



FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE CONSTRUCCIÓN CIVIL

**IDENTIFICACIÓN DE LA DIVERSIDAD FÚNGICA
PRESENTE EN EL BIODETERIORO DEL MÁRMOL
EN CEMENTERIOS MUNICIPALES DEL CERRO
PANTEÓN**

Por

Nicole Andrea Rodríguez Godoy

Memoria para optar al grado de licenciado en Ciencias de la
Construcción y al Título de Ingeniero en Construcción

Prof. Guía: Dr. Rodrigo Ortiz M.

Agosto, 2019

Dedicado a mis padres Oscar y Teresa, quienes han dado todo para formarme como la mujer que soy, sin duda nada sería posible en mi vida si no nos hubiésemos encontrado como familia, todo se los debo a ustedes.

Agradecimientos

A mi mamá Teresa por enseñarme cada día que los no puedo no existen, por alentarme a lograr todo lo que me propongo y sobre todo, agradecer cada abrazo reconfortante y palabra precisa cada vez que he bajado los brazos.

A mi papá Oscar, eres mi ejemplo a seguir, gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme en todo lo que necesito tus sabios consejos siempre me han ayudado a ver la luz cada vez que desespero, eres mi fiel compañero.

A Sebastián, mi amor, gracias por confiar incondicionalmente en mí. Tu amor, compañía, preocupación y aliento hacen que este proceso y la vida sea toda una aventura juntos.

A Paola mi prima, amiga y hermana, gracias por ser la maestra de las bibliografías, que bonito es poder contar contigo siempre. Y a todos mis familiares, abuel@s, tí@s, prim@s gracias por cada demostración de preocupación, buenas energías y ánimo.

A mis amigas de la vida Camila, Marjorie y Paulina, por fin seremos todas tituladas, gracias por acompañarme en cada paso, son lo máximo.

A mis compañeros de Universidad Camila, Carla, Lucas, Maximiliano, Matías y Felipe sin duda la universidad se convirtió en un lugar amigable gracias a ustedes.

A mi profesor guía, Rodrigo Ortiz, gracias por estar presente cada vez que lo necesité y por guiarme en este desconocido mundo de los hongos y a Manuel Ortiz, gracias por enseñarme todos los trabajos de laboratorio pero sobre eso gracias por su gran calidad humana.

ÍNDICE

LISTA DE ILUSTRACIONES	6
LISTA DE TABLAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
CAPÍTULO I: ANTECEDENTES GENERALES	10
1.1.- Introducción	11
1.2.- Planteamiento del problema	12
1.3.- Pregunta de Investigación	14
1.4.-Objetivos de la Investigación	14
1.4.1.- Objetivo General	14
1.4.2.- Objetivos Específicos	14
1.5.- Alcances	14
1.6.- Estructura de la investigación	14
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	16
2.1.- Cementerios del Cerro Panteón.....	17
2.2.- Mármol	17
2.3.- Biodeterioro.....	18
2.4.- Biodeterioro del mármol	18
2.5.- Organismos biodeteriorantes.....	19
2.6.- Factores determinantes del biodeterioro	20
2.7.- Alteraciones causadas por los microorganismos.....	21
2.8.- Hongos	22
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	25
3.1.- Programa experimental	26
3.1.1.- Etapa I: Formulación de la investigación	26
3.1.2.- Etapa II: Programa de investigación	26
3.1.3.- Etapa III: Análisis de resultados y conclusiones.....	26
3.2.- Toma de muestras y aislación de microorganismos.....	28

3.3.- Preparación medio de cultivo sólido	32
3.4.- Inoculación de cultivo en placas Petri	32
3.5.- Inoculación de hongos en tubos de ensayos	32
3.6.- Preparación del medio de cultivo líquido	33
3.7.- Inoculación de hongos en medio de cultivo líquido	33
3.8.- Secado y aislación de muestras	34
3.9.- Extracción de ADN	35
3.10.- Amplificación de ADN	35
3.11.- Secuenciación de los productos de PCR	36
3.12.- Identificación de hongos	36
3.13.- Imágenes de los hongos identificados	36
CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	37
4.1.- Presentación de resultados	38
4.2.- Análisis de resultados	44
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES	48
5.1.- Conclusiones	49
ANEXO I	50
ANEXO II	57
ANEXO III	63
ANEXO IV	67
ANEXO V	71
BIBLIOGRAFÍA	78

LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 2.1: Estructura de los hongos.....	23
Ilustración 3.1: Diagrama de la investigación.	27
Ilustración 3.2: Región de Valparaíso – Cementerios municipales del Cerro Panteón.....	28
Ilustración 3.3: Croquis sectorización Cementerio N°1.	29
Ilustración 3.4: Croquis sectorización Cementerio N°2.	30
Ilustración 3.5: Toma de muestra.	31
Ilustración 3.6: Tabla control toma de muestras.	31
Ilustración 3.7: Inoculación de cultivos puros en tubos de ensayos.	33
Ilustración 3.8: Matrices colocados en shaker orbital.....	34
Ilustración 3.9: Micelio de hongo filtrado.	34
Ilustración 3.10: Micelio de hongo deshidratado y posteriormente pulverizado.	35
Ilustración 4.1: Hongos identificados de ambos Cementerios.	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1: Actividades perjudiciales de microorganismos en materiales de construcción (extracto).....	21
Tabla 2.2: Alteraciones producidas en materiales por microorganismos (extracto).	22
Tabla 4.1: Planilla toma de muestras Cementerio N°1 y N°2.	39
Tabla 4.2: Planilla Extracción y Amplificación de ADN Cementerio N°1.....	40
Tabla 4.3: Planilla Extracción y Amplificación Cementerio N°2.	41
Tabla 4.4: Especies identificadas de las muestras de las esculturas de mármol del Cementerio N°1 y N°2.	42
Tabla 4.5: Clasificación <i>Alternaria spp.</i>	45
Tabla 4.6: Clasificación <i>Cladosporium spp.</i>	45
Tabla 4.7: Clasificación <i>Epicoccum nigrum</i>	45
Tabla 4.8: Clasificación <i>Penicillium spp.</i>	45
Tabla 4.9: Clasificación <i>Candida dubliniensis</i>	46
Tabla 4.10: Clasificación <i>Fusarium spp.</i>	46
Tabla 4.11: Clasificación <i>Trichoderma atroviride</i>	46
Tabla 4.12: Clasificación <i>Arthriniium spp.</i>	47
Tabla 4.13: Clasificación <i>Neurospora crassa</i>	47
Tabla 4.14: Clasificación <i>Sordaria spp.</i>	47

RESUMEN

El 28 de Noviembre de 2005, Los Cementerios N°1 y N°2 de Valparaíso fueron nombrados Monumentos Históricos Nacionales declarados por el Consejo Nacional de Monumentos de Chile. Estos Cementerios poseen en su interior diversas esculturas de mármol, las que con el paso de los años se han visto afectadas por el biodeterioro. El biodeterioro del Patrimonio Cultural se entiende como una alteración irreversible de los materiales que lo constituyen debido a la actividad metabólica de una o más poblaciones de microorganismos u organismos vivos, entonces es importante identificarlos para comprender el grado de biodeterioro que están produciendo.

El objetivo de esta investigación fue identificar, a través de la técnica de biología molecular, PCR, los microorganismos fúngicos causantes del biodeterioro de las diferentes esculturas de mármol ubicadas en los Cementerios N°1 y N°2 del Cerro Panteón, Valparaíso. Las muestras obtenidas de los cementerios fueron sometidas a incubación, biología molecular y microscopía óptica con el fin de poder identificar las especies a las que pertenecen estos hongos.

Los resultados obtenidos permitieron identificar con un alto porcentaje de similitud de nucleótidos, superior al 97%, los géneros *Alternaria*, *Arthrimium*, *Candida*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Sordaria* y *Trichoderma*.

Palabras claves: Biodeterioro, Hongos, Mármol, Cementerios.

ABSTRACT

On November 28, 2005, Cemeteries N°1 and N°2 of Valparaíso were named National Historic Monuments declared by the National Council of Monuments of Chile. These cemeteries have several marble sculptures inside them, which over the years have been affected by biodeterioration. Biodeterioration of Cultural Heritage is understood as an irreversible alteration of the materials that constitute it due to the metabolic activity of one or more populations of microorganisms or living organisms, so it is important to identify them to understand the degree of biodeterioration they are producing.

The objective of this research was to identify, through the molecular biology technique, PCR, the fungal microorganisms that cause biodeterioration of the different marble sculptures located in Cemeteries No. 1 and No. 2 of Cerro Panteón, Valparaíso. The samples obtained from the cemeteries were subjected to incubation, molecular biology and optical microscopy in order to identify the species to which these fungi belong.

The results obtained allowed to identify with a high percentage of nucleotide similarity, greater than 97%, the genera *Alternaria*, *Arthrimium*, *Candida*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Sordaria* and *Trichoderma*.

Keywords: Biodeterioration, Fungi, Marble, Cemeteries.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES GENERALES

1.1.- Introducción

Chile cuenta con 1702 Monumentos Nacionales declarados por el Consejo de Monumentos Nacionales de Chile (CMN). La Región de Valparaíso posee 188 Monumentos Nacionales, 155 son Monumentos Históricos Inmuebles (Consejo de Monumentos Nacionales de Chile [CMN], 2019). Entre ellos se encuentran el Cementerio N°1 o Cementerio General de Valparaíso y el Cementerio N° 2 de Valparaíso, ubicados en el Cerro Panteón.

La importancia de la conservación del patrimonio funerario está relacionada a una conciencia mundial nacida a mediados del siglo XX la que se consolidó en la primera década del siglo XXI con la Declaración de Newcastle: *“Los Paisajes culturales no son solamente lugares agradables y amenos sino que también pueden ser lugares de dolor, sufrimiento, muerte, guerra, terapia, reconciliación y recuerdo”* (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura, 2005), y la Carta de Morellia: *“Los sitios, monumentos, conjuntos y elementos funerarios constituyen un caso particular, poco valorado y menos atendido, del patrimonio cultural “material”, acompañado a su vez por usos, costumbres, ritos, conductas y manifestaciones de cada cultura en torno a la inevitabilidad de la muerte y la disposición de los restos humanos, lo que conforma un patrimonio cultural “inmaterial,” de igual importancia y una de las manifestaciones de la diversidad cultural que han acompañado al género humano desde tiempos muy remotos y seguirán acompañándolo hasta su extinción”* (Colomines et al. 2005).

En la actualidad la importancia de la conservación de los camposantos radica en que estos forman parte de la cultura de un país, nos hablan acerca de las tradiciones y costumbres de las personas de un pueblo o ciudad (Larrondo, 2017). Sin importar si estos son monumentos o no, todos los cementerios deberían ser considerados patrimoniales, aun cuando estos carezcan de elementos arquitectónicos relevantes o sean de pequeña extensión, ya que se alojan en la memoria colectiva de la población (Herrera, 2017).

Actualmente, Valparaíso cuenta con 6 cementerios, tres son administrados por la CMV (Corporación Municipal Valparaíso), Cementerio N°1, 2 y 3 y los otros tres restantes administrados por privados, Cementerio Disidentes, Parque del Puerto y Cementerio Sendero. Hablar de los cementerios en Valparaíso es hablar casi de dos siglos de historia, cultura, memoria, identidad y patrimonio inmaterial y material. También de un legado que debemos visualizar, valorar y preservar antes de que los terremotos, el olvido o los descuidos nos pasen la cuenta y estos espacios se mueran (Ojeda, 2017).

En el mundo funerario el mármol se utiliza desde la antigüedad, es un elemento de categoría, debido a su elegante aspecto que permite resalta cualquier elemento funerario. Esta

roca se utiliza como revestimiento de lápidas o nichos, placas conmemorativas y esculturas para lápidas («El mármol», 2014).

1.2.- Planteamiento del problema

Desde la antigüedad el hombre ha utilizado la roca como material de construcción (Alarcón & Jiménez, 2013) y su utilización ha abarcado desde la construcción de monumentos antiguos y edificios históricos hasta estatuas en pequeña escala (Warscheid & Braams, 2000), debido a que gracias a su propia naturaleza la roca es uno de los mejores materiales soporta el paso del tiempo (Gutiérrez & Noningo, 2016).

Las rocas, durante su formación en la corteza terrestre son consideradas un material estable a altas presiones y temperaturas. Sin embargo, esto cambia al momento de ser expuestas a la superficie ya que sufren un proceso denominado meteorización (Tatis & Barbosa, 2013).

La meteorización, cuando se habla de rocas que forman parte de construcciones de interés histórico y cultural, se define como el deterioro o degradación de las rocas esto se produce desde que la roca entra en contacto con los agentes atmosféricos (viento, lluvia, heladas, entre otras) y con los contaminantes de naturaleza inorgánica y orgánica (Alarcón & Jiménez, 2013; Tatis & Barbosa, 2013).

El proceso denominado meteorización genera las condiciones necesarias para que diversos microorganismos y plantas puedan prosperar en el sustrato, lo que es conocido como biodeterioro (Zanardini et al., 2000). Es importante mencionar que el biodeterioro es considerado como una alteración irreversible producida por organismos biológicos debido a su actividad metabólica (Gutiérrez & Noningo, 2016), tiene una connotación negativa (Alarcón & Jiménez, 2013), es un problema global que causa daños estéticos y estructurales (Ciferri, 2002). Se puede decir que el biodeterioro de una u otra manera es una consecuencia directa del deterioro que sufre el sustrato (Zanardini et al., 2000).

En los últimos años, se ha aceptado que las superficies de roca y otros materiales inorgánicos son hábitats comunes para una amplia variedad de microorganismos, tales como: algas, bacterias, plantas basculares, líquenes y hongos (Alarcón & Jiménez, 2013), siendo en ambientes expuestos al aire libre los hongos uno de los agentes más importantes del biodeterioro de esculturas de rocas, mortero y yeso (Sterflinger, 2010). Sin embargo, el papel de los hongos en el biodeterioro de rocas y otros sustratos inorgánicos ha sido subestimado durante muchos años, debido a que son considerados colonizadores secundarios en

comparación con otros microorganismos, ya que son organismos heterótrofos (Salvadori & Municchia, 2016).

Sumado a lo anterior las rocas, desde el punto de vista biológico, son consideradas pobres de nutrientes con enormes cambios de humedad y con erosión mecánica debido al viento, lluvia y altas dosis de radiación UV, aun así las rocas están habitadas por hongos y otros microorganismos (Sterflinger, 2010). Por lo tanto, para facilitar el crecimiento de hongos en dicho sustrato este deben contener productos orgánicos de desechos como algas, bacterias, o células muertas de estos organismos, incluso hojas en descomposición y/o excremento de aves (Ramírez-Vázquez, 2012).

El hongo puede degradar la roca tanto química como mecánicamente (Krumbein & Urzi, 1993). El biodeterioro mecánico se produce al momento en que las hifas penetran el sustrato, debilitando la estructura de los monumentos debido a la aparición de grietas y fisuras (Tatis & Barbosa, 2013). Una vez que se encuentra el microorganismo alojado en el sustrato comienza el biodeterioro químico debido a que los hongos excretan enzimas como la celulasa o diferentes tipos de proteasas y ácidos orgánicos, los que se depositan sobre el soporte debilitando aún más la estructura pudiendo degradarla, generando daños estructurales (Krumbein & Urzi, 1993). Además, los hongos juegan un papel importante en el cambio de color de las superficies rocosas, ya que producen pigmentos de diferentes tonalidades que van generando un cambio de tonalidad en el sustrato produciendo un efecto antiestético (Krumbein & Urzi, 1993).

El mármol es una roca metamórfica que está compuesta normalmente por carbonato cálcico (Lopes, 2007). Cuando esta forma parte de obras de interés patrimonial, los efectos del biodeterioro tienen repercusiones desde el punto de vista histórico y cultural, junto con esto, económicas y turísticas (Zurita, 2004). Este fenómeno ha sido objeto de numerosos estudios (Wollenzien et al., 1995; Wollenzien et al., 1997; Videla et al., 2000; Gorbushina et al., 2002; Sarró et al., 2006; Sert et al., 2006; Cappitelli et al., 2007; Abdelhafez et al., 2012; Prendes et al., 2012; Guiamet et al., 2009; Guiamet et al., 2012; Marvasi et al., 2012; Casanova Municchia et al., 2014; Zurita, 2004; Savvides et al., 2014; Golubić et al., 2015, entre otros).

En diversos países se han realizado estudios respecto al biodeterioro fúngico del mármol, pero nuestro país se encuentra en deuda respecto a este conocimiento. Es por ello que nace el interés de realizar esta investigación, pues la actividad microbiana puede tener un impacto importante en la durabilidad de los materiales de construcción, por lo que es relevante entenderla con el fin de seleccionar apropiadamente estrategias de control (Gaylarde et al., 2003). Es conocido que el costo del deterioro microbiano de los materiales de construcción es difícil de estimar, ya que, incluye los costos económicos de la limpieza, pintura, reparaciones, así como los costos culturales debido a la desfiguración de la propiedad histórica (De Turrís et al. 2013).

1.3.- Pregunta de Investigación

- ¿Cuál es la diversidad fúngica presente en el biodeterioro del mármol en Cementerios del Cerro Panteón?

1.4.-Objetivos de la Investigación

1.4.1.- Objetivo General

- Determinar la diversidad fúngica presente en el biodeterioro de esculturas de mármol ubicadas en los Cementerios municipales del Cerro Panteón, Valparaíso.

