



Universidad de Costa Rica
Sede Rodrigo Facio Brenes
Facultad de Microbiología

Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado de Licenciatura en Microbiología y
Química Clínica

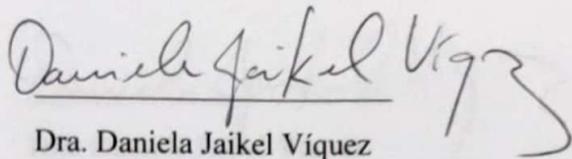
**Caracterización de los hongos aislados de la obra pictórica *La fiesta de la Cabeza* de
Tomás Povedano**

Estudiante:
Luis Carlos Brenes Segura

Carné:
B81293

Junio, 2023

Los que aquí firmamos damos fe que este trabajo posee todas las correcciones indicadas el día de la presentación oral de este Trabajo Final de Graduación:



Dra. Daniela Jaikel Víquez

Tutora



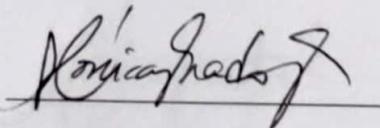
Dr. Mauricio Redondo Solano

Lector



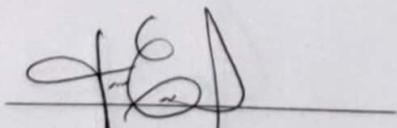
Dr. Óscar Andrey Herrera Sancho

Lector



Dra. Mónica Prado Porras

Presidente del tribunal



Dra. Teresa Escalante Muñoz

Profesor designado

Tabla de contenidos

Objetivos.....	3
Resumen.....	4
Marco teórico	5
Justificación	7
Metodología	8
Resultados	11
Discusión	16
Recomendaciones.....	26
Conclusiones	27
Referencias.....	28

Objetivos

Objetivo general

Determinar el potencial degradativo de hongos aislados de la obra pictórica *La fiesta de la Cabeza* de Tomás Povedano sobre el estado de conservación de la obra.

Objetivos específicos

1. Identificar los hongos aislados de la obra, mediante técnicas fenotípicas y proteómica.
2. Estudiar la capacidad de sobrevivencia de los hongos aislados de la pintura *La fiesta de la Cabeza* en pinturas a base de óleo.

Resumen

Tomás Povedano es mayormente conocido por ser el primer director de la Escuela Nacional de Bellas Artes, hoy conocida como la Facultad de Bellas Artes de la Universidad de Costa Rica; por lo que su aporte a la cultura costarricense no solo es reflejado por sus obras artísticas, sino también por cimentar las bases académicas de muchos artistas costarricenses. Las obras de arte presentes en los museos representan una mirada al pasado de nuestra idiosincrasia y la manera en cómo se ha desarrollado nuestra sociedad a través de los años. A pesar de que los museos son ambientes con condiciones controladas para evitar el deterioro de las obras artísticas, no están completamente exentas de sufrir daños por distintos factores humanos, climáticos, físicos, químicos y microbiológicos. Los hongos son conocidos por su habilidad de deteriorar diversos materiales a través de enzimas, además de dispersarse por el ambiente a través de esporas. Los siguientes hongos fueron aislados a partir de la obra La fiesta de la Cabeza de Tomás Povedano: *Aspergillus* sección *Versicolores*, *Aspergillus* sección *Usti*, *Cladosporium* sp., *Penicillium rubens* y *Candida haemulonii*. Por medio de una exposición de los hongos aislados a los pigmentos blanco de plomo, blanco de zinc, amarillo de cromo y verde viridiano (en distintas diluciones realizadas con aceite de linaza), se demostró que no hubo una inhibición en el crecimiento fúngico. Finalmente, se determinó que el 66 % y el 88 % de hongos aislados del óleo presentan actividad proteolítica y actividad lipolítica, respectivamente. Por lo tanto, se concluye que dichos microorganismos son capaces de sobrevivir y tienen potencial para biodeteriorar la obra.

Marco teórico

La herencia cultural es un recurso invaluable en la formación de la identidad de distintos países, así como una herramienta que le permite al artista expresar sus ideas por medio de esculturas, textiles, libros y pinturas. El deterioro de estas últimas, en específico las pinturas al óleo, se ha asociado a las condiciones climáticas, efectos fisicoquímicos (como la oxidación) que actúan sobre los pigmentos, estabilidad de los materiales utilizados, el estado en que se almacenan las obras, insectos y el papel que poseen microorganismos como bacterias y hongos (Van den Berg *et al.*, 2019).

