

Aislamiento e identificación de microorganismos en biopelículas provenientes del Castillo de Chapultepec, Ciudad de México.

L. Páramo Aguilera^{1*}, J. Narváez Zapata² y E. De la Cruz².

¹Centro de Investigación y Estudios del Medio Ambiente (CIEMA), Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), PO Box 5595, Managua, Nicaragua. E-mail: leandro.paramo@ciema.uni.edu.ni

²Instituto Politécnico Nacional (IPN), Centro de Biotecnología Genómica (CBG), Blvd del Maestro esq Elías Piña Col Narciso Mendoza C.P 88710. Cd Reynosa, Tam, Mex, A.P N° 152.
e-mail: jnarvaez@ipn.mx ; edelacruz@ipn.mx

(Recibido/received: 14-Septiembre-2011; aceptado/accepted: 09-Diciembre-2011)

RESUMEN

La microbiología hasta hoy está fundamentada en cultivos puros y microorganismos independientes, en realidad los cultivos puros no existen en la naturaleza, sino que los microorganismos se combinan en grandes colonias limosas (biopelículas) donde los diversos individuos establecen relaciones y dependencias. Solamente en Estados Unidos de América se estima que las biopelículas causan billones de dólares en pérdidas de energía, daños a equipos, contaminación de productos e infecciones médicas. En este trabajo se presentan los resultados del aislamiento de microorganismos por métodos microbiológicos y moleculares a partir de biopelículas localizadas en El Castillo de Chapultepec de la ciudad de México, determinándose que en las mismas coexisten diferentes géneros de hongos filamentosos como Cladosporium, Mucor, Alternaria, Aspergillus, Aureobasidium, Rhodotorulas entre otros. Además de géneros bacterianos como Bacillus, Pantoea, Kokuria, etc. Muchos de estos géneros microbianos han sido abundantemente reportados como participantes en procesos de biodeterioro a monumentos y otros están reportados como contribuyentes a su restauración, por lo que este trabajo abre las puertas a futuras investigaciones que permitan la restauración biológica de los monumentos, su conservación y desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos.

Palabras clave: Microbiología; cultivos puros; biopelículas; aislamiento de microorganismos; métodos microbiológicos; procesos de biodeterioro.

ABSTRACT

Today microbiology is based on pure cultures and separate microorganisms, pure cultures really do not exist in nature, because that microorganism are combined into large colonies slimy (biofilms) in which the various individuals establish relationships and dependencies. Only in the United State of America is estimated that biofilms cause billions of dollars in energy losses, equipment damage, product contamination and medical infections. This paper presents the results of the isolation of microorganisms by microbiological and molecular methods, from biofilms located in the Castle of Chapultepec in Mexico City. In the biofilm coexist different genres of filamentous fungi such as Cladosporium, Mucor, Alternaria, Aspergillus, Aureobasidium, Rhodotorula and others in those biofilms; besides bacterial genera as Bacillus, Pantoea, Kokuria, etc. Many of these microbial genera have been widely reported as a participating in biodeterioration processes to monuments and others are reported as contributing to its restoration, so this work opens the door to future researches that allow biological restoration of monuments, conservation and development of new biotechnological processes.

Keywords: Microbiology; pure cultures; biofilms; isolation of microorganism; microbiological methods; biodeterioration processes.

* Autor para la correspondencia

INTRODUCCIÓN

El desgaste de los edificios es un problema generalizado en muchas partes alrededor del mundo, ya sean hechos estos edificios de concreto o edificios históricos hechos de rocas o ladrillos (Anne et al., 2010). Esos materiales porosos están sujetos al deterioro debido a la acción de agentes ambientales externos (físicos, químicos y biológicos) (Gaspar y De Brito, 2008). Muchos fenómenos pueden ser observados, los más comúnmente reportados incluyen formación de fluorescencia, desgaste, cambios de coloración con formaciones antiestéticas, sobre crecimiento de biopelículas fotosintéticas verdes, etc. (Laiz et al., 2009).

Las comunidades microbianas colonizan diferentes zonas de las rocas, creciendo como epilíticas sobre la superficie y como comunidades endolíticas (chasmoendolíticas y criptoendolíticas) dentro de fracturas y poros de los sustratos (Golubic et al., 1981). Videla et al., (2003) plantean que los mecanismos de biodeterioro se deben, predominantemente, a procesos de biosolubilización. Estos procesos involucran la producción de metabolitos ácidos provenientes de la actividad bacteriana y fúngica que pueden potenciar los efectos agresivos de la corrosión atmosférica.

