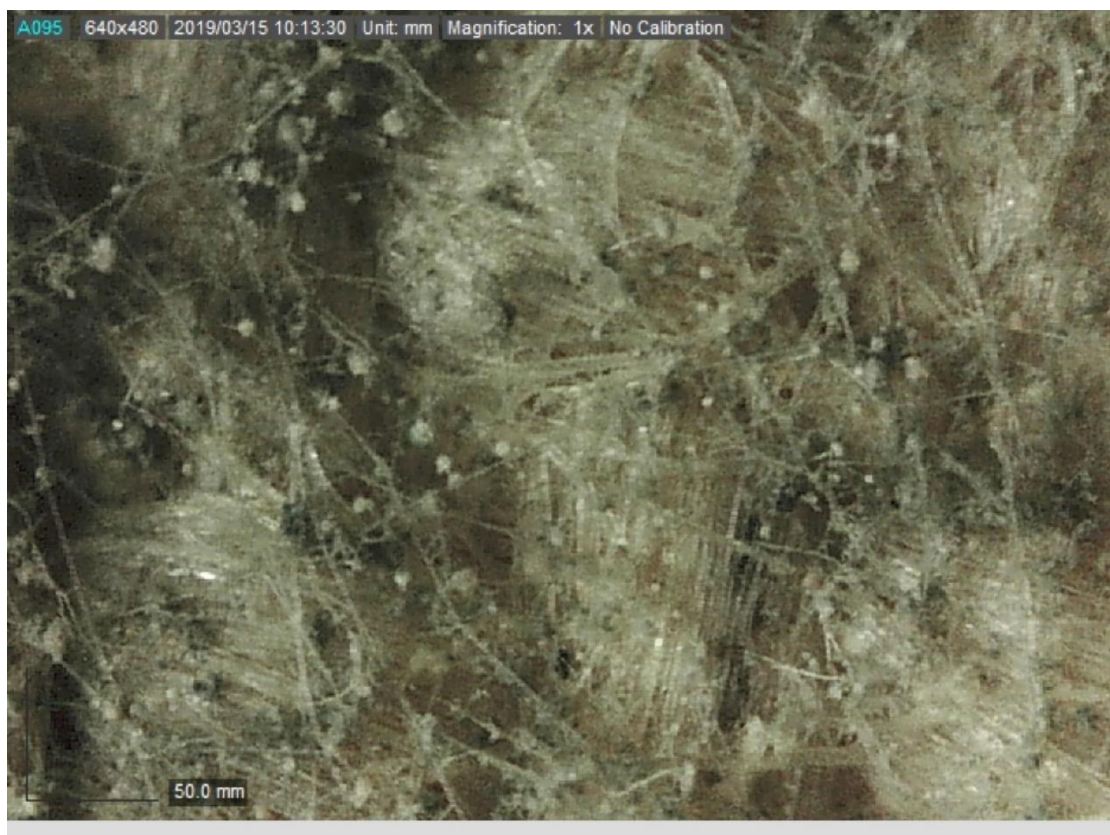


Figura 156. Micro número 16

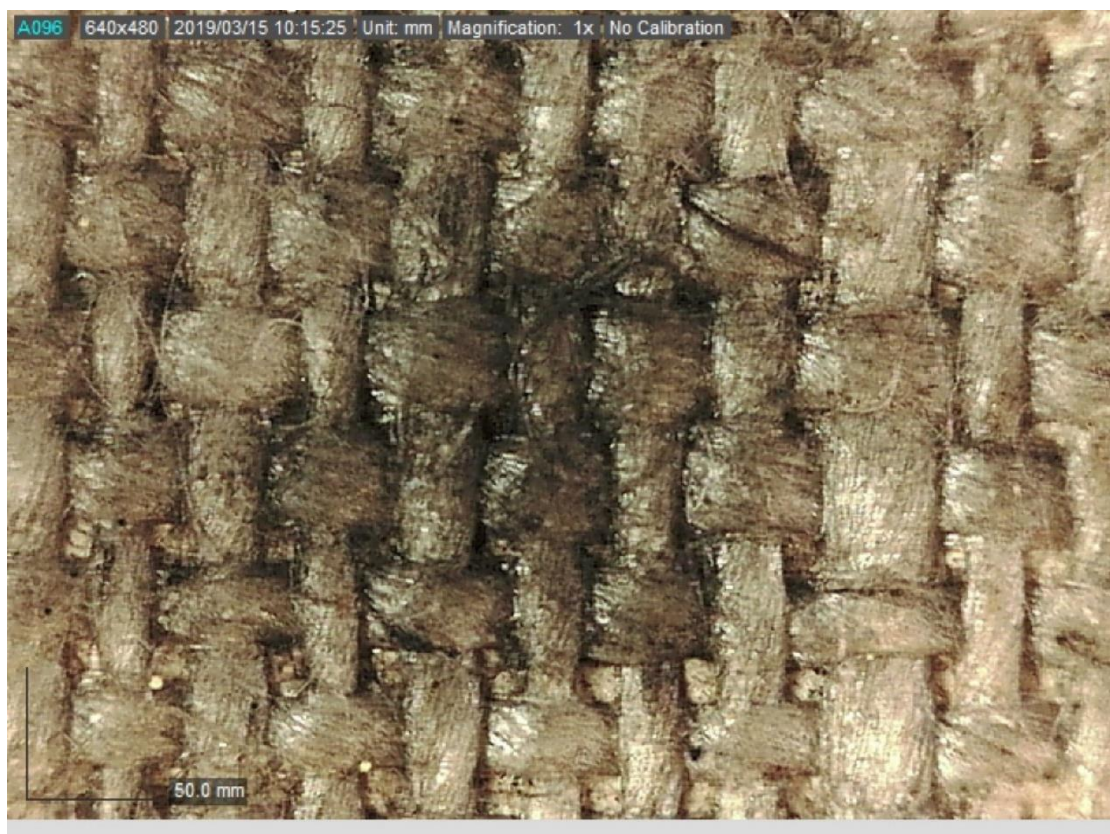


Figura 157. Micro número 17



Figura 158. Micro número 18

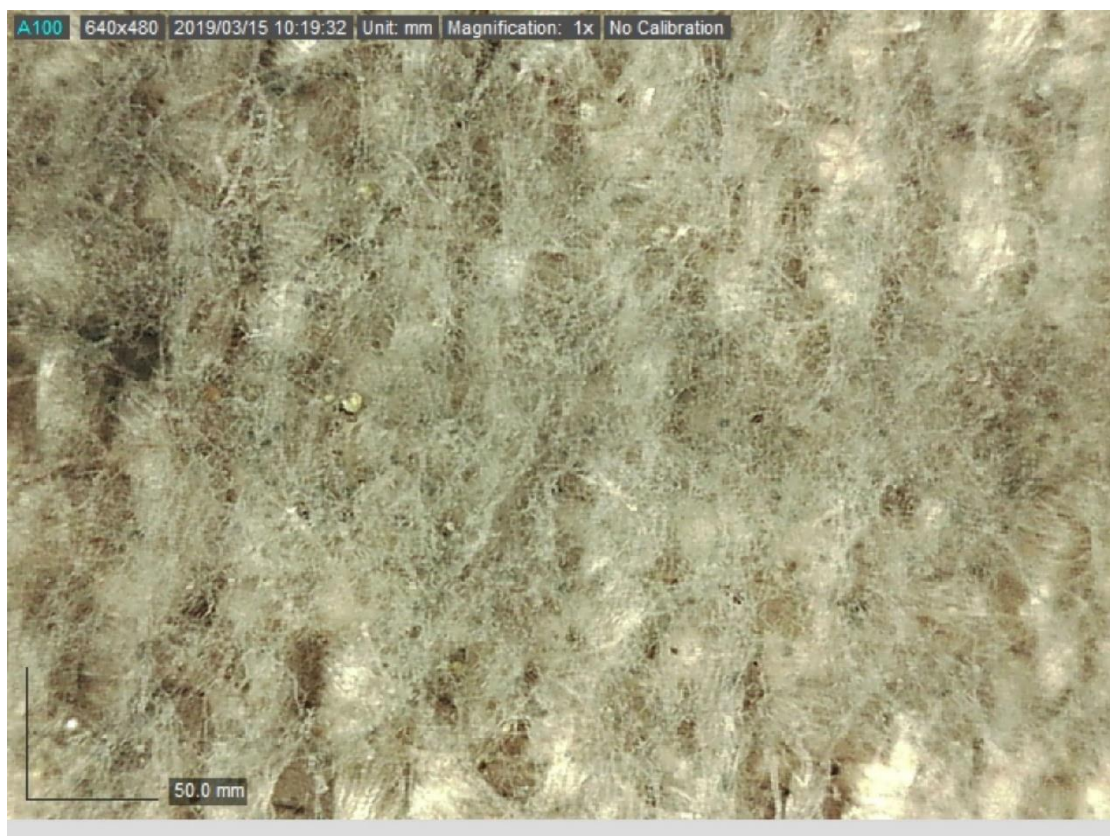


Figura 159. Micro número 19

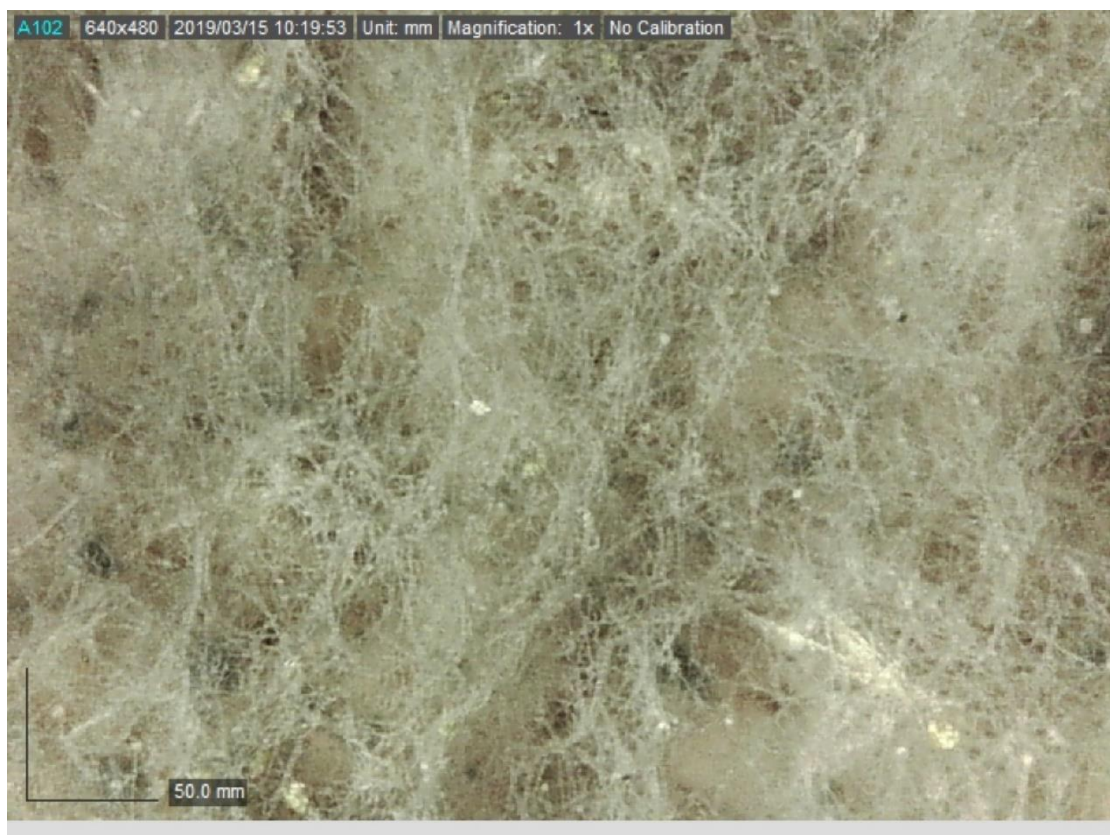


Figura 160. Micro número 20

ANEXO 10. SECUENCIAS OBTENIDAS PARA CADA UNA DE LAS MUESTRAS. ALINEAMIENTOS Y SECUENCIAS CONSENSO UTILIZADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES

MUESTRA 1

>1_FW

AAGACCCCTGGAACGCTGCCTGGAAGGTTGCCGTCTGAGTATAACAATCAATCNATTA AAACTTTCAACAACGG
 ATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCANCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAA
 TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTAAC
 CCTCCAGCCCGGCTGGTGN GTTGGGCCGCCGNCCCCCTCCCCGGGGGACGGGCCCNAAAGGCAGNGGCGG
 CGTCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTACACGCTTCANANAACCGGNCGGCTTGCTGGCCATCA
 CCTATATTTNCTCTTANGTGACCTCGGATCANGTANGGATACTCGNTGAANTTAAGNATATCNATAANCGGA
 GGAA

>1_RV

GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGTCCCTCGGGGCCCAACCTCCCATCCGTGTTGTCCT
 GACACCTGTTGCTTCGGNGGGCCCGCCGTGGTTCACGCCCGGCCGCGGGGGGTTACGCCCCCGGGCCCG
 CGCCCGCGAAGACCCCTGGAACGCTGCCTGGAAGGTTGCCGTCTGAGTATAACAATCAATCAATTA AAACTTTC
 AACACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT
 TCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCA
 TTGCTAACCTCCAGCCCGGCTGGTGTGTTGGGCCGCCGTCCCCCTCCNNNNNGGACGGGCCCGAAAGGCA
 GCGGCGGNGTCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTC

>Alineamiento CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

1_FW	-----	0
1_RV	GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGTCCCTCGGGGCCCAACCTCCCA	60
1_FW	-----	0
1_RV	TCCGTGTTGTCCTGACACCTGTTGCTTCGGNGGGCCCGCCGTGGTTCACGCCCCGGCCGC	120
1_FW	-----AAGACCCCTGGAACGCTGCCTGGAAG	26
1_RV	CGGGGGGTTACGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCGAAGACCCCTGGAACGCTGCCTGGAAG *****	180
1_FW	GTTGCCGTCTGAGTATAACAATCAATCNATTA AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCC	86
1_RV	GTTGCCGTCTGAGTATAACAATCAATCAATTA AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCC *****	240
1_FW	GGCATCGATGAAGAACGCANCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAA	146

ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN PINTURA SOBRE TELA

1_RV	GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCCGTGAA *****	300
1_FW	TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGA	206
1_RV	TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGA *****	360
1_FW	GCGTCATTGCTAACCCCTCCAGCCCGGCTGGTGN GTGGGCCGCCNCCCCCTCCCCGGG	266
1_RV	GCGTCATTGCTAACCCCTCCAGCCCGGCTGGTGTGTGGGCCGCCGTCCCCCTCCNNNNN *****	420
1_FW	GGACGGGCCCNAAGGCAGNGGCGGCGTCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTCTGT	326
1_RV	GGACGGGCCCNAAGGCAGCGGCGGNGTCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTCTGT *****	480
1_FW	CACACGCTTCANANAACCGNCGGCTTGCTGGCCATCACCTATATTTNCTCTTANGTGA	386
1_RV	C----- *	481
1_FW	CCTCGGATCANGTANGGATACTCGNTGAANTTAAGNATATCNATAANCGGAGGAA	441
1_RV	-----	481