Los hongos filamentosos provocan un impacto importante en el biodeterioro de las fibras y textiles que se almacenan en interiores, los cuales se ven afectados debido a la enorme diversidad de exoenzimas que producen estos hongos. De estas enzimas se pueden mencionar celulasas, glucanasas, lacasas, fenolasas, queratinasas y monooxigenasas. Las de mayor importancia en cuanto al deterioro de fibras son las celulasas, las cuales degradan el lienzo y la integridad de la obra se ve comprometida (Sterflinger, 2010; Kamel *et al.*, 2014; Gutarowska *et al.*, 2017).

De manera general, los óleos están compuestos por un soporte mecánico (que suele ser madera y lienzo), capas de pintura (usualmente pigmentos y diluyentes óleos) y una capa de cera o pegamento que permite la unión del soporte mecánico a la pintura (Taft & Mayer, 2001; Savković *et al.*, 2021).

Como consecuencia de las actividades hidrolíticas que realizan los hongos para crecer, se puede dar un desprendimiento de la capa de pintura del soporte; además de un incremento de metabolitos destructivos que dañan la obra y la producción de enzimas extracelulares como lipasas y proteasas. Lo anterior conlleva a un deterioro estructural que suele manifestarse como exfoliación de las capas de pintura, agrietamiento, descamación, formación de ampollas en la pintura, desprendimiento de la capa de pintura del soporte, deformaciones y pérdida de resistencia del soporte. También se encuentran ligados a las alteraciones estéticas, que se observan como cambios en la coloración original debido a alteraciones pigmentarias,

la formación de biopelículas sobre la superficie pintada o la tinción como consecuencia de la excreción de pigmentos por hongos (Savković *et al.*, 2021).

Adentrándonos en cuanto al creador de la pintura en estudio, Tomás Povedano de Arcos fue un pintor de origen español, quien nació en 1847. Su infancia la pasó junto a su familia en Andalucía y se interesó en el arte durante su juventud. Dicha predilección lo llevó a tomar la decisión de inscribirse en la Academias de Bellas Artes de Málaga y, posteriormente, en la Academia de Acuarelistas de Sevilla con el fin de mejorar sus habilidades para la creación de bocetos y tener una formación más integral (Barrionuevo & Guardia, 2003). En 1896, mientras realizaba un viaje a México desde Ecuador, Povedano llega a Costa Rica por motivo de una escala previo a su destino en el país norteamericano. Durante su estadía, recibió una invitación de parte del Gobierno de Costa Rica para reunirse con el Presidente de la República, don Rafael Yglesias Castro, quien le solicitó sus servicios para crear la Escuela Nacional de Bellas Artes. El 14 de marzo de 1897 se firma el decreto presidencial de fundación de la Academia y se nombra a Tomás Povedano como su primer director. El 12 de marzo de 1898 esta institución abre sus puertas para recibir estudiantes interesados en adquirir habilidades artísticas. El Sr. Povedano permanece como director hasta 1941, fecha en que la Escuela se integra a la Universidad de Costa Rica y se renombra como Facultad de Bellas Artes (Barrionuevo & Guardia, 2003; Raabe Cercone, 2017).

Entre sus grandes obras, se le reconoce como un excelente retratista (de los que destacan retratos de expresidentes como Braulio Carrillo, Juan Rafael Mora Porras y José María Castro Madriz), óleos sobre telas como *El Arte* y *La Industria* en el Teatro Nacional de Costa Rica y *Domingueando* en el Museo de Arte Costarricense. Además, se sabe que este artista se inspiró en la historia precolombina de Latinoamérica para varias de sus obras, como *La fiesta de la cabeza*, que retrata las costumbres de los indios Jíbaros de Ecuador (Barrionuevo & Guardia, 2003).

Justificación

El arte es un componente fundamental de las sociedades alrededor del mundo. Es una herramienta de libre expresión a través de las distintas épocas para distintos individuos y representa un tesoro de valor incalculable, el cual debe ser preservado bajo condiciones estrictas y tener consciencia del significado sociocultural que posee.