El término biopelícula (biofilm) hace referencia a una serie de microorganismos que se encuentran agregados en un exopolímero compuesto de glicocálix (75%) y que se organizan en forma de colonias adheridas a diferentes superficies (Fig.1), ya sean blandas, animadas e inanimadas (Costerton, 1999). La importancia de las biopelículas se comenzó a estudiar desde mediados de la década de 1970, cuando se hablaba de los efectos en los diversos ambientes naturales de estas organizaciones no muy bien comprendidas. Dos décadas después con el desarrollo de técnicas microscópicas más avanzadas que permitieron entender la ultra estructura y dinámica de estas asociaciones, se pudo constatar este hecho y se comenzaron a involucrar en múltiples y distintos eventos que tienen impacto sobre el bienestar del hombre y su entorno (McCarthy, 2001; Betancourth et al., 2004).

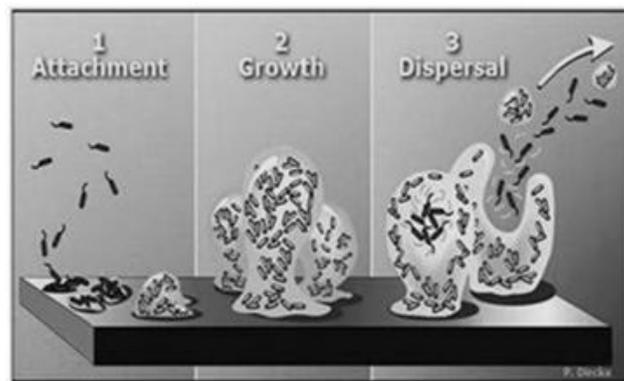


Figura1. Proceso de formación de la biopelícula. Adherencia (1), crecimiento (2) y dispersión (3) (Wang et al., 2010).

Es conocido que las biopelículas se pueden formar en diferentes tipos de superficies que incluyen, superficies naturales, metales, plásticos, implantes médicos, entre otros (Figura2A-D). Dondequiera que haya una combinación de humedad, nutrientes y una superficie adecuada, es posible encontrar la formación de una biopelícula que provocan diversos daños y/o beneficios en dependencia del lugar en donde se encuentren.

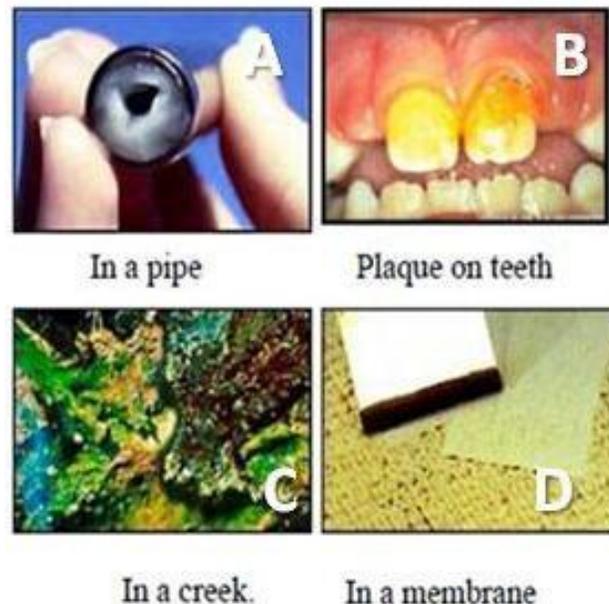


Figura 2. Biopelícula formadas en una tubería (A), en una placa dental (B), en un arroyo (C) y en una membrana (D), (Composición fotográfica, Wang et al., 2010).

En este trabajo se pretende dar una muy breve introducción al mundo de las biopelículas y su aplicación, enfatizando en los daños que las mismas pueden causar a los monumentos del patrimonio histórico, tomando como referencia los trabajos de aislamiento e identificación de microorganismos que se han venido realizando en el Castillo de Chapultepec de la ciudad de México, D.F.

METODOLOGÍA

Descripción del área de muestreo: Castillo de Chapultepec (Fig.3A y B) ubicado en lo alto del cerro del mismo nombre, en el centro del Bosque de Chapultepec, situado en la ciudad de México. Se definieron los mejores puntos para la recolección de las muestras considerando los diferentes aspectos climatológicos que intervienen en la formación de la biopelícula como son: exposición a la luz solar, temperatura, incidencia del aire, humedad, entre otros (Videla, *et al.*, 2003), además de la contaminación ambiental presente en los alrededores del Castillo.



Figura 3. Vista aérea del Castillo Chapultepec y la ciudad de México de fondo (A) y vista frontal del Castillo (B).