1.4.2.- Objetivos Específicos

- Aislar microorganismos asociados al biodeterioro fúngico del mármol.
- Identificar especies o géneros de los hongos aislados.

1.5.- Alcances

- La investigación se realizará en los Cementerio N°1 y Cementerio N°2 ubicados en el Cerro Panteón, Comuna de Valparaíso Región de Valparaíso, Chile.
- El Material de ingeniería a estudiar corresponde a mármol de esculturas ubicadas en los cementerios mencionados, cabe destacar que no se extraerán muestras de este material, solo se extraerán muestras de hongos alojados en este sustrato.
- El método de identificación de los microorganismos fúngicos será a través de técnicas de Biología Molecular.

1.6.- Estructura de la investigación

Para abordar la investigación antes definida, el presente documento se estructura en base a cinco capítulos.

Capítulo I: presenta los antecedentes generales de la investigación, iniciando con el estado actual del tema en donde se introducen los aspectos fundamentales en los que se baso esta investigación.

Capítulo II: presenta el marco teórico de la investigación donde se abordan los temas base para sustentar la propuesta de trabajo.

Capítulo III: presenta la metodología que se utilizó para realizar esta investigación, con la cual se dará cumplimiento a los objetivos planteados en la sección 1.4.

Capítulo IV: presentación de los resultados obtenidos en la investigación con los cuales se dará paso al planteamiento de las conclusiones de este trabajo.

Capítulo V: presentacion de conclusiones y futuras investigaciones.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1.- Cementerios del Cerro Panteón

La palabra cementerio, proveniente del griego “koimitiron” o dormitorio y corresponde al lugar donde descansan eternamente los restos humanos de una persona (Fundación Aldea, 2007). Por lo tanto, estos son espacios donde se sepultan a personas que ya no se encuentran con vida con el objetivo de tener un lugar donde poder recordarlos.

La ciudad de Valparaíso posee 45 cerros entre los que destaca el Cerro Panteón, antiguamente llamado Cerro del Cementerio, su nombre se debe a que este Cerro corresponde al espacio más antiguo de inhumación en Valparaíso. El Cerro Panteón alberga tres Cementerios, los cuales son: Cementerio N°1, Cementerio N°2 y Cementerio de Disidentes, el emplazamiento de estos cementerios no fue casualidad, dado que era requisito que los cementerios se establecieran fuera de la ciudad para evitar problemas sanitarios, situación que es distinta en la actualidad ya que estos cementerios se encuentran situados dentro del entorno urbano (CMN, s.f.).

En el año 1821 se comenzó con los primeros intentos de construcción del Cementerio N°1, no fue hasta Julio del año 1825 que este Cementerio inició sus actividades oficialmente (Franque, 2006) este cementerio posee una superficie de 26.270 m^2 , en este mismo año también se inauguró el Cementerio de Disidentes, con el paso del tiempo se fundó el Cementerio N°2 específicamente en el año 1845, el cual comenzó funcionando como fosa común (Ojeda, 2015), su superficie es de 15.130 m^2 . Tanto el Cementerio N°1 como el cementerio N°2 acogían exclusivamente a la población católica, esta situación cambia a partir del año 1883 con la promulgación de la Ley de Cementerios Laicos (CMN, s.f.).

Los Cementerios N°1 y N°2 poseen mausoleos, tumbas y nichos de diferentes estilos, cuya alta relevancia arquitectónica da cuenta de la historia de las familias más pudientes de la época de esplendor del Puerto, lo que convierte a estos cementerios un verdadero museo a cielo abierto. Todos estos atributos ayudaron a que en el año 2005 ambos cementerios fuesen declarados Monumentos Históricos (CMN, s.f.).

2.2.- Mármol

La etimología de la palabra mármol proviene del latín marmor que significa piedra de calidad o piedra blanca. El mármol es una roca metamórfica cristalina y carbonatada formada por granos de calcita o raramente de dolomita, está compuesto por dolomita cuando tiene una alta proporción de carbonato de magnesio ($MgCo_3$) (Lopes, 2007).

Normalmente el mármol está compuesto por carbonato cálcico ($CaCO_3$), cuyo contenido suele variar entre un 90 y un 100% según la pureza del material, acompañando al carbonato cálcico aparecen otros minerales secundarios que son considerados como impurezas, tales como: arcilla, grafito, clorita, talco, micas, cuarzo, pirita, óxidos de hierro, entre otros. Estas impurezas además de influir en la durabilidad y resistencia del mármol, le otorgan distintas coloraciones (Samsó, 1965).

El mármol se ha utilizado ampliamente en la construcción de edificios modernos e históricos, así también, en estructuras de importancia cultural, como monumentos, esculturas, lápidas y azulejos para paredes y pisos (Aghamelu & Amah, 2016) debido a sus favorables propiedades geotécnicas, de alta resistencia y baja porosidad (Alabi et al., 2013). Dentro de las construcciones en mármol más destacadas de mármol se encuentra el Templo de Hércules Victorioso, la Corte Suprema de Estados Unidos, el Taj Mahal, el Partenón, el Palazzo Grassi y las esculturas de Miguel Ángel *El David*, *el Moisés* y *la piedad*.

2.3.- Biodeterioro

La definición de biodeterioro solo ha sido utilizada en los últimos 54 años, sin embargo, esta describe los procesos que han afectado a la humanidad desde que se comenzó a poseer y utilizar materiales de construcción (Allsopp et al., 2004). El biodeterioro se define como cualquier cambio indeseable en las propiedades de un material causado por las actividades vitales de los organismos y/o microorganismos pertenecientes a varios grupos sistemáticos (Hueck, 2001).

2.4.- Biodeterioro del mármol

Se ha encontrado una comunidad diversa de microorganismos en estructuras de rocas de mármol (Wollenzien et al., 1995; Gorbushina et al., 2002; Cappitelli et al., 2006; Sert et al., 2006; Cappitelli et al., 2007; Frank-Kamenetskaya et al., 2009; Guiamet et al., 2009; Abdelhafez et al., 2012; Guiamet et al., 2012; Prendes, 2012; Guiamet et al., 2013; entre otros). Si bien las interacciones entre microorganismos y rocas son complejas, el deterioro microbiano es común (Warscheid & Braams, 2000). Es importante mencionar que el daño que ejerce el biodeterioro en el mármol es muy extenso en entornos urbanos, debido a que las partículas de polvo interactúan con las películas microbianas, dando lugar a incrustaciones firmes en la superficie del sustrato (Saiz-Jiménez, 1995).

Los microorganismos asociados al biodeterioro pueden establecer diferentes relaciones con el sustrato: epilitos, que crecen en la superficie de la piedra, y endolitos, que viven en el interior de la piedra (Salvadori & Municchia, 2016). Los microorganismos endolitos a su vez se subdividen en chasmoendolitos, los que colonizan fisuras preexistentes, y criptoendolíticos, es decir, una vez establecidos dentro del sustrato colonizan sus poros. Cabe destacar que los organismos endolitos son considerablemente perjudiciales y agresivos en comparación con los epilitos dado que al proliferar en el interior del sustrato son capaces de sobrevivir a condiciones extremas de temperatura, radiación UV y desecación dadas en el exterior (Gaylarde et al, 2012). Caneva et al, (2014), concluyeron después de una revisión completa de la literatura, que el mármol es la roca más afectada por el ataque endolítico.

El crecimiento microbiano en la superficie de las rocas promueve su erosión, da lugar a biopelículas pigmentadas e incrustaciones, y causa exfoliación del material en cuestión siendo las biopelículas un grupo particular de organismos biodeteriorantes que se agrupan en ecosistemas complejos sobre y dentro del sustrato (Krumbein & Urzi, 1993).

2.5.- Organismos biodeteriorantes

Diversos autores (Krumbein & Urzi, 1993; Puerto & Rowe, 1995; Ortega-Morales et al., 1999; Ortega-Morales et al., 2000; Videla et al., 2000; Avendaño et al., 2007; Guiamet et al., 2010; entre otros) han indicado que los organismos que pueden colonizar las rocas son: algas, bacterias, hongos, líquenes y plantas superiores. Estos microorganismos pueden deteriorar los materiales de construcción usando el material del sustrato como un nutriente o generando metabolitos que inducen dicho deterioro (Gaylarde et al., 2003).

Los distintos tipos de microorganismos asociados al biodeterioro del mármol corresponden a:

- Algas: Organismos fotoautotróficos eucarióticos unicelulares o pluricelulares de diversas formas, algunos son capaces de sobrevivir de forma heterotrófica si es necesario. El biodeterioro de rocas relacionado con algas se evidencia en la pérdida de valor estético del monumento pues las algas forman una pátina de variable extensión, grosor, consistencia y color siendo las tonalidades más comunes verdes, grises o negras (Tatis & Barbosa, 2013).
- Bacterias: Organismos colonizantes unicelulares procarióticos poseen diversas formas, esféricos, espirales y cilíndricos, pueden ser móviles o inmóviles e incluyen especies tanto autotróficas como heterotróficas. La formación de costras negras, pátinas marrones, y exfoliación son las principales evidencias de la presencia de bacterias en monumentos de roca (Tatis & Barbosa, 2013).

- Hongos: Estos microorganismos son definidos en el punto 2.8 del presente capítulo.
- Líquenes: Organismos compuestos por una relación simbiótica, relación de beneficio mutuo, entre algas y hongos. Juntos constituyen una estructura macroscópica simple llamada talo. Estos suelen crecer donde las algas y los hongos por sí solos no podrían sobrevivir, esta es la razón por la cual los líquenes son capaces de colonizar una gran variedad de sustratos. Como colonizadores pioneros de rocas, los líquenes pueden crear un microambiente favorable al aumentar la biodisponibilidad (Tatis & Barbosa, 2013).
- Plantas superiores: Organismos fotoautótrofos que cuentan con tejidos especializados y órganos tales como raíces, tallo y hojas lo que las diferencia de otros agentes biodeteriorantes. El mecanismo de biodeterioro de rocas es complejo, ya que la raíz penetra la roca generando una sobrepresión lo que debilita la estructura dado que se pierde la cohesión (Tatis & Barbosa, 2013).

2.6.- Factores determinantes del biodeterioro

Puerto & Rowe (1995) indican que la presencia de organismos depende de las condiciones climáticas, así como también de la presencia de nutrientes del sustrato. Crespo et al. (2001) indican que los ataques biológicos y la intensidad de los procesos de biodeterioro están fuertemente influenciados por la disponibilidad de agua. Estos autores además agregan que el biodeterioro está determinado por parámetros específicos del material (porosidad, permeabilidad), su estado de conservación (cohesión, microfisuras), así como también por las condiciones ambientales del sitio de exposición del objeto. Zurita (2004) señala que la aparición de microorganismos está determinado por factores de distinta naturaleza entre ellos el clima y condiciones ambientales, nivel de contaminación atmosférica y composición química de los sustratos, entre otros. Avendaño et al. (2007) agregan que los factores que determinan el biodeterioro están asociados a la humedad, la temperatura, la luz, el oxígeno, el pH, los nutrientes y la contaminación atmosférica. Saiz-Jiménez (2010) indica que la colonización y el biodeterioro de los materiales de construcción generalmente están vinculados a condiciones ambientales, los parámetros más importantes que afectan el crecimiento microbiano están representados por factores físicos, humedad, temperatura y luz, así como la naturaleza química del sustrato. Guiamet et al. (2012) mencionan que el crecimiento y la actividad metabólica de estos organismos están controlados por parámetros naturales como luz y humedad. Tatis y Barbosa (2013) postulan que el desarrollo del biodeterioro está determinado por propiedades intrínsecas de los materiales tales como constituyentes minerales, pH, salinidad, porosidad, color, forma, textura y, además, por

agentes medioambientales como humedad, luz solar, concentración de contaminantes ambientales, partículas, temperatura, cercanía a las costas, régimen de vientos y lluvias.

2.7.- Alteraciones causadas por los microorganismos

Las comunidades microbianas que se desarrollan asociadas a los sustratos de roca son, en parte, responsables del deterioro químico y físico de la misma y alteran, a través de diferentes mecanismos, la apariencia estética y la integridad física del material (Krumbein, 1998).

El crecimiento de poblaciones de microorganismos en las superficies de la roca modifica su apariencia por alteraciones visuales, Sarró et al. (2006) agregan que los procesos de biodeterioro pueden causar diferentes tipos de alteraciones, como la coloración de los materiales, la formación de costras en las superficies y la pérdida de material que puede provocar daños estructurales.

Es por ello que como síntomas del biodeterioro se pueden enunciar: manchas, eflorescencias, decoloraciones, ahuecamientos, desfiguraciones, desorganización de los elementos, desfibrilación, fisuras y grietas, así como cambios en las propiedades mecánicas, químicas y ópticas (Avendaño et al, 2007).

Gaylarde et al. (2003), señalaron que la actividad microbiana tiene un impacto considerable en la durabilidad de los materiales de construcción. En la Tabla 2.1 se pueden visualizar distintos efectos de los microorganismos sobre diferentes tipos de materiales.

Tabla 2.1: Actividades perjudiciales de microorganismos en materiales de construcción (extracto).

Actividad	Efecto (s)	Material	Microorganismos
Presencia física	Decoloración, Retención de agua	Todos	Todos
Crecimiento filamentoso	Disgregación de material	Piedra, Concreto, Mortero, Madera	Hongos, Bacterias, Algas
Producción de ácidos	Degradación	Piedra, Concreto, Mortero	Hongos, Bacterias
Movilización de iones	Debilitamiento y disolución	Piedra, Concreto, Mortero	Todos

Fuente: Microbial impact on building materials: an overview. Pp 342–352.
<https://doi.org/10.1007/BF02480875>

Gaylarde et al. (2003), agregan que al pasar el curso del tiempo y en función a la exposición ambiental los materiales inorgánicos como las rocas son susceptibles a los cambios estructurales. De la Tabla 2.2 se desprende que la presencia de hongos genera alteraciones de tipo estético como manchas coloreadas y parches, además alteraciones estructurales como exfoliación y consistencia.

Tabla 2.2: Alteraciones producidas en materiales por microorganismos (extracto).

Microorganismos	Alteraciones
Bacterias autótrofas	Costras negras, patinas negras-marrones, exfoliación, pulverización
Bacterias heterótrofas	Costras negras, patinas negras-marrones, exfoliación, cambio de color (decoloración)
Cianobacterias	Patinas y láminas de varios colores y consistencia
Hongos	Manchas coloreadas y parches, exfoliación y consistencia
Algas	Patinas y láminas de varios colores y consistencia
Líquenes	Costras, parches y picaduras

Fuente: Microbial impact on building materials: an overview. Pp 342–352.
<https://doi.org/10.1007/BF02480875>

2.8.- Hongos

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso de organismos, el cual posee aproximadamente 1.5 millones de miembros que impactan de diversas maneras a todas las formas de vida existentes, y con ello, a todos los ecosistemas (Moreno, 2016). Actualmente, en base a sus propiedades morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y moleculares, los hongos conforman el reino biológico denominado como reino Fungi que se divide en cuatro phylum denominados: Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota (Pontón, 2002).

Los hongos son organismos eucariontes, están formados por células cuyo interior se compone de un citoplasma organizado dispuesto entre una membrana externa y otra interna la que contiene al núcleo donde se ubica el material genético, pueden ser unicelulares o pluricelulares (López-García, 2015). Sus células son alargadas y al alinearse unas con otras

forman filamentos denominados hifas. Estas a menudo están divididas por tabiques llamados septos, cuando las hifas se entrelazan forman una masa similar al algodón llamada micelio (Moreno, 2016).

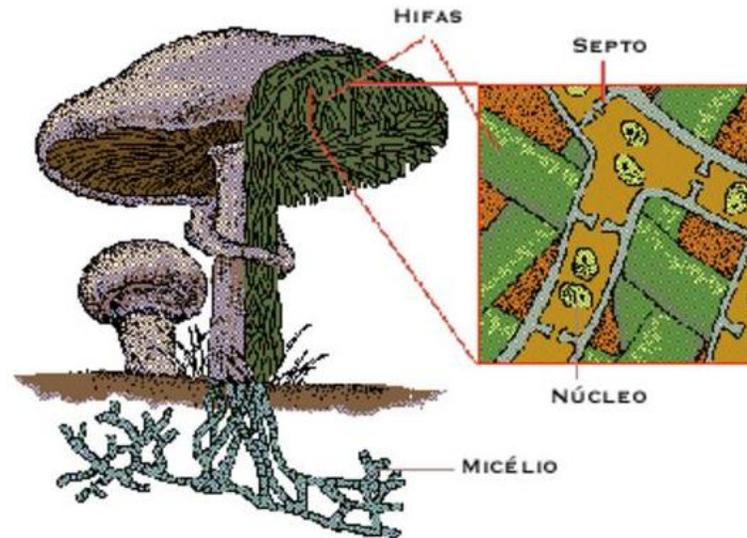


Ilustración 2.1: Estructura de los hongos.

Fuente: Los hongos: héroes y villanos de la prosperidad humana.

Además, los hongos son organismos heterótrofos lo que genera que no tengan la capacidad de fabricar su propios alimentos, no pueden fotosintetizar pues carecen de clorofila y cloroplastos, su forma de alimentarse es a través de la absorción obteniendo nutrientes de organismos vivos que parasitan o de materia orgánica muerta (Tatis & Barbosa, 2013).