>Muestra_1 ITS(595pb)

GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGTCCCTCGGGGCCAACCTCCCATCCGTGTTGTCCT
GACACCTGTTGCTTCGGNGGGCCCGCCGTGGTTCACGCCCCGGCCGCCGGGGGGTTACGCCCCGGGCCCG
CGCCCGCCGAAGACCCCTGGAACGCTGCCTGGAAGGTTGCCGTCTGAGTATACAATCAATCAATAAACTTTC
AACACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT
TCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCA
TTGCTAACCCCTCCAGCCCGGCTGGTGN GTGGGCCGCCNCCCCCTCCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCA
GCGGCGGNGTCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTCACACGCTTCANANAACCGNCGGCTTGCT
GGCCATCACCTATATTTNCTCTTANGTGACCTCGGATCANGTANGGATACTCGNTGAANTTAAGNATATCNAT
AANCGGAGGAA

MUESTRA 2

>2_FW

CTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGGCTTACGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGA
 CNCCTCNAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTC
 TTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCG
 AGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGNATTCCGGGGGGCATGNCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAA
 GCACGGCTTGTGTGTTGGNCCCGTCTCCGATCCCGGGGGACGGGCCNAAAGGNANCGGCGGCNCCGCG
 TCCGTCCTCNAGCGNATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCC

>2_RV

CTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTT
 CGGCGGNCCCNCTTAACTGGCCGCCGGGGGGCTTACGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGA
 ACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCG
 GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGA
 ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTG
 TGTGTTGGGCCCGTCTCCGATCCCGGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCTCG
 AGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCT

>Alineamiento CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

2_FW	-----	0
2_RV	CTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTTTAT	60
2_FW	----CTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGGCTTACGCCCCCGG	55
2_RV	TTTACCTTGTTGCTTCGGCGGNCCCNCTTAACTGGCCGCCGGGGGGCTTACGCCCCCGG ***** **	120
2_FW	GCCCGCGCCCGCCGAAGACNCCCTCNAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAAT	115
2_RV	GCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAAT *****	180
2_FW	ATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCA	175
2_RV	ATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCA *****	240
2_FW	GCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCA	235
2_RV	GCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCA *****	300
2_FW	CATTGCGCCCCCTGGNATTCCGGGGGGCATGNCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAG	295
2_RV	CATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAG *****	360

```

2_FW      CACGGCTTGTGTGTTGGGNCCCGTCCTCCGATCCCGGGGGACGGGCCCNAAAGGNANCGG      355
2_RV      CACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCTCCGATCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGG      420
          *****
          *****

2_FW      CGGCNCCGCGTCCGGTCCTCNAGCGNATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCC      415
2_RV      CGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCT-----          466
          ****
          *****

2_FW      GCGCTTGCC      425
2_RV      -----      466
    
```

>Muestra_2_ITS(490pb)

```

CTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTTTATTTACCTTGTTGCTT
CGGCGGNCCNCCTTAACTGGCCGCCGGGGGGCTTACGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGA
ACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCG
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGA
ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTG
TGTGTTGGGCCCCGTCCTCCGATCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCCGCNCCGCGTCCGGTCCTCN
AGCGNATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCC
    
```

MUESTRA 3

>3_RV

AGCGCCGGCCGGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCT
GCCTTTCGGGCCCGTCCCCGGGATCGGAGGACGGGGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGA
CGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAAT
TTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAG
TTTTAAATAATTTATATTTTCACTCAGACTACAATCTTCAGACAGAGTTCGAGGGTGTCTTCGGCGGGCGCGGG
CCCGGGGGCGTAAGCCCCCGGCGGCCAGTTAAGGCGGGCCCGCCGAAGCAACAAGGTAATAAACACGG
GTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCTCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAG

>Muestra_3_ITS(501pb)

AGCGCCGGCCGGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCT
GCCTTTCGGGCCCGTCCCCGGGATCGGAGGACGGGGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGA
CGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAAT
TTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAG
TTTTAAATAATTTATATTTTCACTCAGACTACAATCTTCAGACAGAGTTCGAGGGTGTCTTCGGCGGGCGCGGG
CCCGGGGGCGTAAGCCCCCGGCGGCCAGTTAAGGCGGGCCCGCCGAAGCAACAAGGTAATAAACACGG
GTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCTCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAG

MUESTRA 4

>4_FW

ATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGGCTTACGCCCCGGGCCCGCGCCCG
 CCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAA
 CGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTG
 AATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTG
 CCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCCTCCGATCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGC
 ACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGCGCTTGCCGATCAAC
 CCAAATTTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGA

>4_RV

GTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATC
 GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACNCA
 CATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGT
 TGGGCCCGTCCTC

>Alineamiento CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

4_FW	ATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGGCTTACGCCCC	60
4_RV	-----	0
4_FW	GGGCCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAA	120
4_RV	-----GTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAA *****	26
4_FW	ATATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACG	180
4_RV	ATATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACG *****	86
4_FW	CAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACG	240
4_RV	CAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACN *****	146
4_FW	CACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCA	300
4_RV	CACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCA *****	206
4_FW	AGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCCTCCGATCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGC	360
4_RV	AGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCCTC----- *****	236
4_FW	GGCGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGG	420
4_RV	-----	236

4_FW	CCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA	480
4_RV	-----	236
4_FW	CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGA	511
4_RV	-----	236

>Muestra_4_ITS(494pb)

ATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGGCTTACGCCCCGGGCCCGCGCCCG
 CCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAA
 CGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTG
 AATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTG
 CCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCCTCCGATCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGC
 ACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGCGCTTGCCGATCAAC
 CCAAATTTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA

MUESTRA 5

>5_RV

NNNNNCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCGGGGGGGACGACGCCAACACACAAGCCGGGCTTGAAG
GGCAGCAATGACGCTCGGACAGGNATGCCCCCGGAATGCCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGAT
GATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAGTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGAT
CCATTGTTGAAAGTTTTAATAGGTTTGCTATCAAGCACAGACAACACTAAAGACAGGAGGTTCCGGTGTGGTCTC
CGGCGGCTACCCCCGGGGGGGCGCACCGCCGAAGCAACGTTGGTCAGGTATTCACGGGTGGGAGGTTAGGC
CTGCCCGGGGGCAGACCTGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAG

>Muestra_5_ITS(416pb)

CGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCGGGGGGGACGACGCCAACACACAAGCCGGGCTTGAAGGGCAGC
AATGACGCTCGGACAGGNATGCCCCCGGAATGCCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCA
CTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCAGTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTG
TTGAAAGTTTTAATAGGTTTGCTATCAAGCACAGACAACACTAAAGACAGGAGGTTCCGGTGTGGTCTCCGGCG
GCTACCCCCGGGGGGGCGCACCGCCGAAGCAACGTTGGTCAGGTATTCACGGGTGGGAGGTTAGGCCTGCC
GGGGGCAGACCTGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAG

ANEXO 11. RESULTADOS DE LA BÚSQUDA EN BASES DE DATOS BOLD Y NCBI

MUESTRA 1

Resultados obtenidos tras la búsqueda en base de datos BOLD: Se muestran las secuencias con al menos un 95% de Identidad y Score superior a 500 puntos.

Especie	Score	Identidad (%)
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	553	96.82
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	539	96.15
<i>Paecilomyces variotii</i>	532	94.27
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	525	96.66
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	522	97.14
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	522	97.14
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	522	97.14
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	522	97.14
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	522	97.14
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	522	97.14
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	522	97.14
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	522	97.14

Resultados obtenidos tras la búsqueda en la base de datos NCBI: Se muestran las secuencias con al menos un 95% de Identidad y un 90% de cobertura.