Toma de muestras y aislamiento microbiológico: Para el aislamiento e identificación de microorganismos a partir de biopelículas epilíticas muestreadas en el Castillo de Chapultepec, se eligieron tres puntos en la zona del Castillo, los cuales fueron: puntos I y II relacionados con el muro perimetral del Castillo ubicados a unos 100 y 150 metros de distancia respectivamente de la puerta de ingreso principal a Chapultepec, además se realizó el muestreo de un tercer punto (III) ubicado en un monumento al interior del Castillo (Monumento en honor a los niños héroes), en el cual se observó deterioro de la roca, grandes desprendimientos de la misma y zonas fracturadas. Los muestreos se realizaron en forma aséptica (Figura 4A) utilizando técnicas no invasivas. Las biopelículas se desprendieron de la superficie de las paredes seleccionadas para el estudio con una espátula metálica

estéril (Fig. 4B) y se colocaron en frascos estériles que luego se transportaron al laboratorio.



Figura 4. Toma de muestra de forma aséptica (A) y comparación del tamaño de la biopelícula con el tamaño de una espátula (B).

Además se tomaron muestras con hisopos para medios de cultivo líquidos ricos en nutrientes (ejemplo TGY, LB, V-8) previamente seleccionados para este trabajo y que permitieron el crecimiento de un amplio espectro de microorganismos que pudiesen estar presentes en el lugar de muestreo. De la misma forma se utilizaron medios de cultivo sólidos preparados en placas Petry de los mismos caldos y se incluyó el PDA, éstas fueron inoculadas en el sitio a partir de muestras tomadas con palillos estériles. De esta forma se pudo obtener un amplio espectro de microorganismos que pudiesen crecer tanto en los caldos como en los medios sólidos.

Aislamiento de microorganismos presentes en la muestra. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio lo más rápidamente posible, cuidando de que las placas estuviesen bien cerradas para evitar cualquier contaminación ambiental, lo mismo que los tubos en los que se trasladó los medios líquidos inoculados (Fig.5A). En el laboratorio, las muestras tomadas en medios sólidos se incubaron a 28-30 grados Celsius, que es la temperatura en la que crece un amplio rango de microorganismos mesófilos que pudiesen coexistir en el lugar de muestreo. Diariamente se revisaron las placas para determinar el momento en que serían retiradas de la incubadora, en función del crecimiento que se observó y del tipo de microorganismos que pudiesen identificarse desde el punto de vista morfológico (Figura 5B). Los medios líquidos por su parte, fueron puestos a condiciones de atmósfera controlada y en agitación continua por un periodo de 24 a 48 horas, se observó el crecimiento por medio del enturbiamiento de los medios en comparación con testigos no inoculados. Cada 48 horas, se tomaron 100 µL de muestra de los medios líquidos inoculados y se llevó a medios sólidos similares a los ya usados para las placas y se pusieron a incubar en las mismas condiciones descritas anteriormente. El

proceso de plaqueo cada 48 horas para los medios líquidos se mantuvo por 12 días, en que se mantuvieron los tubos en agitación continua y se consideró agotado el proceso de aislamiento microbiano a partir de estos medios líquidos.

Concluida la etapa anterior, se procedió al aislamiento de cada especie observada según su morfología en el crecimiento de las placas hasta determinar que se contaba con cultivos puros (Figura 5C), tomando en cuenta si se trataba de un hongo levaduriforme, de un hongo filamentoso o de una bacteria en apariencia y del resultado de su observación al microscopio.

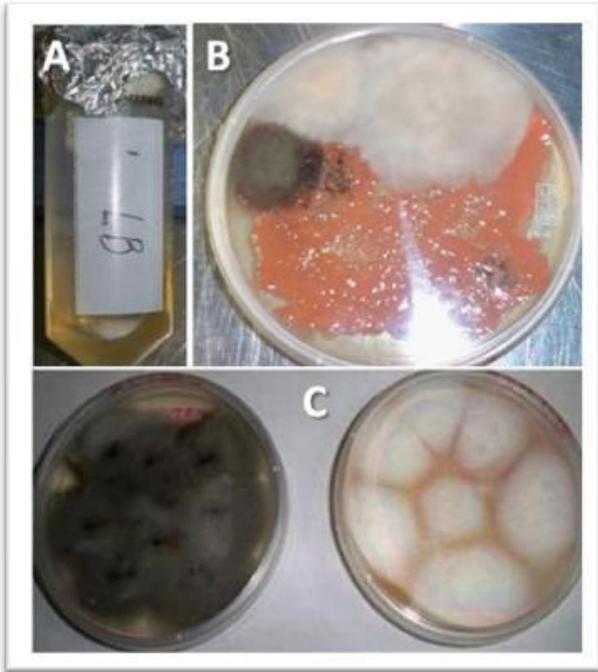


Figura.5 Medio líquido (A), Placa Petry mostrando una mezcla de diferentes microorganismos crecidos en el medio (B) y hongos filamentosos puros una vez aislados (C).