Los hongos se reproducen por medio de esporas microscópicas, dispersadas por el viento o animales. En algunos hongos las hifas forman estructuras reproductivas grandes que producen esporas y estas se denominan cuerpos fructíferos. La forma de reproducción puede ser sexual o asexual. La reproducción sexual se da por la unión de dos gametos, que provienen de distintos organismos, o en algunos casos por la unión de hifas. La reproducción asexual produce esporas por mitosis, es decir, cada célula madre produce una división de su citoplasma, pared celular y núcleo dando lugar a otra célula exacta o copia de sí misma (Pontón, 2002).

Los hongos comienzan su desarrollo en función del contenido de humedad sobre la superficie de un soporte. Así mismo, ha de tenerse en cuenta que muchos hongos, durante su desarrollo, producen agua metabólica, la cual incrementa el contenido en humedad del material, favoreciendo la multiplicación celular (Valentín, 2010).

El crecimiento de los hongos se ve afectado por muchos factores ambientales, como la naturaleza y concentración de suministro de nutrientes, humedad, temperatura, luz y concentración de hidrógeno. Las condiciones óptimas para el crecimiento de hongos son: pH ácido 4 – 6, humedad relativa superior al 70% y temperatura ambiente, cerca de 30°C (pero también a bajas temperaturas), aunque la oscilación de los parámetros mencionados anteriormente favorece la germinación de esporas de hongo (Valentín, 2010).

Los hongos tienen la capacidad de resistir condiciones de desecación y algunas veces altos niveles de radiación ultravioleta (Ramírez-Vázquez, 2012). La predominancia y permanencia de los hongos en la comunidad fúngica sobre cualquier sustrato, se debe a los mecanismos de penetración a través de sus hifas y a su tasa de crecimiento micelial (Valentín, 2010).

Los hongos se posicionan como uno de los principales agentes biológicos meteorizantes de los sustratos rocosos, debido a que las hifas fúngicas penetran dentro de la roca y a su capacidad de producir y excretar ácidos orgánicos (Ortega-Morales et al. 2000).

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.- Programa experimental

Con el objeto de cumplir con los objetivos planteados en esta investigación, se establecen los pasos fundamentales a seguir, los que forman el programa experimental. Para ello se confeccionó un diagrama de flujo presentado en la Ilustración 3.1, el cual consta de tres etapas que serán descritas a continuación:

3.1.1.- Etapa I: Formulación de la investigación

Esta etapa se denomina Formulación de la investigación y corresponde a la revisión bibliográfica del estado actual del problema, para posteriormente formular el problema de investigación, del que se desprenden los objetivos y alcances de esta investigación.

3.1.2.- Etapa II: Programa de investigación

Esta etapa corresponde a la formulación del diseño experimental para lograr el objetivo general de la investigación, comenzando por la formulación del marco teórico en donde se presentan los antecedentes recopilados en la Etapa I. De esto se deriva la metodología de trabajo, la que se inició con la toma de muestras hasta la identificación de los hongos.

3.1.3.- Etapa III: Análisis de resultados y conclusiones

Esta etapa se denomina análisis de resultados y conclusiones y corresponde a la parte final de la investigación, la que se obtiene de la metodología descrita en la etapa II, a su vez corresponde al análisis de los resultados, verificación de cumplimiento de los objetivos y finalmente la conclusión de la investigación.

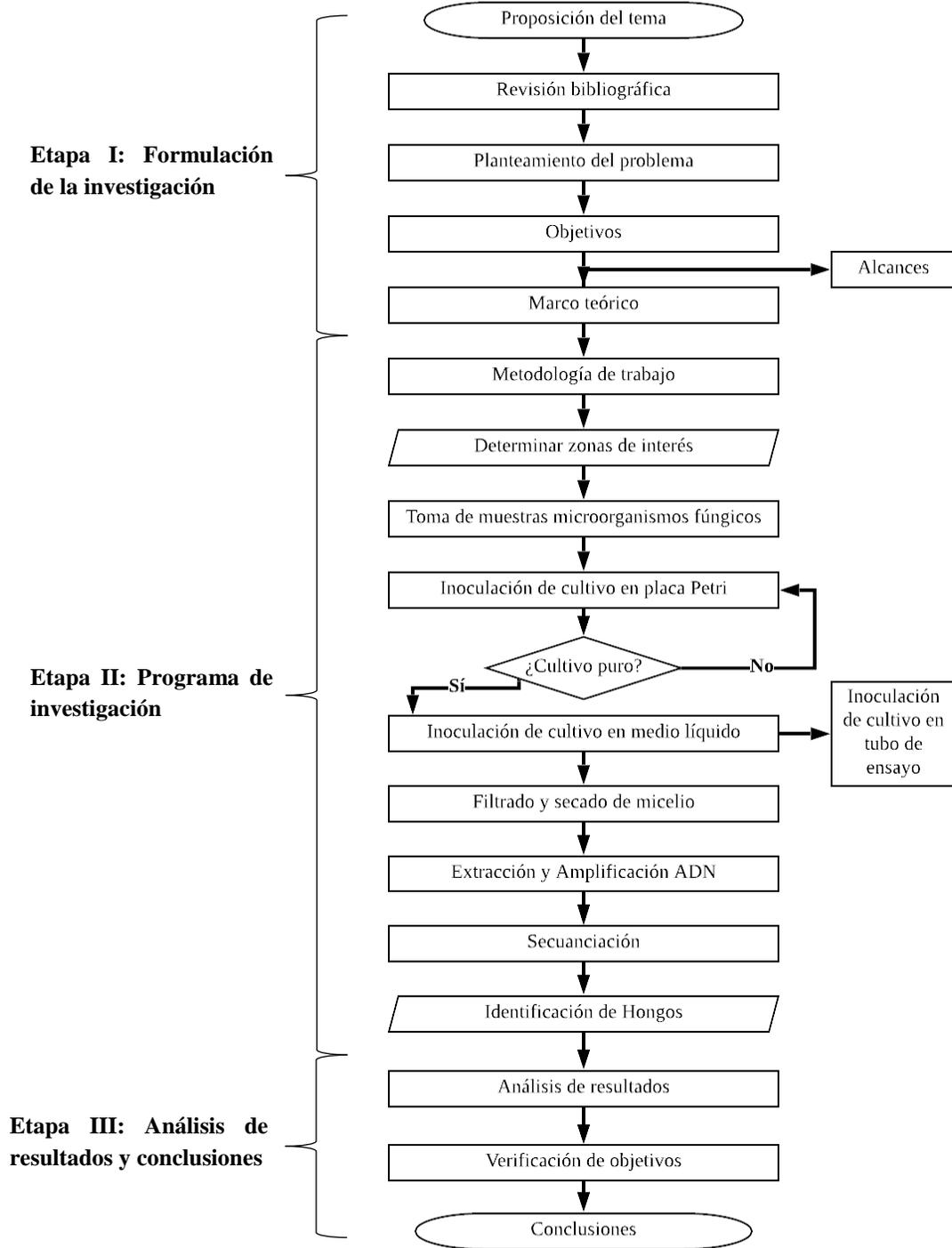


Ilustración 3.1: Diagrama de la investigación.

Fuente: Elaboración propia.

3.2.- Toma de muestras y aislamiento de microorganismos

Las muestras se extrajeron, en el mes de Octubre de 2018, desde diversas esculturas de mármol ubicadas en los Cementerios municipales del Cerro Panteón, Valparaíso, Chile (Ilustración 3.2). El muestreo realizado fue del tipo oportunista.



Ilustración 3.2: Región de Valparaíso – Cementerios municipales del Cerro Panteón.

Fuente: Elaboración propia.

Previo a la toma de muestras se realizó un reconocimiento de las zonas a investigar lográndose, para efectos de esta investigación, sectorizar una zona de interés para cada uno de los cementerios lo que se observa en los cuarteles rellenos de color azul en la Ilustración 3.3

y 3.4. El criterio que se utilizó para determinar las zonas de interés fue identificar donde se encontraban ubicadas la mayor cantidad de esculturas de mármol que a simple vista estuvieran afectadas por biodeterioro.

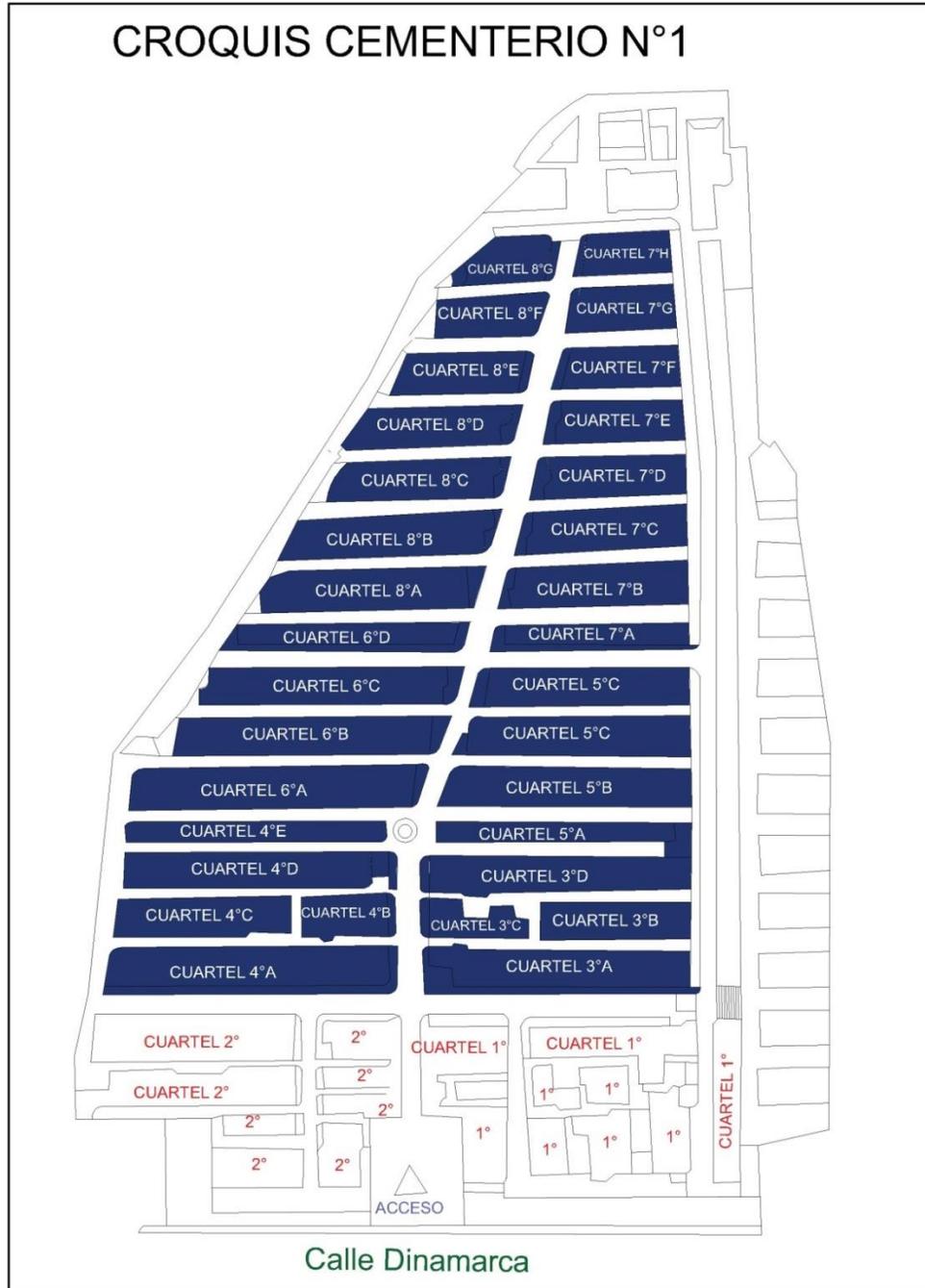


Ilustración 3.3: Croquis sectorización Cementerio N°1.

Fuente: Elaboración propia.



Ilustración 3.4: Croquis sectorización Cementerio N°2.

Fuente: Elaboración propia.

Las muestras fueron recolectadas en forma directa desde las esculturas de mármol por medio de tómulas cuyo interior contiene un medio de cultivo Extracto de Malta Agar, el hisopo se frotó en la escultura y se introdujo al tubo, siendo este un método no invasivo. Una vez recolectadas se trasladaron al laboratorio de Biodegradación y Biodeterioro de la Universidad de Valparaíso, donde se almacenaron durante 1 semana a temperatura ambiente y luego en un cooler a 4°C.



Ilustración 3.5: Toma de muestra.

Fuente: Elaboración propia.

Para identificar cada una de las muestras, las tórnulas fueron rotuladas y junto con esto se llevó un control a través de la siguiente Tabla.

CONTROL TOMA DE MUESTRAS	
Cementerio:	
N° Muestra:	
Fecha:	
Ubicación:	
Descripción fotográfica	
Detalle de la ubicación	
Orientación:	
Exposición a vientos:	
Exposición a luz:	

Ilustración 3.6: Tabla control toma de muestras.

Fuente: Elaboración propia.

3.3.- Preparación medio de cultivo sólido

Se utilizó un medio de cultivo extracto de Malta Agar nutritivo, la fórmula de la mezcla contiene 5g/L de Peptona, 5g/L de Cloruro de Sodio, 1,5g/L de extracto de Levadura, 1,5g/L de extracto de carne y 1,5g/L de Agar con un pH final de 5,9.

Para su elaboración, en un vaso precipitado, se suspendieron 28g de la mezcla en 1000mL de agua destilada. Posteriormente se colocó en un agitador magnético para disolver el medio completamente. Una vez disuelto el medio de cultivo fue esterilizado por autoclave a 121°C durante 20min.

3.4.- Inoculación de cultivo en placas Petri

Las placas, conteniendo medio extracto de Malta Agar nutritivo, fueron inoculadas con los microorganismos presentes en cada una de las tómulas. A continuación las placas fueron incubadas en una estufa a 22°C por un mínimo de 48hrs, para acelerar el crecimiento del microorganismo.

En el caso de que en el medio de cultivo se produzca el crecimiento de más de un microorganismo, se realizó un proceso de individualización de estos traspasándolos a nuevas placas Petri hasta obtener cultivos puros.

3.5.- Inoculación de hongos en tubos de ensayos

La inoculación de los tubos de ensayos se realizó para obtener una cepa de respaldo de los hongos aislados. Para esto se procedió a transferir un repique de agar con micelio de las placas de cultivo puro a los tubos de ensayo, y estos se dejaron como mínimo 5 días a temperatura ambiente para que el hongo individualizado se desarrollara. Finalmente los tubos de ensayo se almacenaron en un cooler a 4°C para detener el crecimiento del microorganismo fúngico.

El medio de cultivo de los tubos de ensayos fue preparado según lo indicado en el punto 3.3.



Ilustración 3.7: Inoculación de cultivos puros en tubos de ensayos.

Fuente: Elaboración propia

3.6.- Preparación del medio de cultivo líquido

Se elaboró un medio de cultivo extracto de Malta enriquecido, para esto se utilizó 15g/L de extracto de Malta, 2g/L de Peptona diluidos en 1000mL de agua destilada. La mezcla obtenida fue esterilizada, se esterilizó por autoclave a 121°C durante 20min. Este medio de cultivo (150mL) fue vertido a matraces previamente esterilizados.

3.7.- Inoculación de hongos en medio de cultivo líquido

Una vez que el hongo en las placas Petri es visible y de tamaño considerable, se realizó la inoculación del medio líquido traspasando repiques de trozos de agar con micelio desde la placa de cultivo puro al matraz. Los matraces fueron colocados en un shaker orbital a 125 RPM por 7 días a temperatura ambiente del laboratorio aproximadamente a 20°C, para permitir el desarrollo del microorganismo fúngico.



Ilustración 3.8: Matracas colocados en shaker orbital.

Fuente: Elaboración propia.

3.8.- Secado y aislamiento de muestras

Luego los 7 días en el shaker orbital se obtuvo una masa del hongo o micelio. Esta fue filtrada y lavada. El micelio fue secado en estufa a 37°C por un mínimo de 48 horas.

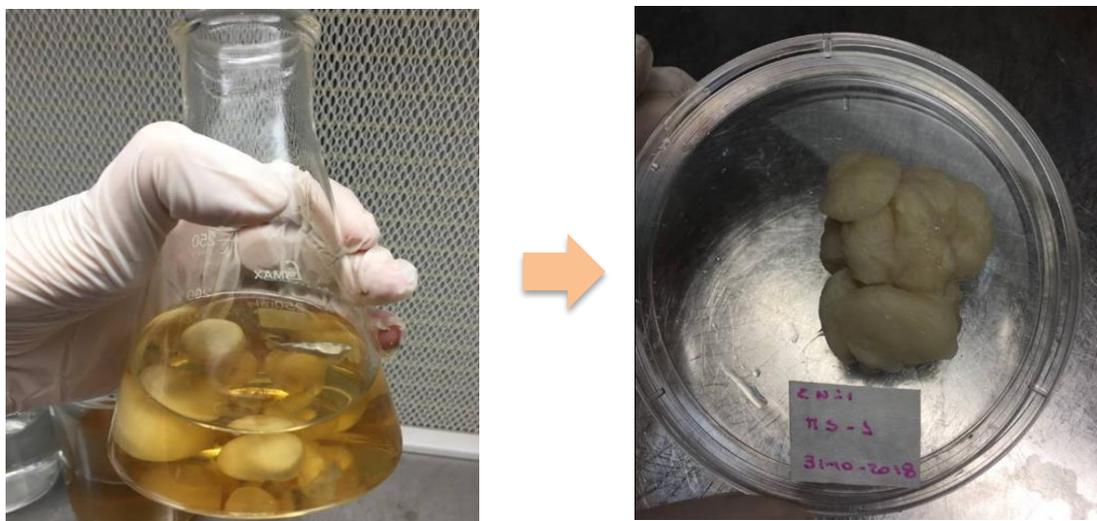


Ilustración 3.9: Micelio de hongo filtrado.