De las distintas formas de arte, se pueden mencionar algunas como la música, la escultura, los textiles, la fotografía y la pintura. De estas últimas, se destacan pinturas al fresco, acuarelas y óleos. Con el paso del tiempo, las pinturas sufren alteraciones fisicoquímicas que afectan su aspecto original y su estructura. A estas alteraciones, se le debe añadir el deterioro provocado por microorganismos; en especial los hongos filamentosos (los cuales pueden dañar las obras de manera irreversible, resultando en una pérdida económica y cultural). Lo anterior es particularmente relevante en el caso de obras artísticas presentes en ambientes tropicales de alta humedad como es el caso de Costa Rica, aunque pocos datos en la literatura refieren el efecto del daño microbiológico bajo estas condiciones.

La intención de este estudio es caracterizar a los hongos aislados de la obra *La fiesta de la Cabeza* de Tomás Povedano, y comprobar si los pigmentos de la pintura presentan algún efecto inhibitorio sobre dichos hongos. Aunado a lo anterior, se desarrolla otro enfoque para que los Museos del Banco Central de Costa Rica consideren los hongos como una fuente importante de desgaste y degradación de obras de arte. Además, se pretende generar datos que permitan la comprensión del fenómeno de deterioro de pinturas con el fin de establecer futuras estrategias de conservación.

Metodología

a) Aislamientos fúngicos de la obra pictórica

Se trabajó con nueve aislamientos fúngicos obtenidos del muestreo de la obra *La fiesta de la cabeza* de Tomás Povedano (proyecto inscrito ante la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, número B7809). A manera de resumen, se determinaron áreas de interés para el muestreo, en el anverso y reverso de la obra, mediante una examinación visual en conjunto con fotografías en espectro visible y ultravioleta. La obra se dividió en un total de 100 cuadrantes, los cuales poseen dimensiones de aproximadamente 10,25 cm por 15,30 cm de ancho y largo, respectivamente. A partir de estos cuadrantes, se seleccionaron las zonas de deterioro e interés y las zonas de control.

b) Identificación y caracterización de los hongos aislados

Se describieron los morfotipos de las colonias fúngicas. Además, se hicieron montajes húmedos, según si eran hongos hialinos (azul de lactofenol) o fuliginosos (lactofenol claro). Lo anterior con el fin de obtener una identificación preliminar y determinar su pureza. Luego, se subcultivaron en agar papa dextrosa (APD) en conjunto con agar avena (hongos filamentosos distintos de *Aspergillus* spp.), en agar Czapek Dox (*Aspergillus* spp.) y en agar Sabouraud glucosado (AGS) para las levaduras (Gross y Salas, 2012).

La identificación a nivel de especie se realizó mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF MS, por sus siglas en inglés), utilizando el Maldi Biotyper® (Bruker, Billerica, MA, EEUU). Los espectros obtenidos fueron analizados utilizando la Biblioteca de Bruker y la plataforma MSI Platform (msi.happy-dev.fr). Cada aislamiento identificado fue almacenado en AGS, bajo una capa de aceite en la Micoteca de la Facultad de Microbiología (proyecto inscrito ante la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, número B7732).

c) Análisis de la exposición de los hongos aislados del anverso de la obra *La fiesta de la cabeza* a los pigmentos

Se analizaron cuatro pigmentos (pinturas en óleo), a saber: amarillo de cromo, blanco de plomo, blanco de zinc y verde viridiano. Primero se prepararon suspensiones de esporas en

solución salina estéril (SSE) al 0,85 %. Se agregó 5 mL de la SSE a cada tubo de cultivo (siete días de incubación). La suspensión se estandarizó a una concentración de $(1-5) \times 10^6$ conidias/mL (equivalente a un McFarland 0,5) mediante el uso de una cámara de conteo celular de Neubauer. Las placas se inocularon con un hisopo estéril, haciendo un rayado en tres direcciones. Seguidamente, se dispensó 50 μ L de distintas concentraciones de los pigmentos: pintura pura, 1/10, 1/20 y 1/40. Las pinturas se diluyeron en aceite de linaza. En el centro de la placa se dispensó 50 μ L de aceite de linaza como control. Las placas con cultivo se incubaron por 72 horas a 25 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se midieron los halos de inhibición. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