Posteriormente se identificaron preliminarmente cada microorganismo o grupos de microorganismos, para lo cual se usaron diferentes técnicas microscópicas (tinciones, gotas húmedas, microcultivos entre otras), técnicas específicas como tinción Gram para el caso de las bacterias, y observaciones morfológicas para hongos filamentosos. Una vez aislados y purificados los microorganismos se preservaron en glicerol al 86 % diluido en agua mQ estéril y puestos a -70°C .

La identificación a nivel de género para el caso de los hongos filamentosos se llevó cabo haciendo uso de la información morfológica recabada y lo reportado en

diversas fuentes bibliográficas (Bastian *et al.*, 2010; Betancourth *et al.*, 2004). En el caso de las levaduras, se utilizó el API 20 CAUX para el desarrollo de la diferentes pruebas bioquímicas, corroborando esta información con lo reportado por Barnett *et al.*, 2000.

Para la identificación final a nivel de especie, se realizó la extracción del ADN genómico por el método del Fenol/Cloroformo (Raeder y Broda, 1985) para cada uno de los aislados y para la amplificación del ADN por PCR, se utilizaron tres oligonucleótidos reportados previamente para la amplificación de las regiones filogenéticas conservadas de la subunidad 18S ribosomal de eubacterias y 16S ribosomal de arqueobacterias. El oligonucleótido en sentido ó Com1 es: 5' CAG CAG CCG CGG TAA TAC 3' y el oligonucleótido en anti sentido ó Com2-Ph es: 5' CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT 3' (Schwieger y Tebbe, 1998). Adicionalmente, se probaron los oligonucleótidos propuestos por Strom y colaboradores, (2002) (16S-for 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 16S-Rev 5'-CGGGAACGTATTCACCG-3') bajo las mismas condiciones. Los hongos levaduriformes y mohos fueron determinados empleando la región 26S del ADN ribosomal, utilizando los oligonucleótidos NL1 (5' GCATTCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') y NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3') (White *et al.*, 1990). Finalmente, los productos amplificados por PCR fueron enviados a secuenciación para la realización de los estudios filogenéticos. Tanto la información morfológica y bioquímica, como la información molecular, fue cruzada para definir la identidad final para cada microorganismo aislado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el punto I se localizaron diversos tipos de biopelículas como las mostradas en las Figuras 6A y 6B. En el punto II se localizaron además de biopelículas como las mencionadas para el punto I, diversas zonas biomineralizadas como la mostrada en la Figura 6C, en las cuales si se levantaba la capa de biominerales se observaban capas de microorganismos formando biopelículas. En este punto se muestreó superficialmente y por debajo de la zona biomineralizada. Del muestreo del punto III (Figura 6D) ubicado en un monumento al interior del Castillo (Monumento en honor a los niños héroes), se observó deterioro de la roca, desprendimientos y zonas fracturadas.

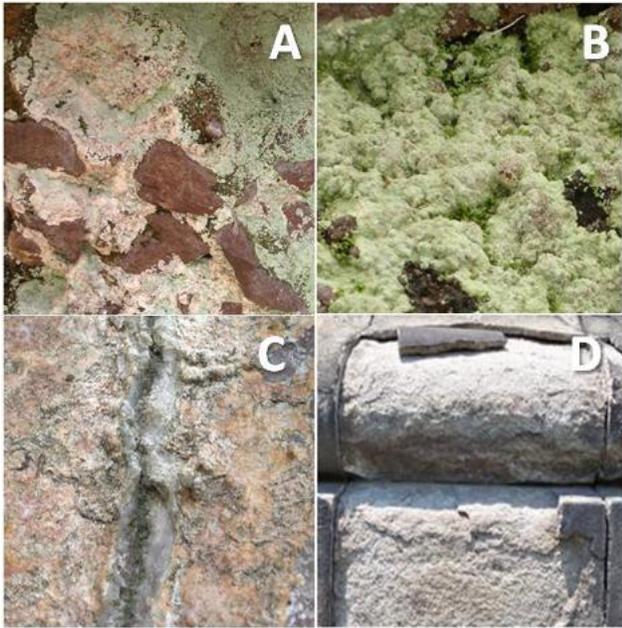


Figura 6. Biopelículas localizadas en el punto I (A y B), en el punto II (C) y en el punto III (D) de los diferentes puntos muestreados.