Fuente: Elaboración propia.

Una vez deshidratado el hongo, este se raspó con un bisturí (esterilizado) y se precipitó en un mortero de porcelana donde se pulverizó finalmente. Cuando se obtuvo la condición de polvillo este se almacenó en tubos Eppendorf de 1,5 mL, debidamente etiquetados.

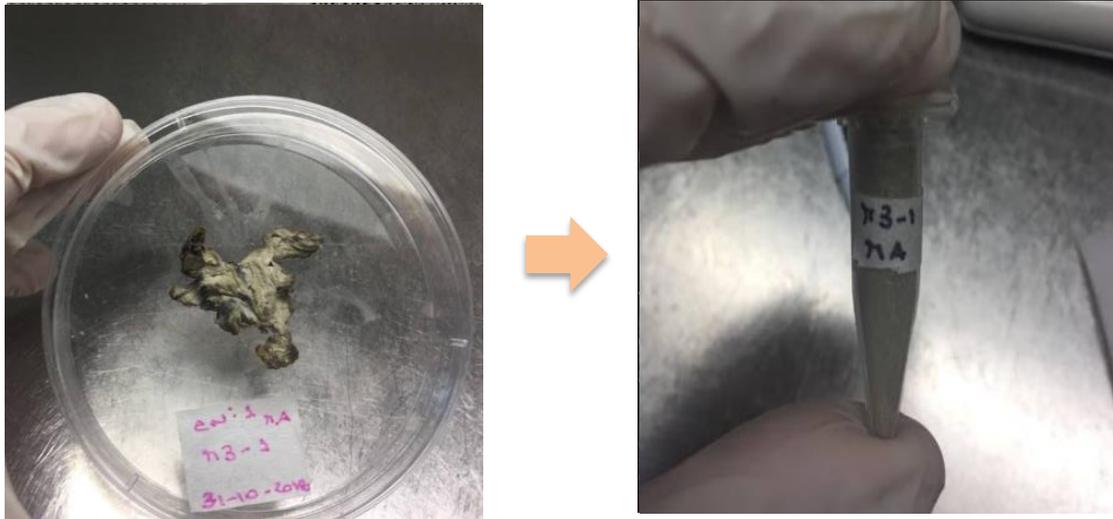


Ilustración 3.10: Micelio de hongo deshidratado y posteriormente pulverizado.

Fuente: Elaboración propia.

3.9.- Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante la utilización del KIT comercial de aislamiento de DNA genómico E.Z.N.A

3.10.- Amplificación de ADN

La amplificación del ADN se realizó a través de la técnica de biología molecular reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el objetivo de obtener un gran número de copias de un fragmento en particular del ADN.

3.11.- Secuenciación de los productos de PCR

Los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados para la determinación de su respectivas bases nucleotídicas

3.12.- Identificación de hongos

La identificación de los hongos se determinó sometiendo las secuencias a la base de datos del Centro Nacional para la información Biotecnológica (NCBI), mediante el programa informático de alineamiento de secuencias BLAST.

3.13.- Imágenes de los hongos identificados

Las imágenes de los hongos identificados se realizaron a través de la técnica de tinción Azul de laftofenol o Azul de algodón. Esta técnica se realizó colocando una sub-muestra del microorganismo aislado puro en un portaobjetos al que se le agregó 2 gotas de esta tinción, sobre esta se colocó un cubreobjetos y posteriormente se observó por el microscopio óptico trinocular para obtener las imágenes.

CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1.- Presentación de resultados

Se obtuvo un total de 57 muestras desde diversas esculturas de mármol, ubicadas en la zona de interés de ambos Cementerios, 36 de estas corresponden a 33 esculturas del Cementerio N°1 y 21 corresponden a 15 esculturas del Cementerio N°2. La Tabla 4.1 muestra la identificación y ubicación de cada una de las muestras obtenidas, junto con esto, en los Anexos I y II se adjuntan las planillas control de toma de muestras de cada una de las esculturas de interés para el Cementerio N°1 y N°2 respectivamente.

Transcurrido 7 días, en donde las tómulas se mantuvieron a temperatura ambiente para permitirle al microorganismo proliferar dentro de estas, se procedió a la inoculación de cada uno de estos microorganismos en las placas Petri para luego ser almacenadas en una estufa durante 48 horas. Es importante mencionar que la inoculación de las muestras se realizó en distintas fechas por lo que el crecimiento de estos fue de acuerdo a sus fechas de inoculación. Posteriormente se realizó una inspección visual a cada una de las placas inoculadas, donde se pudo constatar que en la totalidad de estas existió crecimiento de microorganismos, todas presentaban un crecimiento contaminado ya sea por la presencia de más de un microorganismo fúngico en una misma placa o por la presencia de bacterias.

Debido al crecimiento contaminado y con el fin de obtener cultivos puros, en cada una de las placas, se realizó un proceso de individualización de microorganismos. 36 placas Petri inoculadas del Cementerio N°1 pasaron por diversos procesos de individualización de microorganismos obteniéndose un total de 95 cultivos puros. Para el Cementerio N°2, de un total de 21 placas Petri inoculadas que pasaron por dicho proceso de individualización se obtuvo un total de 85 cultivos puros. Sin embargo, es importante mencionar que las placas rotuladas M29-1A y M29-1B correspondientes al Cementerio N°1 y las placas rotuladas M7B-1A1A1A, M7B-1A1A1B, M8B-1B2A1, M8B-1B2B1B, M11A-1A, M11A-1B, M13-1, M15-3C y MC-1A1B2A correspondientes al Cementerio N°2, si bien tuvieron un crecimiento puro, los microorganismos encontrados corresponden a hongos inferiores los que no son de interés de esta investigación. Dicho esto, se continuó trabajando con las 93 placas de cultivos puros del Cementerio N°1 y 76 placas de cultivos puros del Cementerio N°2. El resumen del proceso de individualización de microorganismos se encuentra adjunto en los Anexos III y IV para el Cementerio N°1 y N°2 respectivamente.

A la totalidad de 169 placas de cultivos puros se les realizó una cepa de respaldo, traspasando repiques del microorganismo individualizado a un tubo de ensayo para cada una respectivamente. En conjunto con lo anterior, se traspasó repiques de los microorganismos matraces con medio líquido, estos fueron colocados en un shaker orbital, para que el microorganismo se oxigenara y creciera. Posteriormente fueron filtrados, secados, pulverizados y almacenados en tubos Eppendorf.

Tabla 4.1: Planilla toma de muestras Cementerio N°1 y N°2.

TOMA DE MUESTRAS CEMENTERIOS			
Cementerio N°1		Cementerio N°2	
Identificación muestra	Ubicación	Identificación muestra	Ubicación
MUESTRA 1	Cuartel N°5D	MUESTRA 6	Cuartel N°2
MUESTRA 2	Cuartel N°5D	MUESTRA 7 ^a	Cuartel N°2
MUESTRA 3	Cuartel N°5D	MUESTRA 7B	Cuartel N°2
MUESTRA 4	Cuartel N°8E	MUESTRA 8 ^a	Cuartel N°2
MUESTRA 5	Cuartel N°8E	MUESTRA 8B	Cuartel N°2
MUESTRA 16	Cuartel N°3A	MUESTRA 9 ^a	Cuartel N°2
MUESTRA 17	Cuartel N°3D	MUESTRA 9B	Cuartel N°2
MUESTRA 18A	Cuartel N°3D	MUESTRA 10 ^a	Cuartel N°2
MUESTRA 18B	Cuartel N°3D	MUESTRA 10B	Cuartel N°2
MUESTRA 19	Cuartel N°3D	MUESTRA 10C	Cuartel N°2
MUESTRA 20	Cuartel N°5A	MUESTRA 11 ^a	Cuartel N°2
MUESTRA 21	Cuartel N°5A	MUESTRA 11B	Cuartel N°2
MUESTRA 22	Cuartel N°5B	MUESTRA 12 ^a	Cuartel N°2
MUESTRA 23	Cuartel N°5B	MUESTRA 12B	Cuartel N°2
MUESTRA 24	Cuartel N°5D	MUESTRA 13	Cuartel B
MUESTRA 25	Cuartel N°5D	MUESTRA 14	Cuartel D
MUESTRA 26	Cuartel N°7B	MUESTRA 15	Cuartel E
MUESTRA 27	Cuartel N°7B	MUESTRA A	Cuartel B
MUESTRA 28	Cuartel N°7B	MUESTRA B	Cuartel N°2
MUESTRA 29	Cuartel N°7B	MUESTRA C	Cuartel N°7
MUESTRA 30	Cuartel N°7C	MUESTRA D	Entre Cuartel N° 7 Y N°3
MUESTRA 31	Cuartel N°7D		
MUESTRA 32	Cuartel N°8G		
MUESTRA 33	Cuartel N°8E		
MUESTRA 34	Cuartel N°8E		
MUESTRA 35	Cuartel N°8D		
MUESTRA 36	Cuartel N°8B		
MUESTRA 37	Cuartel N°8B		
MUESTRA 38	Cuartel N°6B		
MUESTRA 39	Cuartel N°6A		
MUESTRA 40	Cuartel N°6A		
MUESTRA 41	Cuartel N°4D		
MUESTRA 42	Cuartel N°4A		
MUESTRA 43A	Cuartel N°4A		
MUESTRA 43B	Cuartel N°4A		
MUESTRA 44	Cuartel N°4A		

Fuente: Elaboración propia.

De los 169 tubos Eppendorf que almacenaban distintos microorganismos se seleccionaron 73 muestras a las que se les realizó el proceso de extracción y amplificación de ADN, 40 del Cementerio N°1 y 33 del Cementerio N°2 para posteriormente secuenciar.

En las Tablas 4.2 y 4.3 se identifican las muestras de los tubos Eppendorf a los que se les realizó el proceso de extracción y amplificación de ADN. Es importante mencionar que a cada uno de los tubos se les asignó una nueva identificación, debido a que la que se estaba utilizando era muy extensa y podía generar errores o confusiones.

Tabla 4.2: Planilla Extracción y Amplificación de ADN Cementerio N°1.

EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN CEMENTERIO N°1					
Identificación tubo Eppendorf	Nueva identificación	Extracción y Amplificación ADN	Identificación tubo Eppendorf	Nueva identificación	Extracción y Amplificación ADN
M1-1	C1-1	✓	M25-1	C1-40	✓
M2-1A	C1-41	✓	M26-1	C1-9	✓
M3-1	C1-2	✓	M26-2	C1-8	✓
M3-2	C1-3	✓	M28-1	C1-35	✓
M4-2	C1-6	✓	M28-2C	C1-43	✓
M4-3	C1-5	✓	M29-1A	C1-48	✓
M5-1	C1-31	✓	M31-1	C1-10	✓
M18A-2	C1-34	✓	M31-2	C1-46	✓
M18B-1A2	C1-22	✓	M32-1	C1-13	✓
M18B-1A3	C1-17	✓	M33-1	C1-21	✓
M18B-1B1B1	C1-28	✓	M34-3	C1-55	✓
M18B-1B2	C1-51	✓	M35-1A	C1-25	✓
M18B-2	C1-47	✓	M35-1C	C1-37	✓
M19-1	C1-15	✓	M36-2A	C1-26	✓
M21-1	C1-20	✓	M36-2B1	C1-53	✓
M21-2	C1-16	✓	M36-3B	C1-23	✓
M22-1	C1-18	✓	M42-2A	C1-54	✓
M23-1	C1-27	✓	M42-2B2	C1-45	✓
M24-1A	C1-44	✓	M43B-2	C1-12	✓
M24-1B	C1-52	✓	M44-1	C1-11	✓

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4.3: Planilla Extracción y Amplificación Cementerio N°2.

EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN CEMENTERIO N°2					
Identificación tubo Eppendorf	Nueva identificación	Extracción y Amplificación ADN	Identificación tubo Eppendorf	Nueva identificación	Extracción y Amplificación ADN
M6-1B1	C2-13	✓	M10A-1B	C2-4	✓
M6-1B2B1	C2-31	✓	M10A-2A	C2-2	✓
M6-2	C2-20	✓	M10C-1	C2-28	✓
M7A-1	C2-5	✓	M10C-2B1B	C2-29	✓
M7B-2B	C2-26	✓	M11B-1A1	C2-27	✓
M8A-1B	C2-11	✓	M12B-1	C2-1	✓
M8A-2B	C2-9	✓	M13-2B1	C2-21	✓
M8B-1B2A2	C2-37	✓	M15-1	C2-12	✓
M8B-1B2B1A	C2-35	✓	M15-3B	C2-32	✓
M8B-1B2B2	C2-18	✓	MA-1	C2-17	✓
M8B-2	C2-10	✓	MB-1	C2-15	✓
M9A-1A	C2-7	✓	MB-3	C2-19	✓
M9A-1B1A	C2-24	✓	MC-1A1A2	C2-33	✓
M9A-1B2A	C2-14	✓	MC-1A1B1	C2-34	✓
M9A-2A	C2-3	✓	MC-1B2	C2-36	✓
M9B-1	C2-8	✓	MC-2	C2-6	✓
M10A-1A	C2-30	✓			

Fuente: Elaboración propia.

Un total de 73 cultivos puros de hongos fueron utilizados en la identificación, de los cuales 40 fueron aislados de esculturas de mármol provenientes del Cementerio N°1 de Valparaíso y 33 de esculturas de mármol del Cementerio N°2 de Valparaíso.

El estudio comparativo de las secuencias de los hongos a identificar con las proporcionadas por el programa de alineamiento informático BLAST, permitió identificar 50 cultivos de Phylum Ascomycota, distribuidos en tres clases, siete órdenes, nueve familias, diez géneros y 26 especies, estos fueron identificados con un alto porcentaje de identidad, superior al 97%. Los hongos identificados para cada Cementerio a nivel de género y especie se encuentran detallados en la Tabla 4.4. Las imágenes de todos los microorganismos identificados según género y especie se encuentran adjuntas en el Anexo V.

De las muestras del Cementerio N°2 se logró identificar 22 muestras a nivel de género y especie. El género *Alternaria* equivale al 9,09% de las muestras identificadas, a partir de este se identificaron dos especies *A. consortialis* y *A. longipes*. El género *Fusarium* equivale al 36,36% de las muestras identificadas, a partir de este género se identificaron tres especie *F. equiseti*, *F. lacertarum* y *F. oxysporum*. Finalmente el género *Penicillium* equivale al 54,55%

de las muestras identificadas, a partir de este género se identificaron cinco géneros *P. aurantiocandidum*, *P. brevicompactum*, *P. commune*, *P. crustosum* y *P. polonicum*.

Tabla 4.4: Especies identificadas de las muestras de las esculturas de mármol del Cementerio N°1 y N°2.