d) Determinación del potencial proteolítico y lipolítico de los hongos aislados

Presencia de proteasas: hidrólisis de la caseína

Se realizó una suspensión de esporas a partir de un cultivo con siete días de crecimiento en APD, se ajustó a una concentración de $(1-5) \times 10^6$ conidias/mL, para lo cual se usó una cámara de conteo de Neubauer y luego se colocó 10 μ L de la suspensión en agar caseína (leche descremada en polvo 40,0 g, extracto de levadura 5,0 g, agar al 1,5%, púrpura de bromocresol al 6 %, a pH 7). Las placas inoculadas se incubaron a 25 °C durante siete días. La presencia de proteasas se puso de manifiesto por la formación de un halo claro producto de la degradación de proteínas en el agar caseína, cuyo diámetro fue medido en milímetros. Como control positivo se utilizó a *Candida albicans* ATCC 10231 (*American Type Culture Collection*). La prueba se realizó por triplicado (Ghosh *et al.*, 2002) y el promedio y desviación estándar se determinaron con el programa IBM SPSS Statistics versión 20 (SPSS Inc., Chicago, Ill., Estados Unidos).

Presencia de fosfolipasas

Se realizó una suspensión de esporas a partir de un cultivo con siete días de crecimiento en APD y se ajustó a una concentración de $(1-5) \times 10^6$ conidias/mL, para lo cual se usó una cámara de conteo de Neubauer, luego se colocó 10 μ L de una suspensión en agar yema de huevo (medio de Sabouraud glucosado con NaCl 1 M y CaCl 20,005 M, al cual después de autoclavado se le agregó 2 % de yema de huevo). Las placas inoculadas se incubaron a 25 °C durante siete días. La presencia de fosfolipasas se puso de manifiesto por la formación de

un halo de precipitación, cuyo diámetro fue medido en milímetros. La prueba se realizó por triplicado y el promedio y desviación estándar se determinaron con el programa IBM SPSS Statistics versión 20 (SPSS Inc., Chicago, Ill., Estados Unidos). Como control positivo se utilizó a *C. albicans* ATCC 10231 (Salas *et al.*, 2000; Villalobos-Meléndez *et al.*, 2011; Serrano-Viquez & Salas-Campos, 2012).

Resultados

Identificación y caracterización de los hongos aislados

Se trabajó con nueve aislamientos fúngicos obtenidos del anverso y reverso de la obra *La fiesta de la Cabeza* de Tomás Povedano. La identificación y el sitio de aislamiento se presentan en la figura 1 y en el cuadro 1.