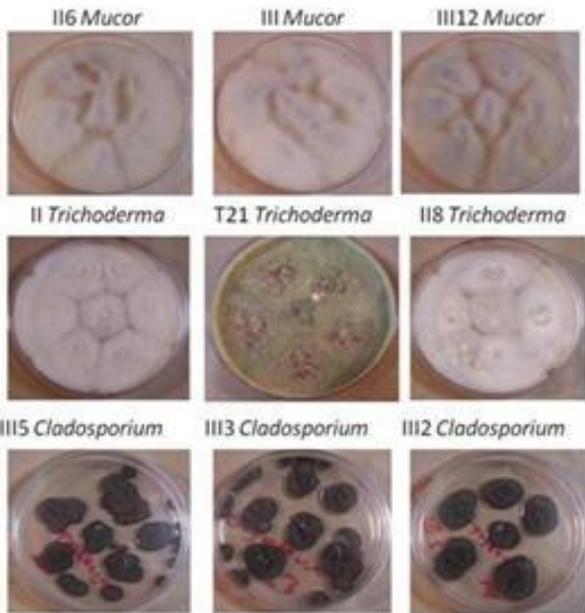


Figura 7. Algunos de los aislados puros obtenidos: *Mucor*, *Trichoderma* y *Cladosporium*.

La identificación de los hongos filamentosos a nivel de género, se realizó mediante pruebas al microscopio considerando características morfológicas como largo y ancho de la conidia formada, coloración en placa crecida en PDA de frente y reverso de la misma, crecimiento en

PDA a diferentes pH, entre otras variables (datos no mostrados). De un total de más de 40 aislados de hongos filamentosos, se lograron aislar e identificar y determinar que en las biopelículas muestreadas coexisten géneros como: *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Trichoderma* *Aspergillus* entre otros como los mostrados en la Figura 7.

Para el proceso de identificación de hongos filamentosos se aplicó la técnica de microcultivos para cada uno de los aislados tal y como se muestra en la Figura 8, para el caso de *Aspergillus niger*.

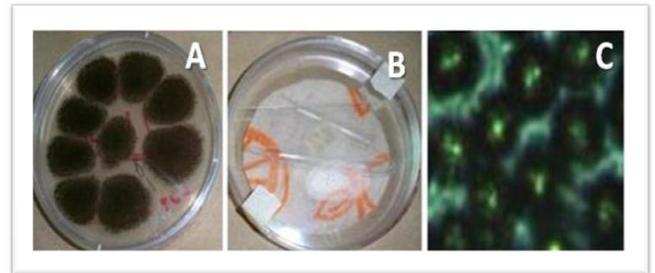


Figura 8 Aplicación de la técnica de microcultivos para la identificación morfológica a nivel de género. Cultivo puro (A), microcultivo en placa Petry (B) y esporas de *Aspergillus niger* (C).

Debido a la ubicación de los puntos de muestreo seleccionados, los mismos estaban bajo la influencia de las diferentes variables ambientales como son la humedad, la luz, la temperatura y los contaminantes propios de la ciudad de México (Parrish *et al.*, 2009). En general, algunas especies de hongos filamentosos provenientes de monumentos, como: *Trichodermas*, *Alternaria*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Epicoccum*, *Penicillium*, entre otros han sido reportados previamente relacionados a monumentos y estructuras históricas (Grbic *et al.*, 2010; Gorbushina *et al.*, 2002). Algunos géneros de hongos filamentosos como *Cladosporium*, *Penicillium*, *Mucor* y *Alternaria*, han sido reportados como participantes en los procesos de biodeterioro por medio de diversos mecanismos, algunos de los cuales no están del todo dilucidados (Gorbushina *et al.*, 2002; Bastian *et al.*, 2010).

En este trabajo se reportan diferentes géneros de hongos filamentosos aislados como: *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, coincidiendo con lo reportado por otros autores trabajando en condiciones similares (Gorbushina *et al.*, 2002). El deterioro observado en el punto III muestreado según la biopelícula de la figura 7D, está en

correspondencia con lo reportado como daño biológico realizado por los géneros aislados en este trabajo y previamente mencionados (Bastian *et al.*, 2010; Videla *et al.*, 2003; Gorbushina *et al.*, 2002; Sheerer *et al.*, 2009).

Las levaduras identificadas por medio del API 20 CAUX (datos no mostrados), y puestas a crecer en medio RAT (Figura 9) e incubados a 30 °C hasta por ocho días con vistas a determinar si las mismas formaban o no pseudohifas en el tiempo y de este modo contribuir a su identificación morfológica y bioquímica están en la Figura.10.