Especie	Cobertura (%)	Identidad (%)	Código GenBank
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	93%	97.14%	NR_130679.1
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	90%	97.60%	AY753330.1

MUESTRA 2

Resultados obtenidos tras la búsqueda en base de datos BOLD: Se muestran las secuencias con al menos un 98% de Identidad y Score superior a 480 puntos.

Especie	Score	Identidad (%)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	480	98.98
<i>Penicillium chrysogenum</i>	480	98.98
<i>Penicillium granulatum</i>	480	98.98

<i>Penicillium sp. FPPen13</i>	480	98.98
<i>Penicillium chrysogenum</i>	480	98.98
<i>Penicillium chrysogenum</i>	480	98.98
<i>Penicillium chrysogenum</i>	480	98.98
<i>Penicillium chrysogenum</i>	480	98.98
<i>Penicillium chrysogenum</i>	480	98.98
<i>Penicillium chrysogenum</i>	480	98.98
<i>Penicillium allii-sativi</i>	480	98.98
<i>Penicillium desertorum</i>	480	98.98
<i>Penicillium allii-sativi</i>	480	98.98
<i>Penicillium chrysogenum</i>	480	98.98
<i>Penicillium chrysogenum</i>	480	98.98
<i>Penicillium allii-sativi</i>	480	98.98
<i>Penicillium allii-sativi</i>	480	98.98
<i>Penicillium chrysogenum</i>	480	98.98
<i>Penicillium allii-sativi</i>	480	98.98
<i>Penicillium chrysogenum</i>	480	98.98
<i>Penicillium chrysogenum</i>	480	98.98
<i>Penicillium allii-sativi</i>	480	98.98
<i>Penicillium allii-sativi</i>	480	98.98
<i>Penicillium chrysogenum</i>	480	98.98
<i>Penicillium chrysogenum</i>	480	98.98
<i>Penicillium chrysogenum</i>	480	98.98
<i>Penicillium chrysogenum</i>	480	98.98
<i>Penicillium chrysogenum</i>	480	98.98
<i>Penicillium sp. s060</i>	480	98.98
<i>Penicillium chrysogenum</i>	480	98.98

Resultados obtenidos tras la búsqueda en la base de datos NCBI: Se muestran las secuencias con al menos un 98,9% de Identidad y un 100% de cobertura.

Especies	Cobertura (%)	Identidad (%)	Código GenBank
<i>Penicillium tardo-chrysogenum</i>	100%	98.98%	MH865983.1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	100%	98.98%	MH856357.1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	100%	98.98%	AY373902.1

<i>Penicillium chrysogenum</i>	100%	98.98%	HQ026745.1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	100%	98.98%	NR_077145.1

MUESTRA 3

Resultados obtenidos tras la búsqueda en base de datos BOLD: Se muestran las secuencias con al menos un 100% de Identidad y Score superior a 500 puntos.

Especies	Score	Identidad (%)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	500	100
<i>Penicillium granulatum</i>	500	100
<i>Penicillium chrysogenum</i>	500	100
<i>Penicillium sp. s060</i>	500	100
<i>Penicillium griseofulvum</i>	500	100
<i>Buellia bouvetii</i>	500	100

Resultados obtenidos tras la búsqueda en la base de datos NCBI: Se muestran las secuencias con al menos un 100% de Identidad y un 99% de cobertura.

Especies	Cobertura (%)	Identidad (%)	Código GenBank
<i>Penicillium tardo-chrysogenum</i>	99%	100.00%	MH865983.1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	99%	100.00%	MH856357.1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	99%	100.00%	HQ026745.1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	99%	100.00%	AY373902.1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	99%	100.00%	NR_077145.1

MUESTRA 4

Resultados obtenidos tras la búsqueda en base de datos BOLD: Se muestran las secuencias con al menos un 100% de Identidad y Score superior a 494 puntos.