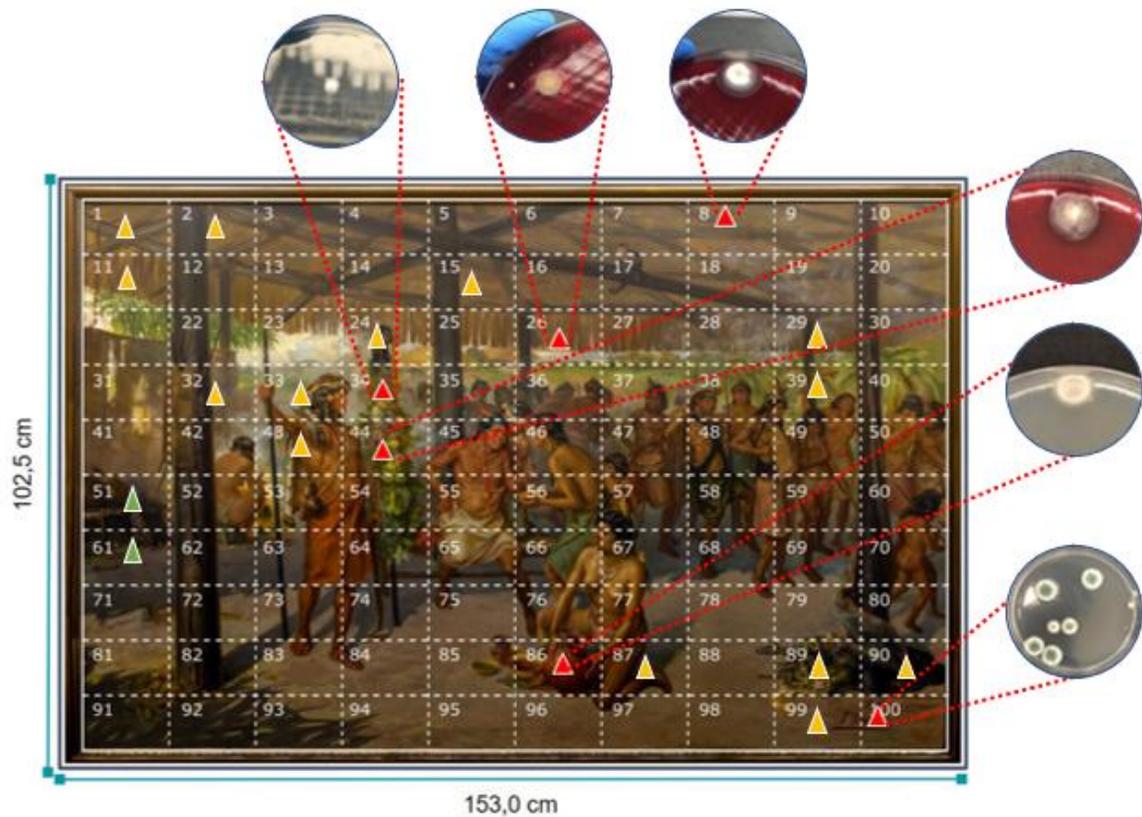


Figura 1. Aislamientos fúngicos obtenidos del anverso de la obra *La fiesta de la cabeza* de Tomás Povedano. Los triángulos rojos muestran los cuadrantes analizados, positivos por colonización fúngica, los triángulos amarillos representan sitios de muestreo negativos para hongos y los triángulos verdes indican el control negativo del muestreo.

Cuadro I. Aislamientos fúngicos obtenidos del anverso y reverso de la obra *La fiesta de la cabeza* de Tomás Povedano.

Cuadrante de muestreo	Detalles de la zona de interés	Aislamiento fúngico
		Identificación
8	Zona inferior derecha del cuadrante. Leve mancha de color café	<i>Aspergillus sydowii</i>
26	Zona de la parte de paja. Mancha de color negro	<i>Cladosporium</i> sp.
34	Zona de las plumas en la vestimenta principal. Área que cuenta con distintos colores y pigmentos de interés.	<i>Aspergillus protuberus</i>
44	Ramo que se encuentra bajo la cabeza. Área que cuenta con distintos colores y pigmentos de interés.	Hongo hialino no identificado
86	Vasija y piel del personaje femenino.	<i>Aspergillus calidoustus</i> <i>Penicillium rubens</i>
100	Firma del autor de la obra	<i>Aspergillus</i> sección <i>Versicolores</i>
Reverso de la obra	Rasguño de la cera protectora	<i>Candida haemulonii</i> <i>Aspergillus</i> sección <i>Versicolores</i>

Análisis de la exposición de los hongos aislados del anverso de la obra *La fiesta de la cabeza* a los pigmentos

Los hongos se expusieron a cuatro pigmentos: blanco de zinc, blanco de plomo, amarillo de cromo y verde viridiano. El crecimiento de los nueve aislamientos analizados no fue inhibido por ninguna de las concentraciones de los pigmentos ni por el aceite de linaza sin diluir (control de crecimiento). En la Figura 2 se presenta el ejemplo del aislamiento de *Aspergillus* sección *Versicolores*, procedente de la firma del autor, donde se observa un crecimiento confluyente en toda la placa de cultivo, sin halos de inhibición. Además, en los acercamientos se observa la degradación de los pigmentos, el aceite de linaza y el agar; inclusive se logra observar micelio creciendo directamente por encima del pigmento puro (Anexos 1-3).