ESPECIES IDENTIFICADAS DE LAS MUESTRAS DE LAS ESCULTURAS DE MÁRMOL					
Cementerio N°1			Cementerio N°2		
Muestra	Especie Identificada	Identidad	Muestra	Especie Identificada	Identidad
C1-1	<i>Penicillium polonicum</i>	97.85%	C2-2	<i>Fusarium equiseti</i>	100.00%
C1-3	<i>Sordaria fimicola</i>	100.00%	C2-3	<i>Fusarium equiseti</i>	100.00%
C1-9	<i>Sordaria macrospora</i>	99.81%	C2-4	<i>Fusarium equiseti</i>	100.00%
C1-12	<i>Candida dubliniensis</i>	99.33%	C2-5	<i>Penicillium aurantiocandidum</i>	100.00%
C1-17	<i>Candida dubliniensis</i>	98.54%	C2-6	<i>Penicillium aurantiocandidum</i>	99.78%
C1-27	<i>Penicillium griseofulvum</i>	99.02%	C2-7	<i>Fusarium equiseti</i>	100.00%
C1-28	<i>Alternaria terricola</i>	100.00%	C2-9	<i>Fusarium oxysporum</i>	99.78%
C1-8	<i>Sordaria fimicola</i>	99.11%	C2-11	<i>Fusarium oxysporum</i>	100.00%
C1-13	<i>Sordaria fimicola</i>	99.54%	C2-12	<i>Alternaria longipes</i>	99.80%
C1-15	<i>Alternaria atra</i>	99.74%	C2-15	<i>Penicillium aurantiocandidum</i>	100.00%
C1-20	<i>Arthrinium kogelbergense</i>	100.00%	C2-20	<i>Penicillium aurantiocandidum</i>	99.00%
C1-22	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	100.00%	C2-24	<i>Fusarium lacertarum</i>	99.81%
C1-31	<i>Neurospora crassa</i>	100.00%	C2-26	<i>Penicillium brevicompactum</i>	99.82%
C1-34	<i>Sordaria fimicola</i>	99.27%	C2-27	<i>Penicillium crustosum</i>	99.83%
C1-35	<i>Arthrinium marii</i>	100.00%	C2-28	<i>Penicillium brevicompactum</i>	99.79%
C1-37	<i>Penicillium chrysogenum</i>	99.83%	C2-29	<i>Penicillium polonicum</i>	100.00%
C1-40	<i>Trichoderma atroviride</i>	99.79%	C2-30	<i>Fusarium equiseti</i>	100.00%
C1-41	<i>Alternaria atra</i>	99.78%	C2-31	<i>Penicillium polonicum</i>	100.00%
C1-43	<i>Penicillium aurantiocandidum</i>	100.00%	C2-33	<i>Penicillium commune</i>	100.00%
C1-44	<i>Fusarium equiseti</i>	99.81%	C2-34	<i>Alternaria consortialis</i>	100.00%
C1-45	<i>Alternaria fasciculata</i>	100.00%	C2-35	<i>Penicillium crustosum</i>	100.00%
C1-47	<i>Fusarium equiseti</i>	99.81%	C2-47	<i>Penicillium crustosum</i>	99.81%
C1-48	<i>Fusarium equiseti</i>	99.81%			
C1-51	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100.00%			
C1-52	<i>Penicillium aurantiocandidum</i>	100.00%			
C1-53	<i>Alternaria arborescens</i>	100.00%			
C1-54	<i>Penicillium aurantiocandidum</i>	99.20%			
C1-55	<i>Epicoccum nigrum</i>	100.00%			

Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, de las muestras del Cementerio N°1 se lograron identificar 28 muestras a nivel de género y especie. El género *Alternaria* equivale al 17,86% de las muestras identificadas, a partir de este se identificaron cuatro especies *A. arborescens*, *A. atra*, *A.*

fasciculata y *A. terrícola*. El género *Arthriniium* equivale al 7,14% de las muestras identificadas y a partir de este se identificaron 2 especies *A. kogelbergense* y *A. marii*. El género *Candida* equivale al 7,14% de las muestras y se identificó una especie *C. dubliniensis*. El género *Cladosporium* equivale al 7,14% de las muestras identificadas, a partir de este se identificaron dos especies *C. cladosporoide* y *C. sphaerospermum*. El género *Epicoccum* equivale al 3,57% de las muestras y se identificó una especie *E. nigrum*. El género *Fusarium* equivale al 10,71% de las muestras y se identificó una sola especie *F. equiseti*. El género *Neurospora* equivale al 3,57% de las especies y se identificó un género *N. crassa*. El género *Penicillium* equivale al 21,43% de las muestras identificadas, a partir de este se identificaron cuatro géneros *P. aurantiocandidum*, *P. chrysogenum*, *P. griseofulvum* y *P. polonicum*. El género *Sordaria* equivale al 17,86% de las muestras identificadas, a partir de este se logró identificar dos especies *S. fimicola* y *S. macrospora*. Finalmente el género *Trichoderma* equivale al 3,57% de las muestras y se logró identificar una especie *T. atroviride*.

A modo de resumen en la Ilustración 4.1, se pueden inferir los géneros de hongos más y menos predominantes en las esculturas de mármol pertenecientes a los Cementerio N°1 y N°2 del Cerro Panteón, Valparaíso.

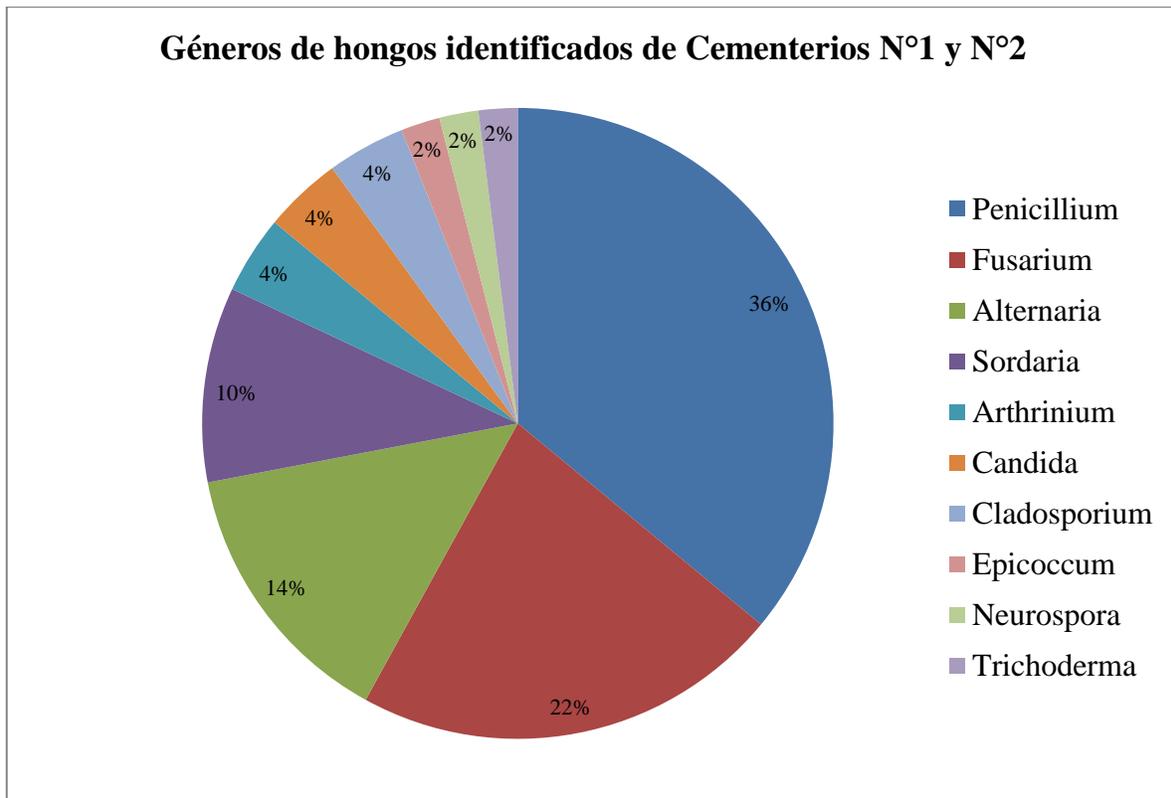


Ilustración 4.1: Hongos identificados de ambos Cementerios.

Fuente: Elaboración propia.

4.2.- Análisis de resultados

Dentro los hongos identificados se encuentran los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum* y *Penicillium*, estos corresponden a hongos cosmopolitas que suelen encontrarse en suelos, hojarasca, restos orgánicos muertos, vegetales, madera, textiles, entre otros, su forma de difusión es por esporas secas a través del viento (EMlab P&K, 2019). Estos géneros forman parte de los organismos fúngicos denominados hongos microcoloniales negros o también conocido como hongos negros, probablemente son los más visibles, importantes y dañinos en el biodeterioro de la piedra (Diakumaku et al., 1995; Cappitelli et al., 2006; Salvadori & Municchia, 2016).

Los hongos negros se caracterizan por una pigmentación oscura debido a la presencia de melanina en su pared celular, pueden pertenecer a al menos dos clases de hongos las que son Dothideomycetes y Eurotiomycetes (Gueidan et al., 2008). En las Tablas 4.5, 4.6, 4.7 y 4.8 se encuentran las clasificaciones de estos géneros identificados.

El daño producido por los hongos negros puede ser tanto estético como estructural debido a que los hongos negros tienen la capacidad de asentarse en la superficie de las rocas y adherirse firmemente, una vez que se encuentran en la superficie de la roca es capaz de teñir extensamente el mármol produciendo manchas de diversas tonalidades oscuras, generando daños estéticos. A su vez, pueden penetrar profundamente la roca y junto con esto pueden excretar enzimas las que al depositarse en el sustrato pueden degradarlo, generando daños estructurales (Diakumaku et al., 1995). Estos géneros de hongos pertenecientes a los hongos microcoloniales negros han sido identificados como agente biodeteriorante del mármol por diversos autores (Diakumaku et al., 1995; Wollenzien et al., 1995; Burford et al., 2003; Cappitelli et al., 2006; Cappitelli et al., 2007; Guiamet et al., 2009; Abdelhafez et al., 2012; Guiamet et al., 2012; Prendes et al., 2012; Alarcón & Jiménez, 2013; Guiamet et al., 2013; Aldosari et al., 2019).

De la Ilustración 4.1 se puede inferir que los hongos microcoloniales negros corresponden a más del 50% de los hongos identificados. Cabe destacar que estos microorganismos fúngicos son bastante comunes en sustratos rocosos (Diakumaku et al., 1995). Las esculturas de mármol que fueron de interés para esta investigación presentan principalmente daños estéticos debido a que estas poseen manchas de tonalidades oscuras, principalmente en oquedades y pliegues donde se generarían las condiciones necesarias para que estos puedan proliferar, se puede decir que los hongos microcoloniales negros se encuentran principalmente alojados en forma de costras firmemente adheridas a la superficie de estas. Es importante mencionar que en menor cantidad algunas esculturas presentaban exfoliación en forma de pequeñas picaduras, por lo tanto se podría decir que en menor medida las esculturas de mármol están comenzando degradarse, iniciándose el daño estructural.

Tabla 4.5: Clasificación *Alternaria spp.*

CLASIFICACIÓN <i>ALTERNARIA SPP.</i>						
Hongos Identificados	Reino	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
<i>A. arborescens</i>	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>
<i>A. atra</i>						
<i>A. consortialis</i>						
<i>A. fasciculata</i>						
<i>A. longipes</i>						
<i>A. terricola</i>						
<i>A. arborescens</i>						

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4.6: Clasificación *Cladosporium spp.*

CLASIFICACIÓN <i>CLADOSPORIUM SPP.</i>						
Hongo Identificado	Reino	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
<i>C. cladosporioides</i>	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Cladosporiaceae	<i>Cladosporium</i>
<i>C. sphaerospermum</i>						

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4.7: Clasificación *Epicoccum nigrum.*

CLASIFICACIÓN <i>EPICOCCUM NIGRUM</i>						
Hongo Identificado	Reino	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
<i>E. nigrum</i>	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	<i>Epicoccum</i>

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4.8: Clasificación *Penicillium spp.*

CLASIFICACIÓN <i>PENICILLIUM SPP.</i>						
Hongo Identificado	Reino	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
<i>P. aurantiocandidum</i>	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i>
<i>P. brevicompactum</i>						
<i>P. chrysogenum</i>						
<i>P. commune</i>						
<i>P. crustosum</i>						
<i>P. griseofulvum</i>						
<i>P. polonicum</i>						

Fuente: Elaboración propia.

Los géneros *Candida*, *Fusarium* y *Trichoderma* son géneros cosmopolita que suelen encontrarse en suelo, restos orgánicos muertos, vegetales, madera, alimentos, entre otros, también el género *candida* suele encontrarse en piel y mucosa de mamíferos, su forma de difusión es por esporas húmedas a través de la lluvia, insectos y esporas secas a través del viento (EMLab P&K, 2019).

Estos géneros han sido identificados como agente biodeteriorantes del mármol por diversos autores (Wollenzien et al., 1995; Gorbushina et al., 2002; Burford et al., 2003; Frank-Kamenetskaya et al., 2009; Abdelhafez et al., 2012; Guiamet et al., 2012; Guiamet et al., 2013) sin embargo, no se han descrito los daños que estos podrían generar en el sustrato. En las Tablas 4.10, 4.11 y 4.12 se encuentra la clasificación de estos géneros.

Tabla 4.9: Clasificación *Candida dubliniensis*.

CLASIFICACIÓN <i>CANDIDA DUBLINIENSIS</i>						
Hongo Identificado	Reino	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
<i>C. dubliniensis</i>	Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Debaryomycetaceae	<i>Candida</i>

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4.10: Clasificación *Fusarium spp.*

CLASIFICACIÓN <i>FUSARIUM SPP.</i>						
Hongo Identificado	Reino	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
<i>F. equiseti</i>	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>
<i>F. lacertarum</i>						
<i>F. oxysporum</i>						

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4.11: Clasificación *Trichoderma atroviride*.

CLASIFICACIÓN <i>TRICHODERMA ATROVIRIDE</i>						
Hongo Identificado	Reino	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
<i>T. atroviride</i>	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	<i>Trichoderma</i>

Fuente: Elaboración propia.

Los géneros *Arthrimum*, *Neurospora* y *sordaria*, son géneros de hongos cosmopolitas suelen encontrarse en suelos, materia vegetal en descomposición, estiércol, entre otros, su forma de difusión es por esporas secas a través del viento (EMLab P&K, 2019).

Estos géneros, en la amplia literatura investigada, no han sido descritos como agente biodeteriorante del mármol, por lo tanto, se desconocen los efectos que generarían estos microorganismos al desarrollarse en el sustrato. En las tablas 4.12, 4.13 y 4.14 se encuentran las clasificaciones de estos géneros.

Tabla 4.12: Clasificación *Arthrinium spp.*

CLASIFICACIÓN <i>ARTHRIINIUM SPP.</i>						
Hongo Identificado	Reino	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
<i>A. kogelbergense</i>	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Apiosporaceae	<i>Arthrinium</i>
<i>A. marii</i>						

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4.13: Clasificación *Neurospora crassa.*

CLASIFICACIÓN <i>NEUROSPORA CRASSA</i>						
Hongo Identificado	Reino	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
<i>N. crassa</i>	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Sordariaceae	<i>Neurospora</i>

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4.14: Clasificación *Sordaria spp.*

CLASIFICACIÓN <i>SORDARIA SPP.</i>						
Hongo Identificado	Reino	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
<i>S. fimicola</i>	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Sordariaceae	<i>Sordaria</i>
<i>S. macrospora</i>						

Fuente: Elaboración propia.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

5.1.- Conclusiones

A partir de esta investigación se aislaron e identificaron con un alto porcentaje de similitud de nucleótidos, superior al 97%, 50 cultivos puros de hongo de Phylum Ascomycota. Dentro de este Phylum los hongos identificados pertenecen a los géneros *Alternaria*, *Arthrimum*, *Candida*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Neurospora*, *Sordaria* y *Trichoderma*. Cabe destacar que tres géneros de los identificados, a partir de la bibliografía utilizada, no han sido identificados anteriormente como agentes biodeteriorantes del mármol estos corresponden a *Arthrimum*, *Neurospora* y *Sordaria*. El género *Penicillium* fue el organismo, seguido por *Fusarium* y finalmente *Alternaria* para las muestras obtenidas de ambos Cementerios.

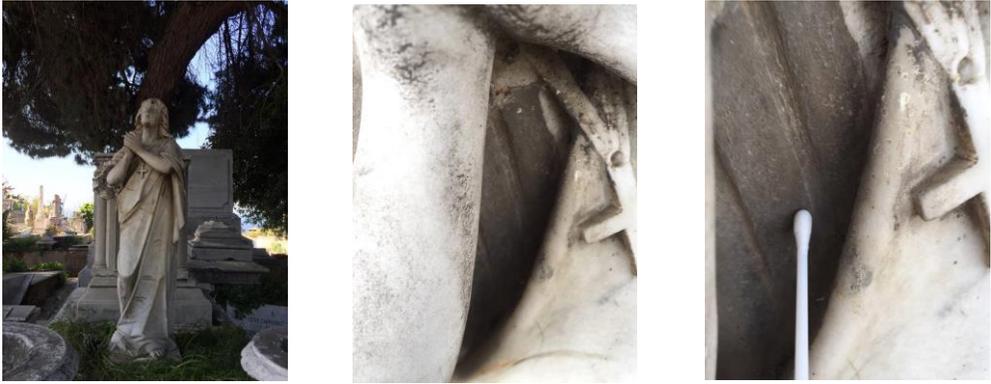
La presencia de microorganismos fúngicos en las esculturas de mármol ubicadas en los Cementerios N°1 y N°2 del Cerro Panteón, Valparaíso, permite afirmar que estas esculturas están siendo afectadas por microorganismos fúngicos, lo que es conocido como biodeterioro. Cabe mencionar que los resultados obtenidos de esta investigación representan la primera identificación de microorganismos aislados desde las esculturas de mármol ubicadas en los Cementerios N°1 y N°2, Valparaíso.

Se puede afirmar que más del 50% de los hongos identificados corresponden a hongos microcoloniales negros. Estos organismos atacan e incluso penetran en las superficies de los monumentos de piedra, generando daños tanto estéticos como estructurales, el mayor daño estético ocurre cuando los hongos no penetran grietas, pues se extienden por la superficie de la roca tiñéndola de tonalidades oscuras (Diakumaku et al., 1995). Como estrategia de control Cappitelli et al., (2007), proponen utilizar resinas sintéticas ya que este material es una buena opción para la consolidación y protección de la piedra. Sin embargo cuando la resina envejece, pasado aproximadamente 30 años, esta se agrieta permitiendo colonizadas por hongos microcoloniales negros. Por lo tanto, si bien los acrílicos son protectores y consolidantes esto no significa necesariamente que a largo plazo sean la mejor opción para la conservación.

Las esculturas de mármol ubicadas en los Cementerios presentan principalmente daños estéticos, una menor cantidad de estas presentan exfoliación en forma de picaduras. Es importante continuar ampliando el conocimiento acerca del biodeterioro del mármol con el objetivo de prevenir que estas esculturas sufran un mayor daño estético y estructural, pues esto podría generar una pérdida total de la escultura afectando al patrimonio funerario.