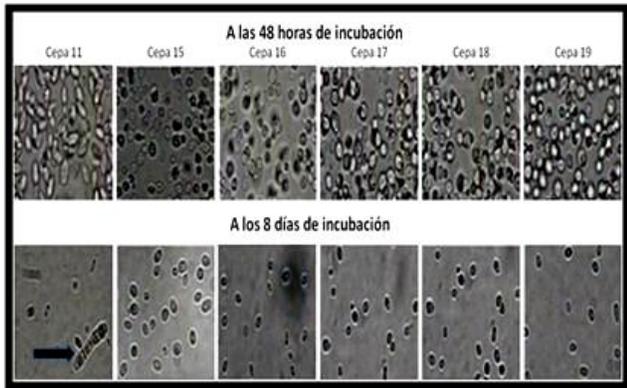


Figura.9. Proceso de incubación de levaduras en medio RAT para la identificación de pseudohifas. La flecha muestra la pseudohifa formada por *Aureobasidium* en correspondencia con lo esperado para este género.

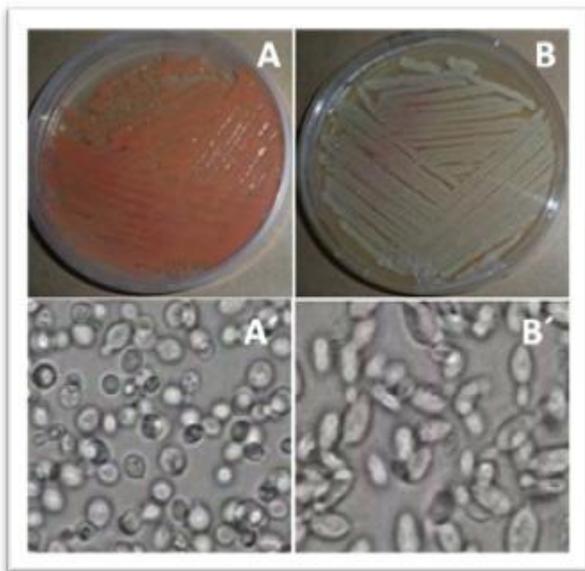


Figura.10. Aislados de los géneros *Rhodotorula* en placa y vistas al microscopio de luz (A y A'), además de levaduras del género *Aureobasidium* (B y B').

Los resultados de las pruebas bioquímicas y RAT (datos no mostrados) para levaduras permitieron identificar más de seis aislados pertenecientes a los géneros *Rhodotorula* y *Aureobasidium*. El aislado de *Aureobasidium* formó pseudohifas en correspondencia con lo indicado por Barnet, *et al.*, (2000), para la identificación de hongos levaduriformes a partir de datos bioquímicos. Así como se han reportado aislamientos de diferentes géneros de hongos filamentosos (Bastian *et al.*, 2010; Videla *et al.*, 2003; Gorbushina *et al.*, 2002; Sheerer *et al.*, 2009), en el caso de las levaduras se han reportado aislamientos en monumentos de géneros *Rhodotorula* y *Aureobasidium*, estando muy bien documentada la participación de esta última en la formación de costras llamadas patinas que producen cambios de coloración en los edificios y producen apariencias antiestéticas en los mismos (Gorbushina *et al.*, 2002; Sheerer *et al.*, 2009). Coincidiendo con lo antes reportado, este trabajo presenta el aislamiento de estas levaduras a partir de biopelículas localizadas en el punto I, en donde se observó manchas negras en las paredes.

Para el caso de las bacterias, se obtuvieron más de 70 aislados bacterianos. Estos se observaron al microscopio, se realizaron las pruebas Gram y se les extrajo ADN para su secuenciación (Datos no mostrados) e identificaron los géneros: *Bacillus*, *Kokuria*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Brevundimonas*, *Microbacterium*, *Oceanobacillus*, *Stenotrophomonas* entre otros, como los mostrados en la Figura 11.

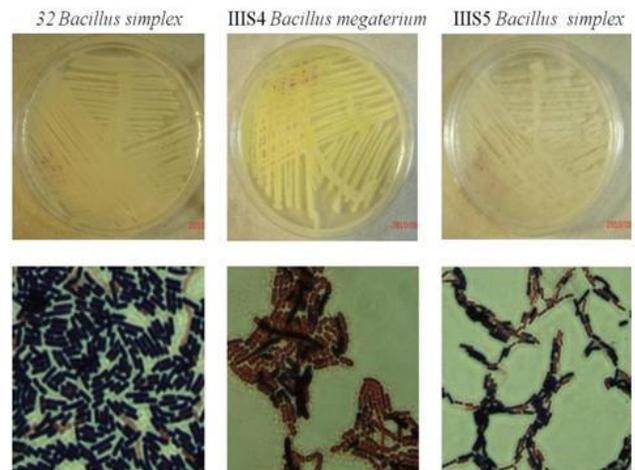


Figura11. Aislados de *Bacillus simplex* y *Bacillus megaterium*, así como sus correspondientes resultados en Gram.