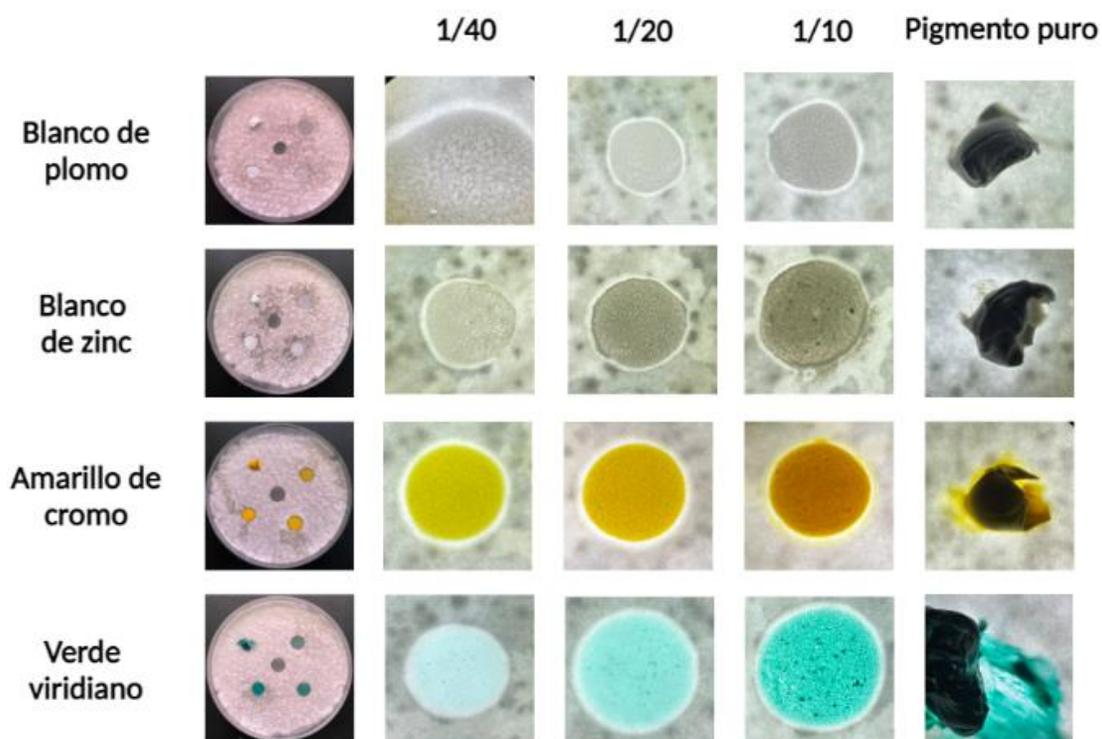


Figura 2. Ejemplo de la utilización de los pigmentos de la obra *La fiesta de la Cabeza* de Tomás Povedano analizados y sus respectivas diluciones para la determinación de la inhibición de crecimiento fúngico (*Aspergillus* sección *Versicolores* aislado de cuadrante 100).

Determinación del potencial proteolítico y lipolítico de los hongos aislados

Se determinó la capacidad proteolítica y lipolítica de los hongos aislados del anverso y el reverso de la obra pictórica. El 66 % de los aislamientos ($n = 6$) expresaron actividad proteolítica (excreción de proteasas), con un promedio de diámetro de halo de $9,17 \pm 6,28$ mm. El 88 % de los aislamientos ($n = 8$) expresaron actividad lipolítica (excreción de lipasas), con un promedio de diámetro de halo de $9,97 \pm 3,38$ mm. El 55 % de los aislamientos presentaban actividad proteolítica y lipolítica en simultáneo ($n = 5$) (Cuadro 2).