Para futuras investigaciones es necesario conocer cuál o cuáles son los daños específicos asociados a los géneros de los organismos identificados, para así proponer estrategias de control, junto con esto es necesario conocer además el estado en que se encuentran las superficies de las esculturas de mármol y así poder determinar qué tan susceptibles pueden estar a la colonización de microorganismo biodeteriorantes.

ANEXO I

CONTROL TOMA DE MUESTRAS	
Cementerio:	N°1
N° Muestra:	1
Fecha:	13-10-2018
Ubicación:	Cuartel N°5D-Sepultura: 5D1.
Descripción fotográfica	
 <p>The first image on the left shows a full-length photograph of a white marble statue of a woman standing in a cemetery. The middle and right images are close-up photographs of the statue's surface, showing a white sampling swab being used to collect a sample from a specific area.</p>	
Detalle de la ubicación	
Orientación:	NOR-ESTE
Exposición a vientos:	Media exposición
Exposición a luz:	Exposición a luz sola media tarde

CONTROL TOMA DE MUESTRAS	
Cementerio:	N°1
N° Muestra:	3
Fecha:	13-10-2018
Ubicación:	Cuartel N°5D-Sepultura: 5D1.
Descripción fotográfica	
 <p>The first image on the left shows a full-length photograph of a white marble statue of a woman standing in a cemetery. The middle and right images are close-up photographs of the statue's surface, showing a white sampling swab being used to collect a sample from a specific area.</p>	
Detalle de la ubicación	
Orientación:	NOR-ESTE
Exposición a vientos:	Media exposición
Exposición a luz:	Exposición a luz sola media tarde

CONTROL TOMA DE MUESTRAS	
Cementerio:	N°1
N° Muestra:	4
Fecha:	13-10-2018
Ubicación:	Cuartel N°8E-Sepultura: 154.
Descripción fotográfica	
	
Detalle de la ubicación	
Orientación:	NORTE
Exposición a vientos:	Día y noche
Exposición a luz:	Todo el día

CONTROL TOMA DE MUESTRAS	
Cementerio:	N°1
N° Muestra:	18B
Fecha:	19-10-2018
Ubicación:	Cuartel N°3D - Sepultura: 3D1 .
Descripción fotográfica	
	
Detalle de la ubicación	
Orientación:	NORTE
Exposición a vientos:	Baja exposición
Exposición a luz:	Baja exposición

CONTROL TOMA DE MUESTRAS	
Cementerio:	N°1
N° Muestra:	21B
Fecha:	19-10-2018
Ubicación:	Cuartel N°5A - Sepultura: 5A2 .
Descripción fotográfica	
	
Detalle de la ubicación	
Orientación:	SUR
Exposición a vientos:	Día y noche
Exposición a luz:	Todo el día

CONTROL TOMA DE MUESTRAS	
Cementerio:	N°1
N° Muestra:	23
Fecha:	19-10-2018
Ubicación:	Cuartel N°5B.
Descripción fotográfica	
	
Detalle de la ubicación	
Orientación:	SUR
Exposición a vientos:	Día y noche
Exposición a luz:	En las mañanas

CONTROL TOMA DE MUESTRAS	
Cementerio:	N°1
N° Muestra:	26
Fecha:	19-10-2018
Ubicación:	Cuartel N°7B - Sepultura: 7B1.
Descripción fotográfica	
	
Detalle de la ubicación	
Orientación:	ESTE
Exposición a vientos:	Día y noche
Exposición a luz:	En las tardes

CONTROL TOMA DE MUESTRAS	
Cementerio:	N°1
N° Muestra:	33
Fecha:	25-10-2018
Ubicación:	Cuartel N°8E - Sepultura: 175.
Descripción fotográfica	
	
Detalle de la ubicación	
Orientación:	SUR
Exposición a vientos:	Día y noche
Exposición a luz:	Todo el día

CONTROL TOMA DE MUESTRAS	
Cementerio:	N°1
N° Muestra:	36
Fecha:	25-10-2018
Ubicación:	Cuartel N°8B - Sepultura: 8B1.
Descripción fotográfica	
	
Detalle de la ubicación	
Orientación:	NORTE
Exposición a vientos:	Día y noche
Exposición a luz:	Todo el día

CONTROL TOMA DE MUESTRAS	
Cementerio:	N°1
N° Muestra:	43B
Fecha:	25-10-2018
Ubicación:	Cuartel N°4A - Sepultura: 3.
Descripción fotográfica	
	
Detalle de la ubicación	
Orientación:	NORTE
Exposición a vientos:	Día y noche
Exposición a luz:	Desde media tarde

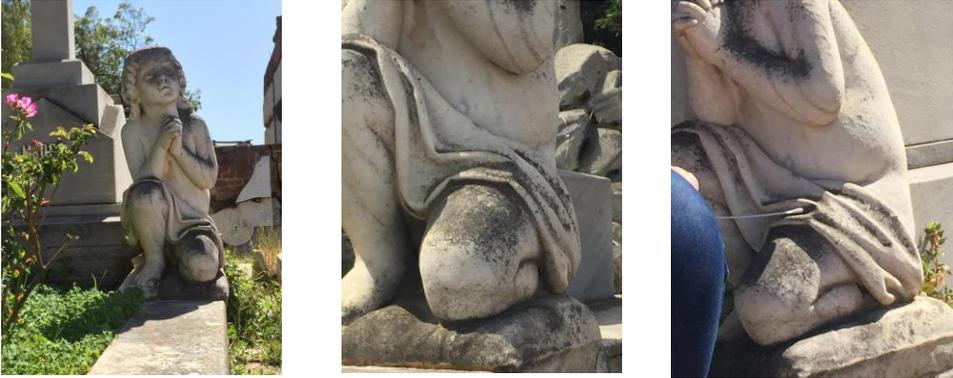
CONTROL TOMA DE MUESTRAS	
Cementerio:	N°1
N° Muestra:	44
Fecha:	25-10-2018
Ubicación:	Cuartel N°4A - Sepultura: 4A1.
Descripción fotográfica	
	
Detalle de la ubicación	
Orientación:	NORTE
Exposición a vientos:	Día y noche
Exposición a luz:	Todo el día

ANEXO II

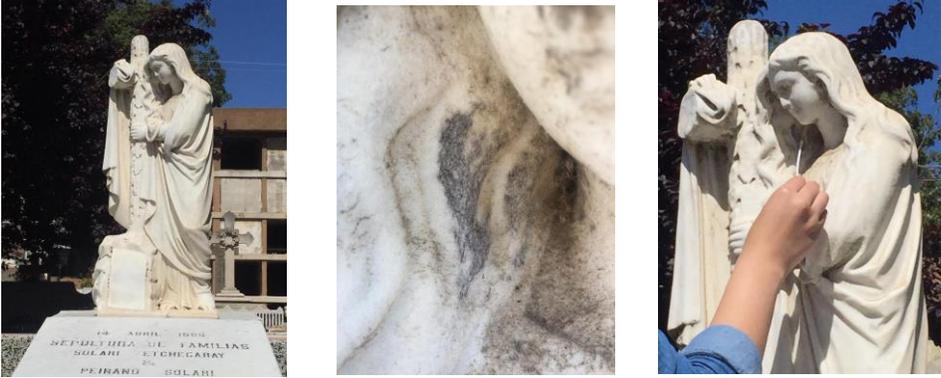
CONTROL TOMA DE MUESTRAS	
Cementerio:	Nº2
Nº Muestra:	6
Fecha:	19-10-2018
Ubicación:	Cuartel Nº2 - Sepultura: sociedad española de beneficencia. León izquierdo
Descripción fotográfica	
 <p>The first photograph shows a white marble lion sculpture lying on a ledge. The second and third photographs are close-ups of the lion's mouth, showing a dark cavity where a sample is being collected with a small tool.</p>	
Detalle de la ubicación	
Orientación:	SUR
Exposición a vientos:	Día y noche
Exposición a luz:	Todas las tardes

CONTROL TOMA DE MUESTRAS	
Cementerio:	Nº2
Nº Muestra:	7A
Fecha:	19-10-2018
Ubicación:	Cuartel Nº2 - Sepultura: 240.
Descripción fotográfica	
 <p>The first photograph shows a stone sculpture of a woman in a cemetery setting. The second and third photographs are close-ups of the woman's face, showing a dark cavity where a sample is being collected with a small tool.</p>	
Detalle de la ubicación	
Orientación:	SUR-OESTE
Exposición a vientos:	Día y noche
Exposición a luz:	Todo el día

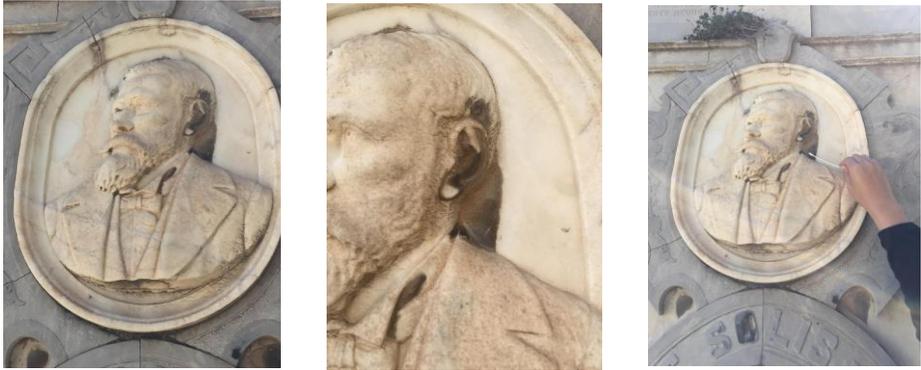
CONTROL TOMA DE MUESTRAS	
Cementerio:	N°2
N° Muestra:	8A
Fecha:	19-10-2018
Ubicación:	Cuartel N°2 - Sepultura: 24.
Descripción fotográfica	
	
Detalle de la ubicación	
Orientación:	NOR-ESTE
Exposición a vientos:	Día y noche
Exposición a luz:	En la tardes

CONTROL TOMA DE MUESTRAS	
Cementerio:	N°2
N° Muestra:	8B
Fecha:	19-10-2018
Ubicación:	Cuartel N°2 - Sepultura: 24.
Descripción fotográfica	
	
Detalle de la ubicación	
Orientación:	NOR-ESTE
Exposición a vientos:	Día y noche
Exposición a luz:	En las tardes

CONTROL TOMA DE MUESTRAS	
Cementerio:	Nº2
Nº Muestra:	9A
Fecha:	19-10-2018
Ubicación:	Cuartel Nº2 - Sepultura: 121.
Descripción fotográfica	
	
Detalle de la ubicación	
Orientación:	NORTE
Exposición a vientos:	Día y noche
Exposición a luz:	En las tardes

CONTROL TOMA DE MUESTRAS	
Cementerio:	Nº2
Nº Muestra:	10A
Fecha:	19-10-2018
Ubicación:	Cuartel Nº2 - Sepultura: 270.
Descripción fotográfica	
	
Detalle de la ubicación	
Orientación:	SUR-OESTE
Exposición a vientos:	Día y noche
Exposición a luz:	Todo el día

CONTROL TOMA DE MUESTRAS	
Cementerio:	Nº2
Nº Muestra:	13
Fecha:	19-10-2018
Ubicación:	Cuartel B - Sepultura: familia Bertelsen- ángel izquierdo.
Descripción fotográfica	
	
Detalle de la ubicación	
Orientación:	SUR
Exposición a vientos:	Baja exposición
Exposición a luz:	En las tardes

CONTROL TOMA DE MUESTRAS	
Cementerio:	Nº2
Nº Muestra:	15
Fecha:	19-10-2018
Ubicación:	Cuartel E- Sepultura: Familia Fling Solis.
Descripción fotográfica	
	
Detalle de la ubicación	
Orientación:	NORTE
Exposición a vientos:	Baja Exposición
Exposición a luz:	Baja Exposición

CONTROL TOMA DE MUESTRAS	
Cementerio:	Nº2
Nº Muestra:	B
Fecha:	04-10-2018
Ubicación:	Cuartel Nº2 - Sepultura: sociedad española de beneficencia. León derecho.
Descripción fotográfica	
	
Detalle de la ubicación	
Orientación:	SUR
Exposición a vientos:	Día y noche
Exposición a luz:	Todas las tardes

CONTROL TOMA DE MUESTRAS	
Cementerio:	Nº2
Nº Muestra:	C
Fecha:	11-10-2018
Ubicación:	Cuartel 7 - Sepultura: 47.
Descripción fotográfica	
	
Detalle de la ubicación	
Orientación:	NOR-OESTE
Exposición a vientos:	Día y noche
Exposición a luz:	Baja exposición

ANEXO III

RESUMEN INDIVIDUALIZACIÓN MUESTRAS CEMENTERIO N°1			
Identificación muestra	Fecha cultivo puro	Identificación placa	¿Cultivo puro?
MUESTRA 1	19-11-2018	M1-1	SI
MUESTRA 2	19-11-2918	M2-1A	SI
	19-11-2018	M2-1B	SI
	16-11-2018	M2-1C	SI
	19-11-2018	M2-2	SI
MUESTRA 3	30-10-2018	M3-1	SI
	26-10-2018	M3-2	SI
MUESTRA 4	29-10-2018	M4-1	SI
	26-10-2018	M4-2	SI
	26-10-2018	M4-3	SI
MUESTRA 5	16-11-2018	M5-1	SI
	19-11-2918	M5-2A1	SI
	19-11-2918	M5-2A2	SI
	15-11-2018	M5-2B	SI
MUESTRA 16	19-11-2018	M16-1A	SI
	19-11-2018	M16-1B	SI
	19-11-2018	M16-2	SI
MUESTRA 17	19-11-2018	M17-1A	SI
	19-11-2018	M17-1B	SI
MUESTRA 18A	19-11-2018	M18A-2	SI
MUESTRA 18B	19-11-2018	M18B-1A1	SI
	06-11-2018	M18B-1A2	SI
	09-11-2018	M18B-1A3	SI
	19-11-2018	M18B-1B1A	SI
	19-11-2018	M18B-1B1B1	SI
	19-11-2018	M18B-1B1B2	SI
	14-11-2018	M18B-1B2	SI
	19-11-2018	M18B-2	SI
MUESTRA 19	29-10-2018	M19-1	SI
MUESTRA 20	14-11-2018	M20-1	SI
MUESTRA 21	06-11-2018	M21-1	SI
	19-11-2018	M21-2	SI
	19-11-2018	M21-2B	SI
MUESTRA 22	31-10-2018	M22-1	SI
MUESTRA 23	19-11-2018	M23-1	SI
MUESTRA 24	19-11-2018	M24-1A	SI
	16-11-2018	M24-1B	SI

RESUMEN INDIVIDUALIZACIÓN MUESTRAS CEMENTERIO N°1			
Identificación muestra	Fecha cultivo puro	Identificación placa	¿Cultivo puro?
MUESTRA 25	19-11-2018	M25-1A	SI
MUESTRA 26	26-10-2018	M26-1	SI
	19-11-2018	M26-2	SI
MUESTRA 27	19-11-2018	M27-1	SI
MUESTRA 28	16-11-2018	M28-1	SI
	19-11-2018	M28-2A1	SI
	12-11-2018	M28-2A2	SI
	19-11-2018	M28-2B1	SI
	14-11-2018	M28-2B2	SI
	19-11-2018	M28-2C	SI
MUESTRA 29	08-11-2018	M29-1A	SI
	06-11-2018	M29-1B	SI
	19-11-2018	M29-2A	SI
	19-11-2018	M29-2B	SI
MUESTRA 30	16-11-2018	M30-1A	SI
	19-11-2018	M30-1B	SI
MUESTRA 31	29-10-2018	M31-1	SI
	16-11-2018	M31-2	SI
MUESTRA 32	31-10-2018	M32-1	SI
	19-11-2018	M32-2A	SI
	06-11-2018	M32-2B	SI
MUESTRA 33	05-11-2018	M33-1	SI
MUESTRA 34	14-11-2018	M34-1	SI
	19-11-2018	M34-2	SI
	14-11-2018	M34-3	SI
MUESTRA 35	14-11-2018	M35-1A	SI
	19-11-2018	M35-1B1	SI
	14-11-2018	M35-1B2	SI
	14-11-2018	M35-1C	SI
	19-11-2018	M35-2A	SI
	19-11-2018	M35-2B	SI
MUESTRA 36	19-11-2018	M36-1A	SI
	16-11-2018	M36-1B	SI
	14-11-2018	M36-2A	SI
	19-11-2018	M36-2B1	SI
	19-11-2018	M36-2B2	SI
	19-11-2018	M36-3A1	SI

RESUMEN INDIVIDUALIZACIÓN MUESTRAS CEMENTERIO N°1			
Identificación muestra	Fecha cultivo puro	Identificación placa	¿Cultivo puro?
MUESTRA 36	19-11-2018	M36-3A2	SI
	16-11-2018	M36-3B	SI
MUESTRA 37	14-11-2018	M37-1	SI
	19-11-2018	M37-2A	SI
	14-11-2018	M37-2B	SI
MUESTRA 38	14-11-2018	M38-1	SI
MUESTRA 39	14-11-2018	M39-1	SI
MUESTRA 40	14-11-2018	M40-1	SI
	19-11-2018	M40-2	SI
MUESTRA 41	14-11-2018	M41-1	SI
MUESTRA 42	19-11-2018	M42-1A	SI
	16-11-2018	M42-1B	SI
	16-11-2018	M42-2A	SI
	12-11-2012	M42-2B1	SI
	19-11-2018	M42-2B2	SI
	19-11-2018	M42-3	SI
	16-11-2018	M42-2C	SI
MUESTRA 43A	19-11-2018	M43A-1	SI
MUESTRA 43B	06-11-2018	M43B-2	SI
MUESTRA 44	06-11-2018	M44-1	SI
	19-11-2018	M44-2	SI