Las pruebas Gram realizadas a cada uno de los aislados bacterianos mostraron la variabilidad Gram de los aislados obtenidos tal y como se muestra en la Fig.11. Finalmente, al igual que para el caso de hongos filamentosos y levaduriformes, la participación de las bacterias en monumentos deteriorados ha sido documentada por diferentes autores (Scheerer *et al.*, 2009; Milanesi *et al.*, 2009), aunque la participación de estas en el deterioro como tal no está del todo claro a la fecha. La distribución de los diferentes aislados bacterianos obtenidos, fue bastante similar en las diferentes biopelículas muestreadas y en los diferentes puntos. Esto último es muy interesante cuando se considera que las últimas tecnologías de bioprecipitación de carbonatos de calcio (Anne *et al.*, 2010; Zamarreño *et al.*, 2009; Scheerer *et al.*, 2009), parte de considerar la estimulación de la microbiota existente en el lugar y así lograr la restauración de los monumentos con la menor introducción de agentes externos.

Muchos de los aislados obtenidos en los diferentes puntos muestreados han sido documentados en su participación en procesos de biodeterioro y los posibles mecanismos por los cuales se desarrolla este (fundamentalmente hongos filamentosos y levaduriformes). Queda aún mucho por aprender sobre el papel que juegan las bacterias en esa comunidad microbiana llamada biopelícula y su relación con el biodeterioro, aunque a la fecha si ha sido documentado el papel de muchos tipos de *Bacillus* en la protección y restauración de los monumentos pertenecientes al patrimonio cultural (Zamarreño *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Mediante el desarrollo de este trabajo se obtuvieron más de 40 aislados de hongos filamentosos, más de seis aislados levaduriformes y alrededor de 70 aislados bacterianos, pertenecientes a los diferentes puntos muestreados y por tanto miembros activos de las diferentes biopelículas o comunidades microbianas muestreadas. El hecho de que en una misma biopelícula se hayan aislado microorganismos cuya participación ha sido muy bien documentada en procesos de biodeterioro como los géneros *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aureobasidium* entre otros y al mismo tiempo se aislen *Bacillus* diversos cuya participación en procesos de bioprecipitación de cristales de carbonato de calcio y restauración de monumentos ha sido ampliamente documentada, deja claro que aún hay mucho por

aprender de las relaciones que se establecen entre las diferentes especies en la biopelícula y que su metabolismo es diferente al estado libre. Por otra parte, la realización de este trabajo abre muchas puertas de investigación a futuro; ya que se deberá dilucidar con más claridad que microorganismos están participando y en qué medida en la formación de la biopelícula, cuáles de los microorganismos aislados están participando y son capaces de bioprecipitar carbonatos de calcio in situ, cual es la participación de los diferentes géneros de hongos en los procesos de biodeterioro observados y la búsqueda de aplicaciones biotecnológicas diversas para géneros interesantes como *Trichodermas*, *Aureobasidium* y *Kokurias* entre otros, que han sido mencionados en diversos procesos biotecnológicos desde el tratamiento biológico de aguas hasta la producción de diferentes enzimas. Investigaciones como las mencionadas, permitirán que en un futuro no muy lejano podamos contar con una tecnología amigable que permita la restauración de los monumentos y su conservación, así como se hará un aporte valioso a la sociedad con la producción de diversos productos biotecnológicos de primera necesidad.

REFERENCIAS

- Anne, S; Rozenbaum, O; Andrezza, P y R.Jean-Luis. (2010). Evidence of a bacterial carbonate coating on plaster samples subjected to the calcite bioconcept biomineralization technique. *Construction and building materials* 24:1036-1042.
- Barnet JA, Payne RW, y Yarrow D. (2000). YEAST: Characteristics and identification. Third Edition. *CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS*.
- Bastian, F., Jurado, V., Nováková, A, Alabouvette, C y Saiz-Jimenez, C. (2010). The microbiology of Lascaux Cave. *Microbiology*. 156: 644-652.
- Betancourth, M B. Botero, J .E y Rivera S. P. (2004). Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Colombia Médica*, Vol. 35 N° 3 (Supl 1).
- Costerton.J.W. (1999). Introduction to biofilms. *Int J Antimicrob Agents*; 11: 217-221.
- Chang Y-T., Thirumavalavan M. y Lee J-F. (2010). Effects of PAH biodegradation in the presence of non-ionic surfactants on a bacterial community and its exoenzymatic activity. *Journal of Environmental Science and Health*, Part A 45:4-8.