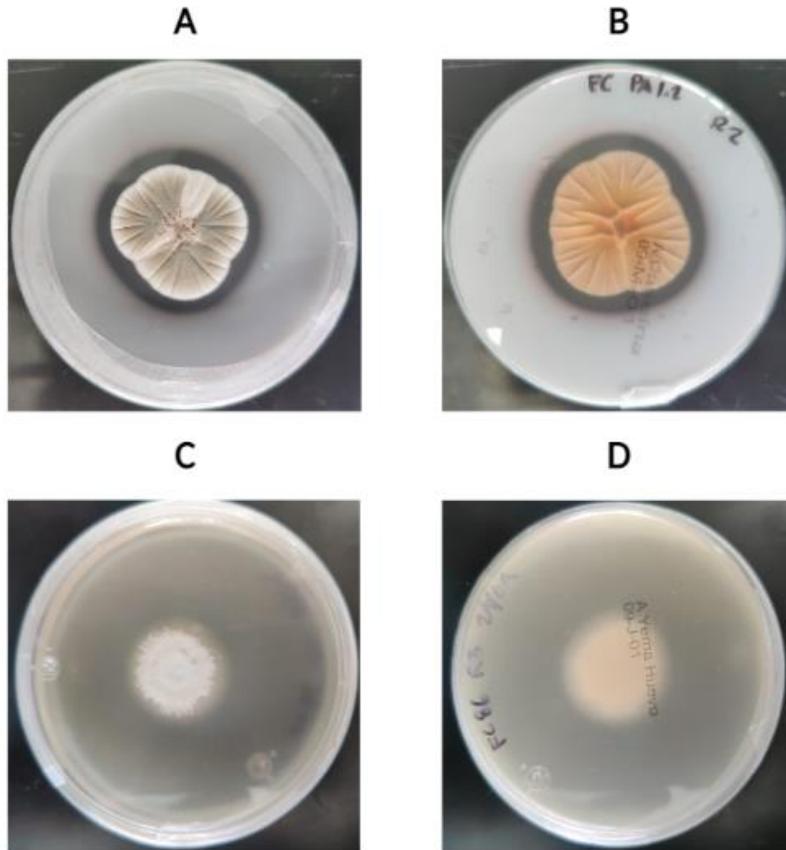


Figura 3. Actividad enzimática de los hongos aislados de la obra La fiesta de la Cabeza de Tomás Povedano. *Aspergillus* sección *Versicolores*, aislado del reverso de la obra, con actividad proteasa en medio caseína (A: anverso de la colonia y B: reverso de la colonia; el halo se observa claro y translúcido) y *Aspergillus calidoustus*, aislado del cuadrante 86 de la obra, con actividad fosfolipasa en medio yema de huevo (C: anverso de la colonia y D: reverso de la colonia; el halo se observa como un precipitado alrededor del hongo).

Cuadro II. Actividad proteolítica y lipolítica de los hongos aislados de la obra *La fiesta de la Cabeza* de Tomás Povedano.

Aislamiento	Crecimiento en agar caseína				Crecimiento en agar yema de huevo			
	Colonia (mm)	Halo (mm)	Diferencia (mm)	Actividad proteasa	Colonia (mm)	Halo (mm)	Diferencia (mm)	Actividad lipasa
Anverso de la obra pictórica								
<i>Aspergillus calidoustus</i>	77,00 ± 2,00	No se observa	No aplica	Negativo	2,67 ± 0,58	32,33 ± 0,58	8,66	Positivo
<i>Aspergillus protuberus</i>	52,00 ± 18,38	64,5 ± 12,02	12,5	Positivo	63,5 ± 2,12	77,00 ± 7,07	13,5	Positivo
<i>Aspergillus sección Versicolores</i>	59,33 ± 11,72	No se observa	No aplica	Negativo	38,67 ± 5,13	52,00 ± 2,65	13,33	Positivo
<i>Aspergillus sydowii</i>	17,33 ± 0,47	20,67 ± 0,47	3,33	Positivo	15,67 ± 0,47	20,00 ± 0,00	4,33	Positivo
<i>Cladosporium</i> sp.	18,00 ± 0,00	No se observa	No aplica	Negativo	12,33 ± 0,47	22,33 ± 0,47	10,00	Positivo
<i>Penicillium rubens</i>	44,00 ± 2,83	50,00 ± 2,83	6	Positivo	37,00 ± 16,09	47,00 ± 18,00	10	Positivo
Hongo hialino no identificado	62,00 ± 14,14	81,50 ± 4,95	19,5	Positivo	36,00 ± 1,00	48,33 ± 2,89	12,33	Positivo
Reverso de la obra pictórica								
<i>Aspergillus sección Versicolores</i>	36,33 ± 2,08	46,67 ± 4,04	10,34	Positivo	38,67 ± 22,37	44,33 ± 21,08	5,66	Positivo
<i>Candida haemulonii</i>	13,67 ± 0,47	17,00 ± 0,00	3,33	Positivo	11,67 ± 0,47	No se observa	No aplica	Negativo

Discusión

Los hongos filamentosos son microorganismos conocidos por deteriorar materiales derivados del papel gracias a su habilidad de crecer a niveles de humedad relativa promedio que suelen ser superiores al 65 %. Las esporas fúngicas pueden germinar en condiciones ambientales de bibliotecas o museos y, al crecer, producen una gama de enzimas líticas, se aumenta la posibilidad de deterioro en distintas obras de arte hechas a base de celulosa (que se encuentra en el lienzo, seda, lana y madera) (Pinheiro & Sequeira, 2021; Romero *et al.*, 2021). Dichas esporas se encuentran en el aire o en el suelo, y es común encontrarlas en la atmósfera. Se debe tomar en cuenta que la creciente población humana y su movimiento a través del planeta han influido en el transporte de estas estructuras de reproducción. Acciones como toser, hablar o estornudar contribuyen al esparcimiento de las esporas, las cuales pueden estar presentes en la piel y ropa. No solo el ser humano y los animales han funcionado como un agente propagante de esporas, si no que las mismas edificaciones también se consideran como una fuente de contaminación al momento de su construcción, remodelación o destrucción. Además, condiciones de poca ventilación, iluminación, temperatura y humedad inciden en el propiciamiento de un área ideal para el crecimiento de hongos filamentosos (Romero *et al.*, 2021).