Especies	Score	Identidad (%)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	494	100
<i>Penicillium chrysogenum</i>	494	100
<i>Penicillium sp. ZL2117</i>	494	100
<i>Penicillium sp. ZL1140</i>	494	100
<i>Hyalodendron sp. JS1203</i>	494	100

<i>Penicillium sp. JS-2028</i>	494	100
<i>Penicillium granulatum</i>	494	100
<i>Penicillium chrysogenum</i>	494	100
<i>Penicillium chrysogenum</i>	494	100
<i>Penicillium chrysogenum</i>	494	100
<i>Penicillium chrysogenum</i>	494	100
<i>Penicillium allii-sativi</i>	494	100
<i>Penicillium desertorum</i>	494	100
<i>Penicillium allii-sativi</i>	494	100
<i>Penicillium chrysogenum</i>	494	100
<i>Penicillium chrysogenum</i>	494	100
<i>Penicillium allii-sativi</i>	494	100
<i>Penicillium allii-sativi</i>	494	100
<i>Penicillium chrysogenum</i>	494	100
<i>Penicillium allii-sativi</i>	494	100
<i>Penicillium chrysogenum</i>	494	100
<i>Penicillium chrysogenum</i>	494	100
<i>Penicillium allii-sativi</i>	494	100
<i>Penicillium allii-sativi</i>	494	100

Resultados obtenidos tras la búsqueda en la base de datos NCBI: Se muestran las secuencias con al menos un 100% de Identidad y un 100% de cobertura.

Especies	Cobertura (%)	Identidad (%)	Código GenBank
<i>Penicillium tardo-chrysogenum</i>	100%	100.00%	MH865983.1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	100%	100.00%	MH856357.1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	100%	100.00%	AY373902.1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	100%	100.00%	HQ026745.1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	100%	100.00%	NR_077145.1
<i>Penicillium flavigenum</i>	100%	99.80%	MH862182.1
<i>Penicillium flavigenum</i>	100%	99.80%	NR_103695.1
<i>Penicillium vanluykii</i>	100%	99.80%	NR_111813.1
<i>Penicillium rubens</i>	100%	99.80%	NR_111815.1
<i>Penicillium griseofulvum</i>	99%	99.80%	MH854925.1
<i>Penicillium fimorum</i>	99%	99.80%	NR_153267.1

<i>Penicillium fimorum</i>	99%	99.80%	KU904343.1
<i>Penicillium fimorum</i>	99%	99.80%	KU904341.1
<i>Penicillium griseofulvum</i>	99%	99.80%	NR_103692.1

MUESTRA 5

Resultados obtenidos tras la búsqueda en base de datos BOLD: Se muestran las secuencias con al menos un 99% de Identidad y Score superior a 400 puntos.

Especies	Score	Identidad (%)
<i>Aspergillus calidoustus</i>	411	99.52
<i>Aspergillus calidoustus</i>	411	99.52
<i>Aspergillus calidoustus</i>	411	99.52
<i>Aspergillus calidoustus</i>	411	99.52
<i>Aspergillus calidoustus</i>	411	99.52
<i>Aspergillus ustus</i>	410	99.52
<i>Aspergillus aff. ustus A24</i>	410	99.52
<i>Aspergillus calidoustus</i>	409	99.28
<i>Aspergillus calidoustus</i>	408	99.28
<i>Aspergillus calidoustus</i>	407	99.28
<i>Aspergillus ustus</i>	406	99.28
<i>Aspergillus pseudodeflectus</i>	406	99.04
<i>Aspergillus pseudodeflectus</i>	406	99.04

Resultados obtenidos tras la búsqueda en la base de datos NCBI: Se muestran las secuencias con al menos un 98% de Identidad y un 99% de cobertura.

Especies	Cobertura (%)	Identidad (%)	Código GenBank
<i>Aspergillus calidoustus</i>	99%	99.52%	MH863122.1
<i>Aspergillus keveii</i>	99%	98.55%	MH862354.1
<i>Aspergillus keveii</i>	99%	98.55%	MF004311.1