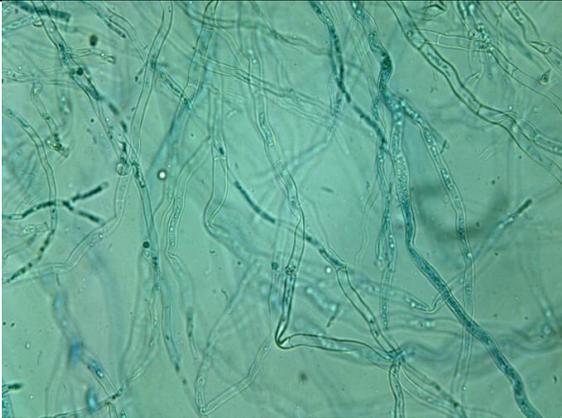
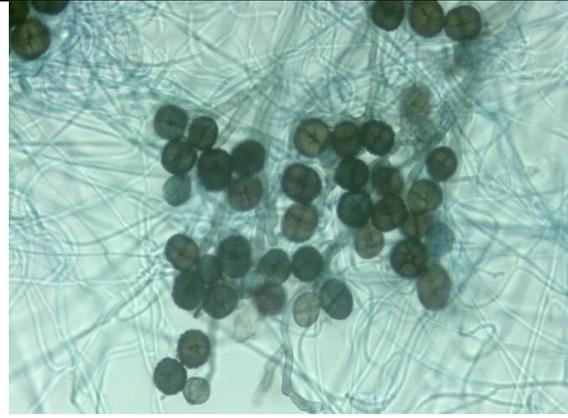
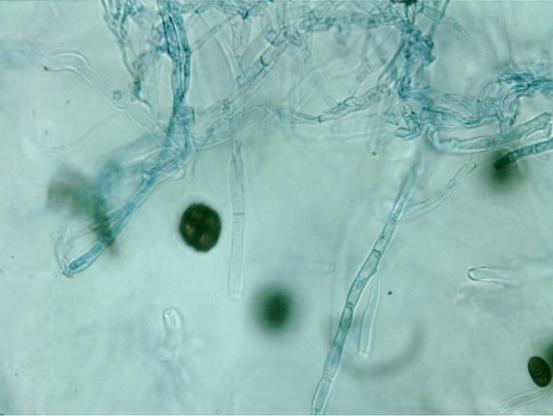
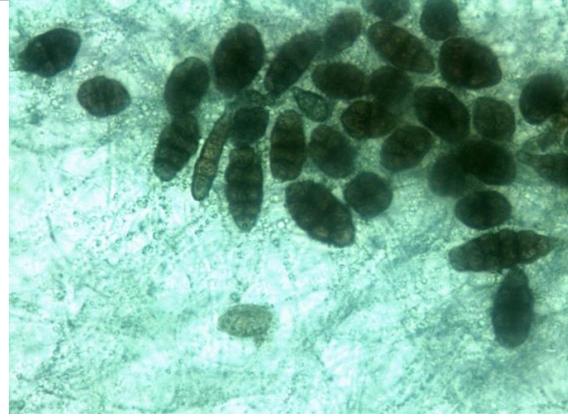
ANEXO IV

RESUMEN INDIVIDUALIZACIÓN MUESTRAS CEMENTERIO N°2			
Identificación muestra	Fecha cultivo puro	Identificación placa	¿Cultivo puro?
MUESTRA 6	17-12-2018	M6-1A	SI
	07-01-2019	M6-1B1	SI
	14-01-2019	M6-1B2A	SI
	17-01-2019	M6-1B2B1	SI
	17-01-2019	M6-1B2B2	SI
	14-01-2019	M6-1B2C	SI
	07-01-2019	M6-2	SI
MUESTRA 7A	17-12-2018	M7A-1	SI
MUESTRA 7B	28-01-2019	M7B-1A1A1A	SI
	28-01-2019	M7B-1A1A1B	SI
	17-01-2019	M7B-1A1A2	SI
	07-01-2019	M7B-1A1B	SI
	02-01-2019	M7B-1A2	SI
	02-01-2019	M7B-1B1	SI
	07-01-2019	M7B-1B2	SI
	07-01-2019	M7B-2A	SI
07-01-2019	M7B-2B	SI	
MUESTRA 8A	17-12-2018	M8A-1A	SI
	17-12-2018	M8A-1B	SI
	17-12-2018	M8A-2A	SI
	17-12-2018	M8A-2B	SI
MUESTRA 8B	17-12-2018	M8B-1A	SI
	10-01-2019	M8B-1B1A	SI
	17-01-2019	M8B-1B1B1	SI
	14-01-2019	M8B-1B1B2	SI
	24-01-2019	M8B-1B2A1	SI
	24-01-2019	M8B-1B2A2	SI
	17-01-2019	M8B-1B2B1A	SI
	17-01-2019	M8B-1B2B1B	SI
	10-01-2019	M8B-1B2B2	SI
	10-12-2018	M8B-2	SI
MUESTRA 9A	18-12-2018	M9A-1A	SI
	07-01-2019	M9A-1B1A	SI
	07-01-2019	M9A-1B1B	SI
	07-01-2019	M9A-1B2A	SI
	07-01-2019	M9A-1B2B	SI
	18-12-2018	M9A-2A	SI
	18-12-2018	M9A-2B	SI

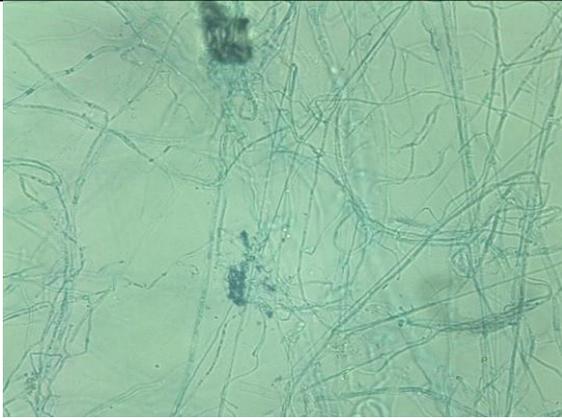
RESUMEN INDIVIDUALIZACIÓN MUESTRAS CEMENTERIO N°2			
Identificación muestra	Fecha cultivo puro	Identificación placa	¿Cultivo puro?
MUESTRA 9B	05-12-2018	M9B-1	SI
MUESTRA 10A	18-12-2018	M10A-1A	SI
	18-12-2018	M10A-1B	SI
	18-12-2018	M10A-2A	SI
	18-12-2018	M10A-2B	SI
MUESTRA 10B	17-12-2018	M10B-1A	SI
	17-12-2018	M10B-1B	SI
MUESTRA 10C	02-01-2019	M10C-1	SI
	02-01-2019	M10C-2A	SI
	14-01-2019	M10C-2B1A	SI
	14-01-2019	M10C-2B1B	SI
	07-01-2019	M10C-2B2	SI
MUESTRA 11A	17-12-2018	M11A-1A	SI
	17-12-2018	M11A-1B	SI
MUESTRA 11B	10-01-2019	M11B-1A1	SI
	10-01-2019	M11B-1A2	SI
	02-01-2018	M11B-1B	SI
MUESTRA 12A	24-01-2019	M12A-1A	SI
	24-01-2019	M12A-1B	SI
MUESTRA 12B	05-12-2018	M12B-1	SI
MUESTRA 13	17-12-2018	M13-1	SI
	07-01-2019	M13-2A1	SI
	07-01-2019	M13-2A2	SI
	10-01-2019	M13-2B1	SI
	07-01-2019	M13-2B2	SI
MUESTRA 14	05-12-2018	M14-1	SI
MUESTRA 15	10-12-2018	M15-1	SI
	14-01-2019	M15-2	SI
	28-01-2019	M15-3A	SI
	28-01-2019	M15-3B	SI
	28-01-2019	M15-3C	SI
MUESTRA A	24-10-2018	MA-1	SI
MUESTRA B	24-10-2018	MB-1	SI
	22-10-2018	MB-2	SI
	22-10-2018	MB-3	SI
MUESTRA C	14-01-2019	MC-1A1A1	SI
	14-01-2019	MC-1A1A2	SI

RESUMEN INDIVIDUALIZACIÓN MUESTRAS CEMENTERIO N°2			
Identificación muestra	Fecha cultivo puro	Identificación placa	¿Cultivo puro?
MUESTRA C	10-01-2019	MC-1A1B1	SI
	24-01-2019	MC-1A1B2A	SI
	24-01-2019	MC-1A1B2B	SI
	14-01-2019	MC-1A2A1	SI
	14-01-2019	MC-1A2A2	SI
	14-01-2019	MC-1A2B	SI
	14-01-2019	MC-1B1	SI
	14-01-2019	MC-1B2	SI
	17-12-2018	MC-2	SI
MUESTRA D	17-12-2018	MD-1	SI

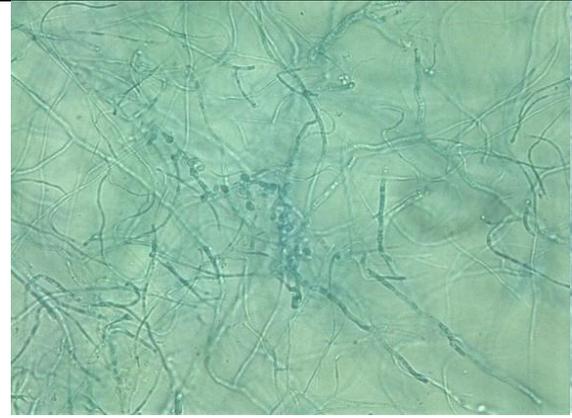
ANEXO V

Alternaria spp.*Alternaria arborescens**Alternaria atra**Alternaria consortialis**Alternaria fasciculata**Alternaria longipes**Alternaria terricola*

Arthrinium spp.

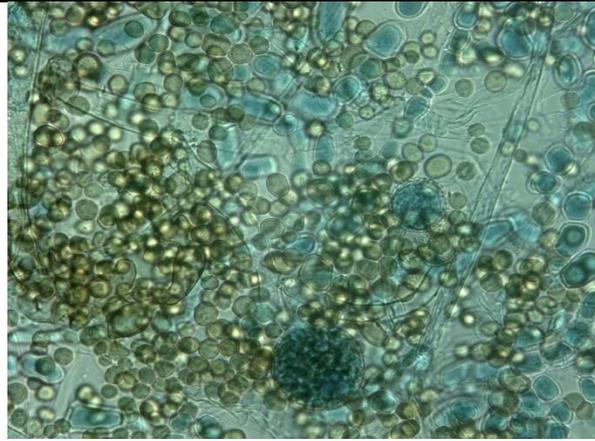


Arthrinium kogelbergense



Arthrinium marii

Candida dubliniensis

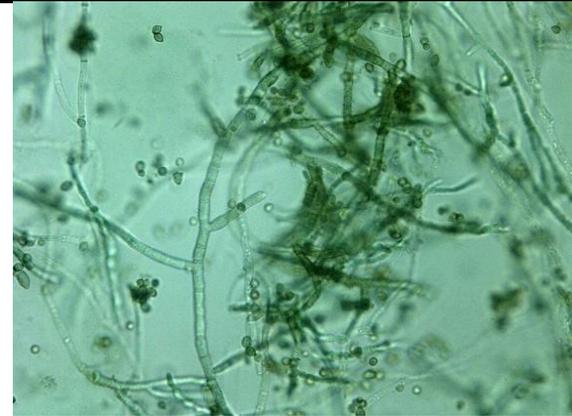


Candida dubliniensis

Cladosporium spp.



Cladosporium cladosporoides



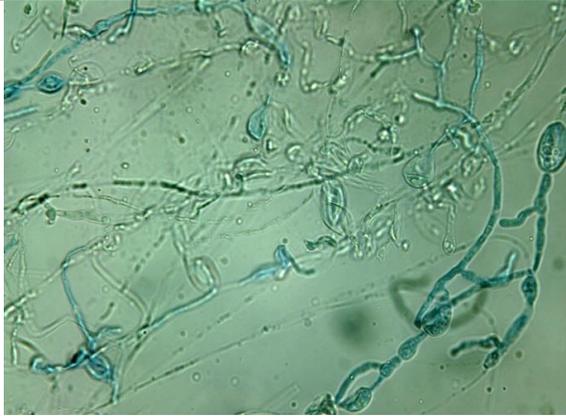
Cladosporium sphaerospermum

Epicoccum nigrum



Epicoccum nigrum

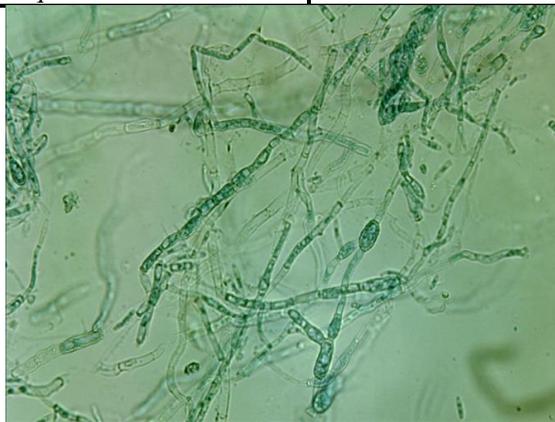
Fusarium spp.



Fusarium equiseti



Fusarium lacertarum



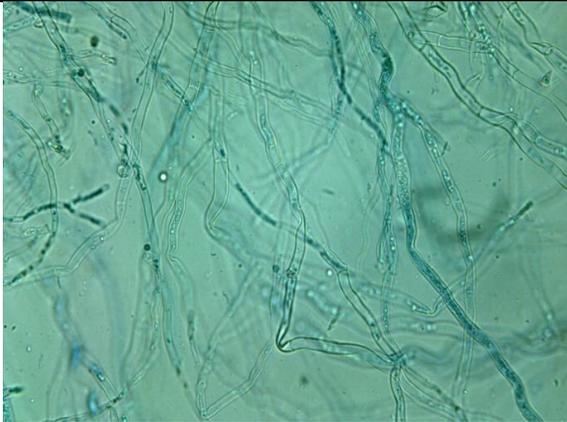
Fusarium oxysporum

Neurospora crassa

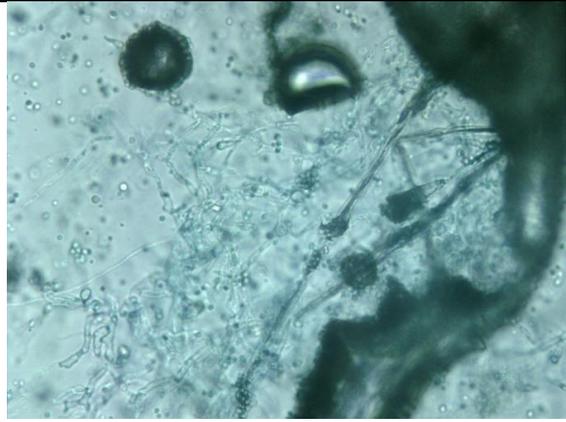


Neurospora crassa

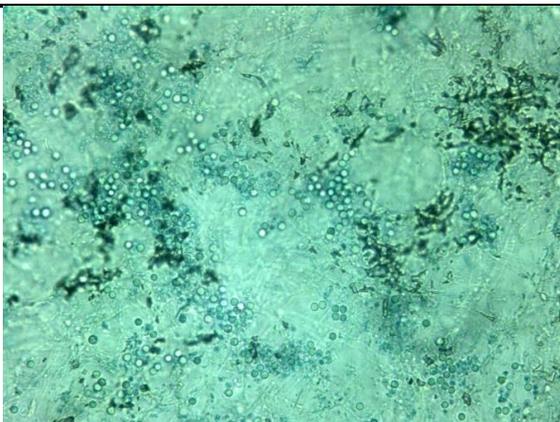
Penicillium spp.



Penicillium aurantiocandidum



Penicillium brevicompactum



Penicillium chrysogenum



Penicillium commune

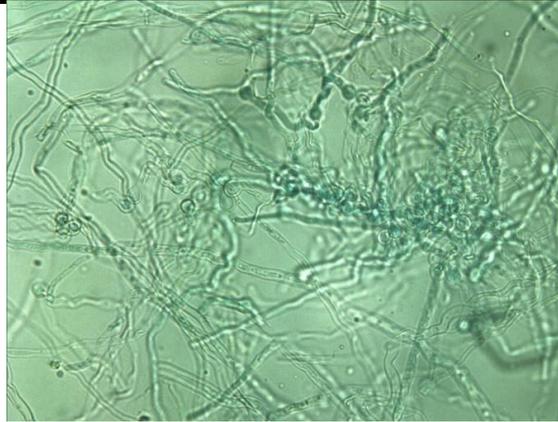
Penicillium spp.