- Gaspar, P.L y J. De Brito. (2008). Quantifying environmental effects on cemen-rendered- facades: a comparison between degradation indicators. *Building and Environment* 43 (11): 1818-1828.
- Golubic, S., Friedman y E, Schneider, J. (1981). The lithobiotic ecological niche, with special reference to microorganisms. *J Sediment Petrol* 51: 475-478.
- Grbic, L. W., Vukojevic, J., Simic, G.S., Krizmanic, J y Stupar, W. (2010). Biofilm forming cyanobacteria, algae and fungi on two historic monuments in Belgrade, Serbia. *Arch. Biol. Sci*, Belgrade 62 (3), 625-631. DOI:10.2298/ABS1003625L
- Gorbushina, A. A., Lyalikova, N. N., Vlasov, D. Y., y Khizhnyak, T. V. (2002). Microbial communities on the monuments of moscow and St. Petersburg: Biodiversity and trophic relations. *Microbiology* 71, 350-356. (Translated from Mikrobiologiya 71, 409-417).
- Laiz, L; Miller, A.z; Jurado, V; Ekatova, E; Sánchez-Moral, S; González, J.M; Dionisio, A; Macedo, M.F y C. Saiz-Jimenez. (2009). Isolation of five *Rubrobacter* strains from biodeterioratedv monuments. *Naturwissenschaften* 96:71-79.
- McCarthy M. (2001). Breaking up the bacterial happy home. *Lancet* ; 23: 357: 2032-2033.
- Milanesi, C. A., Baldi, F., Borin, S., Brusetti, L., Ciampolini, F., Iacopini, F y Cresti, M. (2009). Deterioration of medieval painting in the chapel of the Holy Nail, Siena (Italy) partially treated with Paraloid B72. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63:844-850
- Parrish, D.D.,David, D., Kuster, W.C., Shao, M., Yokouchi, Y., Kondo, y., Goldan, P.D., de Gouw, J.A., Koike, M y Shira, T. (2009). Comparison of air pollutant emissions among mega-cities. *Atmospheric Environment*. 43 6435-6441
- Raeder ,U y Broda, P. (1985). Rapid preparation of ADN from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*. 1:17-20.
- Scheerer, S., Ortega-Morales, O y Gaylarde, Ch. (2009). Microbial Deterioration of Stone Monuments- An Updated Overview. *Advances in Applied Microbiology*, vol 66. DOI: 10.1016/S0065-2164(08)00805-8.
- Schwieger, F y Tebbe, C. (1998). A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphisms for 16S rRNA gene-bases microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 64:4870-4876.
- Ström, K., Sjögren, J., Broberg, A y Schnürer, J. (2002). *Lactobacillus plantarum* MiLAB produces the antifungal Cyclic Dipeptides Cyclo (L-Phe-L-Pro) and Cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3- Phenyllactic Acid. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 4322-4327.
- Videla, H. A., Guiamet, P. S y Gómez de S. (2003). Biodeterioro de materiales estructurales de sitios arqueológicos de la civilización maya. *Revista del Museo de La Plata Publicación Técnica y Didáctica*, 44: 1-11.
- Wang, Q., Zhang, T y Cogan, N. (2010). Modeling biofilms using complex fluid models. Material docente, University Tallahassee, Florida State.
- White T. J., Bruns T., Lee S y Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes form phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White (Eds.), *Academic Press, London UK*. pp. 315-322.
- Zamarreño, D.V., Inkpen, R y May, E. (2009). Carbonate Crystals Precipitated by Freshwater Bacteria and Their Use as a Limestone Consolidant. *Applied and Environmental Microbiology*. 5981-5990 Vol. 75, No. 18.0099-2240/09/\$08.00_0 doi:10.1128/AEM.02079-08.

NOTACIÓN

- TGY Triptosa Glucosa Agar
 PDA Papa Dextrosa Agar
 LB Luria Bertani
 V-8 Jugo comercial a base de 8 vegetales diferentes.
 µL Microlitros
 AND Acido desoxirribonucleico
 ADNg Acido desoxirribonucleico genómico
 Gram Prueba morfológica de bacterias.
 API 20 CAUX Prueba bioquímica para levaduras.
 RAT Medio pobre en nutrientes para la detección de pseudohifas.



Leandro Páramo Aguilera, Graduado como Ingeniero Químico con maestría en Ingeniería Química y énfasis en procesos biotecnológicos, en el Instituto Superior Politécnico “José Antonio Echeverría”, ISPJAE, de la Ciudad de la Habana, Cuba, en el año 1990. En 1997 se gradúa como Master en

Microbiología y énfasis en bacteriología en la Universidad de Costa Rica, UCR. Actualmente en proceso de Doctorado en Ciencias de la Biotecnología Genómica en el IPN (Instituto Politécnico Nacional) de México. Amplia experiencia en el desarrollo de procesos biotecnológicos (biofertilizantes, bebidas alcohólicas, fermentados lácteos, etc) y asesoría a procesos alimenticios y agrícolas relacionados con biotecnología.