Penicillium crustosum

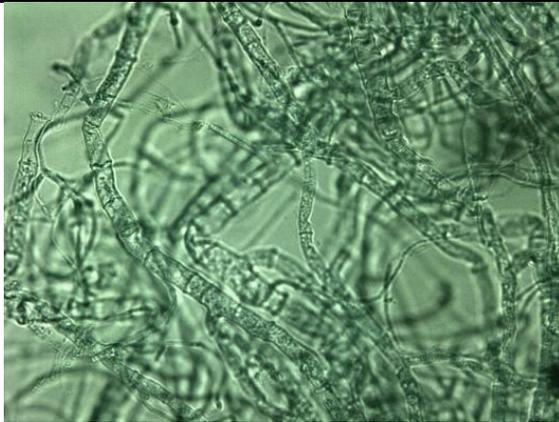


Penicillium griseofulvum



Penicillium polonicum

Sordaria spp.

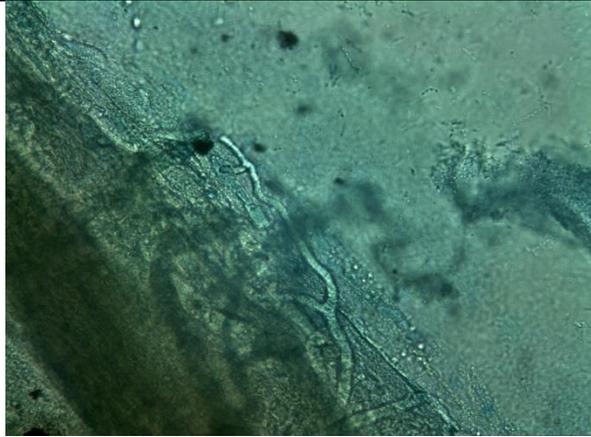


Sordaria fimicola



Sordaria macrospora

Trichoderma atroviride



Neurospora crassa

BIBLIOGRAFÍA

Abdelhafez, M., El-Wekeel, M., Ramadan, M. & Abed-Allah, A. (2012). Microbial deterioration of archaeological marble: Identification and treatment. *Annals of Agricultural Sciences*, 57(2), 137–144. doi:10.1016/j.aogas.2012.08.007

Aghamelu, P. & Amah, I. (2016). Quality and durability of some marble deposits in the southern schist belt (Nigeria) as construction stones. *Bulletin of Engineering Geology and the Environment*, 76(4), 1563-1575. doi:10.1007/s10064-016-0939-6

Alabi, B., Olatunji, S., Babalola, O., Nwankwo, I., Johnson, M. & Odutayo, O. (2013). Structural and qualitative analysis of solid minerals (marble) in selected locations in Nigeria. *Niger J Phys* 24, 68–76.

Alarcón, G. & Jiménez, C. (2013). Biodeterioro de monumentos y bioremediación: estado actual y perspectivas futuras. *Real Academia Nacional de Farmacia*, 79(4), 562-579.

Aldosari, A., Darwish, S., Adam, A., Elmarzugi, A. & Ahmed, M. (2019). Using ZnO nanoparticles in fungal inhibition and self-protection of exposed marble columns in historic sites. *Archaeological and Anthropological Sciences*. doi:10.1007/s12520-018-0762-z

Allsopp, D., Seal, K. & Gaylarde, C. (2004). *Introduction to biodeterioration*. New York: Cambridge University Press.

Avendaño, C., Londoño, C. & Vela, M. (2007). Patologías por la humedad en los materiales para construcción. *Scientia Et Technica*, (36), 343-347.

Burford, P., Kierans, M. & Gadd, M. (2003). Geomycology: fungi in mineral substrata. *Mycologist*, 17(3), 98–107. doi:10.1017/s0269915x03003112

Caneva, G., Lombardozzi, V., Ceschin, S., Municchia, A. & Salvadori, O. (2014). Unusual differential erosion related to the presence of endolithic microorganisms (Martvili, Georgia). *Journal of Cultural Heritage*, 15(5), 538-545. doi: 10.1016/j.culher.2013.10.003

Cappitelli, F., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., Toniolo, L., Brusetti, L., Florio, S., ... Sorlini, C. (2006). Synthetic Consolidants Attacked by Melanin-Producing Fungi: Case Study of the Biodeterioration of Milan (Italy) Cathedral Marble Treated with Acrylics. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 271–277. doi:10.1128/aem.02220-06

Cappitelli, F., Principi, P., Pedrazzani, R., Toniolo, L. & Sorlini, C. (2007). Bacterial and fungal deterioration of the Milan Cathedral marble treated with protective synthetic resins. *Science of The Total Environment*, 385(1-3), 172–181. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.06.022

Casanova Municchia, A., Percario, Z. & Caneva, G. (2014). Detection of endolithic spatial distribution in marble stone. *Journal of Microscopy*, 256(1), 37–45. doi:10.1111/jmi.12155

Christine C. Gaylarde, C., Gaylarde, P. & Neilan, B. (2012). Endolithic Phototrophs in Built and Natural Stone. *Curr Microbiol*, 65, 183-188.

Ciferri, O. (2002). The role of microorganisms in the degradation of cultural heritage. *Studies in Conservation*, 47(1), 35-45.

Consejo de Monumentos Nacionales de Chile. (2019). *Estadísticas de Monumentos Nacionales declarados por decreto*. Recuperado de <https://www.monumentos.gob.cl/monumentos>

Consejo de Monumentos Nacionales de Chile. (s.f.). Cementerio N°1 ó Cementerio General de Valparaíso. Recuperado de <https://www.monumentos.gob.cl/monumentos/monumentos-historicos/cementerio-ndeg-1-cementerio-general-valparaiso>

Crespo, M., De Maio Ponce de, B. y Orsetti, A. (2001). Biodeterioration Diagnosis of a Relief Belonging to the Grave of Olivera de Pignetto in Recoleta Cemetery, Argentina. 4° *Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium, Buenos Aires, 11*.

De Turrís, A., Ocando, L., De Romero, F. & Fernández, M. (2013). ¿Pueden los Microorganismos Impactar los Materiales de Construcción?. *Ciencias Aplicadas*, 10, 23-33.

Diakumaku, E., Gorbushina, A. A., Krumbein, W. E., Panina, L. & Soukharjevski, S. (1995). Black fungi in marble and limestones—an aesthetical, chemical and physical problem for the conservation of monuments. *Science of the Total Environment*, 167(1-3), 295-304. doi:10.1016/0048-9697(95)04590-w

El mármol. (2014). Recuperado de <https://www.lapidasyanteones.com/marmol/>

EMLab P&K. (2019). *Fungal library*. Recuperado de <https://www.emlab.com/resources/fungal-library/>

Frank-Kamenetskaya, O., Vlasov, D., Zelenskaya, M., Knauf, I. & Timasheva, M. (2009). Decaying of the marble and limestone monuments in the urban environment. Case studies from Saint Petersburg, Russia. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Geologia*, 54 (2), 17–22.

Franque, M. (29 de Octubre de 2006). Personajes bajo tierra. *El Mercurio de Valparaíso*. Recuperado de http://www.mercuriovalpo.cl/prontus4_noticias/site/artic/20061029/pags/20061029023152.html

Fundación Aldea. (2017). Muelle del cementerio: Perspectiva desde el ejercicio de la

ciudadanía. *Planeo*, 34.

Gaylarde, C., Ribas Silva, M., & Warscheid, T. (2003). *Microbial impact on building materials: an overview*. *Materials and Structures*, 36(5), 342–352. <https://doi.org/10.1007/BF02480875>

Golubić, S., Pietrini, M. & Ricci, S. (2015). Eundolithic activity of the cyanobacterium *Chroococcus lithophilus* etc. in biodeterioration of the pyramid of Caius Cestius, Rome, Italy. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 100, 7-16. doi:10.1016/j.ibiod.2015.01.019

Gorbushina, A., Lyalikova, N., Vlasov, Y. & Khizhnyak, V. (2002). Microbial Communities on the Monuments of Moscow and St. Petersburg: Biodiversity and Trophic Relations. *Microbiology*, 71(3), 350–356. doi:10.1023/a:1015823232025

Gueidan, C., Villaseñor, C., de Hoog, G., Gorbushina, A., Untereiner, W. & Lutzoni, F. (2008). A rock-inhabiting ancestor for mutualistic and pathogen-rich fungal lineages. *Studies in Mycology*, 61, 111–119. doi:10.3114/sim.2008.61.11

Guiamet, P. S., Rosato, V., de Saravia, S. G., García, A. M., & Moreno, D. A. (2012). Biofouling of crypts of historical and architectural interest at La Plata Cemetery (Argentina). *Journal of Cultural Heritage*, 13(3), 339–344. doi:10.1016/j.culher.2011.11.002

Guiamet, P., Crespo, M., Lavin, P., Ponce, B., Gaylarde, C., & de Saravia, G. (2013). Biodeterioration of funeral sculptures in La Recoleta Cemetery, Buenos Aires, Argentina: Pre- and post-intervention studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101, 337–342. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.06.025

Guiamet, S., Crespo, M., Lavin, P., Ponce, B. & Gómez de Saravia, G. (Septiembre, 2009). *Estudio de biodeterioro pre y post intervención en esculturas funerarias integrantes del patrimonio del cementerio de La Recoleta*. Trabajo presentado en 1er. Congreso Iberoamericano y VII Jornada “Técnicas de Restauración y Conservación del Patrimonio”, La Plata, Argentina.

Guiamet, S., Lavin, P. & Gómez de Saravia, G. (2010). Participación de comunidades microbianas en el biodeterioro de rocas de interés histórico-cultural. *Revista argentina de microbiología*, 42(2), 141-141.

Guiamet, S., Rosato, V., de Saravia, G., García, M. & Moreno, A. (2012). Biofouling of crypts of historical and architectural interest at La Plata Cemetery (Argentina). *Journal of Cultural Heritage*, 13, 339–344. doi:10.1016/j.culher.2011.11.002

Gutiérrez, J. & Noningo, N. (2016). Biodeterioro por plantas vasculares en el Museo Cementerio Presbítero Matías Maestro, Lima-Perú. *Rebiol*, 36(2), 40- 64.

Herrera, E. (24 de Abril de 2017). Indagan trascendencia histórica de los cementerios. *El Universal*. Recuperado de <https://www.eluniversal.com.mx/articulo/cultura/patrimonio/2017/04/24/indagan-trascendencia-historica-de-los-cementerios>

Hueck, J. (2001). The biodeterioration of materials—an appraisal. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 48(1-4), 5–11. doi:10.1016/s0964-8305(01)00061-0

Krumbein, E. & Urzi, C. (1993). *Microbiological Impacts on the Cultural Heritage with Special Reference to Rock Materials, La Pietra Dei Monumenti Nel Suo Ambiente Fisico*. Instituto Poligrafico Roma, 151–178.

Krumbein, E. (1988). Microbial interactions with mineral materials. *Biodeterioration* 7, 78-100. doi: 10.1007/978-94-009-1363-9_11

Larrondo, M. (1, Septiembre, 2017). *Cementerios en la historia de Chile*. Recuperado de <https://www.enterrano.com/blogs/cementerios-en-la-historia-de-chile>

Lopes, L. (2007). O triângulo do Mármore – Estudo Geológico. *Monumentos* (27), 6-15.

López-García P, Moreira D. 2015. Open questions on the origin of eukaryotes. *Trends in ecology and evolution*. 30, 697-708.

Marvasi, M., Donnarumma, F., Frandi, A., Mastromei, G., Sterflinger, K., Tiano, P. & Perito, B. (2012). Black microcolonial fungi as deteriogens of two famous marble statues in Florence, Italy. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 68, 36–44. doi:10.1016/j.ibiod.2011.10.011

Moreno, C. (2016). Los hongos: héroes y villanos de la prosperidad humana. *Revista digital universitaria*, 17(9).

Ojeda, A. (2015). *Los rasgos culturales de la muerte 1860-1930 Cerro Panteón, Valparaíso*. Valparaíso: Municipalidad de Valparaíso.

Ojeda, A. (2017). Ciudades en silencio. *El Mercurio*. pp. 44-52.

Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura. (Abril, 2005). *Paisajes culturales en el Siglo XXI. Legislación, gestión y participación pública: El patrimonio como desafío de la ciudadanía*. Trabajo presentado en Décimo Seminario Internacional del Forum UNESCO - Universidad y Patrimonio, Newcastle, Reino Unido.

Ortega-Morales O., Guezennec J., Hernández-Duque G.; Gaylarde C. & Gaylarde M. (2000). Phototrophic biofilms on ancient Mayan buildings in Yucatan, Mexico. *Current microbiology*, 40 (2), 81-85. doi:10.1007/s002849910015

Ortega-Morales O., Hernández-Duq G., Borges-Gomez L. & Guezennec, J. (1999). Characterization of epilithic microbial communities associated with Mayan stone monuments in Yucatan, Mexico. *Geomicrobiology Journal*, 16(3), 221-232. doi:10.1080/014904599270604

Pontón, J., Moragues, D., Gené, J., Guarro, J. & Quindós, G. (2002). *Hongos y actinomicetos alergénicos*. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología.

Prendes, M., Premdes, C. & Lorenzo, D. (2012). *Biodeterioro fúngico de los mármoles del cementerio San Francisco de la Orotava. Estado de conservación*. Trabajo presentado en XI congreso internacional de rehabilitación del patrimonio arquitectónico y edificación, Cascais, Portugal.

Puerto, M. & Rowe, J. (1995). Biodeterioro. Alteración biológica de monumentos y obras de arte. *PH: boletín del Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico*, 3(10), 26-27.

Ramírez-Vázquez, M. (2012). *Biodeterioro algal en monumentos históricos mayas de la zona tropical húmeda: Palenque, Yaxchilán y Bonampak (Chiapas, México)*. (Tesis doctoral). Universidad de Barcelona, España. Recuperado de <https://www.tesisenred.net/handle/10803/96116>

Saiz-Jimenez, C. (1995). Deposition of Anthropogenic Compounds on Monuments and Their Effect on Airborne Microorganisms. *Aerobiologia*, 11(3), 161–175. doi:10.1007/bf02450035

Saiz-Jimenez, C. (2010): *The Biodeterioration of Building Materials*.

Salvadori, O. & Municchia, C. (2016). The role of fungi and lichens in the biodeterioration of stone monuments. *The Open Conference Proceedings Journal*, 7(1), 39-54.

Samsó, E. (1965). *Piedras, Granitos y Mármoles*. Barcelona: Ediciones CEAC.

Sarró, I., García, M., Rivalta, M., Moreno, A. & Arroyo, I. (2006). Biodeterioration of the Lions Fountain at the Alhambra Palace, Granada (Spain). *Building and Environment*, 41(12), 1811–1820. doi:10.1016/j.buildenv.2005.07.029

Savvides, L., Nikolakopoulou, L., Kyratsous, N., Katsifas, A., Kanini, G. & Karagouni, D. (2014). Bacterial Deterioration of Marble Monuments: A Case Study of the Conservation Project of Acropolis Monuments. *Geomicrobiology Journal*, 31(8), 726–736. doi:10.1080/01490451.2014.885618

Sert, H., Sümbül, H. & Sterflinger, K. (2006). Microcolonial fungi from antique marbles in Perge/Side/Termessos (Antalya/Turkey). *Antonie van Leeuwenhoek*, 91, 217-227. doi:10.1007/s10482-006-9111-9

Silva, V., Díaz, M., Febré, N. & Red de Diagnósticos en Micología Médica. (2002). Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Rev Chil Infect*, 19(2), 149-156.

Sterflinger, K. (2010). Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal Biology Reviews*, 24(1-2), 47–55. doi:10.1016/j.fbr.2010.03.003

Tatis, R. & Barbosa, A. (2013). Enfoque Químico Del Deterioro Y Biodeterioro De Rocas Calcáreas Conformantes De Monumentos Patrimoniales De Importancia Histórica Y Cultural. *Luna Azul*, (36), 247- 284.

Valentín, N. (2010). Microorganisms in museum collections. *Coalition*, 19.

Velásquez, C., Mercado C., Colomines, A., Muñoz, O., Rincón, F., Repetto, L.,, González, A. (Noviembre, 2005). *Carta Internacional de Morelia Relativa a cementerios patrimoniales y arte funerario*. Red Iberoamericana de Valoración y Gestión de Cementerios Patrimoniales, Michoacán, México.

Videla, H., Guiamet, P. & de Saravia, G. (2000). Biodeterioration of Mayan archaeological sites in the Yucatan Peninsula, Mexico. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46(4), 335–341. doi:10.1016/s0964-8305(00)00106-2

Warscheid T. & Braams J. (2000). Biodeterioration of Stone: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46(4), 343-368. doi:10.1016/s0964-8305(00)00109-8

Wollenzien, U., de Hoog, S., Krumbein, E. & Urzı, C. (1995). On the isolation of microcolonial fungi occurring on and in marble and other calcareous rocks. *Science of The Total Environment*, 167, 287–294. doi:10.1016/0048-9697(95)04589-s

Wollenzien, U., de Hoog, S., Krumbein, W. & Uijthof, J. (1997). *Sarcinomyces petricola*, a new microcolonial fungus from marble in the Mediterranean basin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71(3), 281–288. doi:10.1023/A:1000157803954

Zanardini, E., Abbruscato, P., Ghedini, N., Readini, M. & Sorlini, C. (2000). Influence of atmospheric pollutants on the biodeterioration of stone. *International biodeterioration and biodegradation*, 45(1-2), 35-42. doi:10.1016/s0964-8305(00)00043-3

Zurita, Y. (2004). *Biodeterioro por microalgas en fuentes de mármol*. (Tesis doctoral). Universidad de Granada, España. Recuperado de <https://hera.ugr.es/tesisugr/1540495x.pdf>