Durante este estudio se identificaron varios hongos que se han categorizado como agentes con potencial de deterioro de pinturas en óleo. Uno de los grupos más importantes en el deterioro de estas obras es el género *Aspergillus*, de los cuales se lograron aislar organismos de dos secciones: *Aspergillus* sección *Versicolores* y *Aspergillus* sección *Usti*. De las características principales que se pueden mencionar de *Aspergillus* sección *Versicolores*, es que presenta una variación considerable en la apariencia de las colonias dentro de las especies (además de una superposición a nivel macroscópico de las colonias entre ellas); sus colonias crecen moderadamente rápido, y su crecimiento es escaso o nulo a 37 °C en algunas especies. Se caracterizan por presentar conidióforos con vesículas subglobosas o piriformes (< 30 µm), biseriadas, generalmente radiadas, con conidias verdosas de paredes rugosas y generalmente globosas. Debido a que sus características microscópicas y macroscópicas son semejantes, es difícil poder diferenciar entre las distintas especies de esta sección a partir de la

morfología. Sin embargo, las características fenotípicas (como la ornamentación de las conidias, la presencia de pigmentos solubles y la capacidad de crecer a 37 °C de algunas especies) pueden guiar en la identificación de especies de esta sección; empero es preferible realizar la identificación por medio de técnicas moleculares (Jurjevic *et al.*, 2012; Siqueira *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016).

Además de la sección *Versicolores*, otra sección identificada en la obra fue la *Usti*. En la actualidad existen 26 especies de *Aspergillus* pertenecientes a la sección *Usti*. La mayoría de ellas, incluida *A. ustus sensu stricto*, no presentan la capacidad de crecer a 37 °C, por lo que no se consideran patógenos para los seres humanos (Glampedakis *et al.*, 2020). A nivel morfológico, esta sección presenta cabezas aspergilaes de color pardo, marrón opaco o gris oliva; conidióforos marrones, vesículas hemisféricas biseriadas y, si las hay, células de Hülle alargadas, curvas y retorcidas (Sun *et al.*, 2020). Esta sección también es considerada de importancia en el deterioro de pinturas de óleo y otras obras de arte, debido a que estos microorganismos no suelen presentar una estacionalidad marcada; además que es bastante común encontrar conidias en muestreos de aire simultáneamente con aislamientos en pinturas. A pesar de que a los museos se les recomienda poseer condiciones óptimas para asegurar un ambiente apto de conservación para sus colecciones, el mantener condiciones por debajo de un 60 % de humedad relativa no siempre evita procesos de contaminación y contaminación cruzada ni el crecimiento y establecimiento de hongos. El agua se condensa en superficies (a pesar de presentarse humedad relativa baja), por lo que se dan oportunidades de crecimiento para diferentes especies de hongos, ya que no son nutricionalmente exigentes (Paiva de Carvalho *et al.*, 2018).

Las especies de *Aspergillus* son ubicuas y son consideradas de los principales hongos contaminantes del ambiente. Suelen aislarse del aire, tierra, plantas y materia orgánica en descomposición. Algunas especies del género *Aspergillus* están de forma transitoria en diversas zonas del cuerpo como orofaringe, fosas nasales, piel, saco lagrimal, oído y tubo gastrointestinal (Bonifaz, 2012). También, se ha logrado aislar a *Aspergillus* de óleos y murales, en los que se les atribuye como uno de los principales agentes en el biodeterioro y pérdida invaluable de estas obras (Vukojevic & Grbic, 2010; Ljaljević-Grbić *et al.*, 2013).

Es importante recalcar que los hongos del género *Aspergillus* son productores de conidias, que son estructuras microscópicas con una alta tolerancia al estrés. Precisamente debido a sus características, las conidias poseen la habilidad de sobrevivir en condiciones desfavorables como lo son el estrés térmico, la deshidratación, la presión osmótica, el estrés oxidativo, las variaciones de pH y los rayos ultravioleta. Estas conidias pueden germinar incluso después de un año a temperatura ambiente. Las conidias contienen cantidades de azúcares y polioles como glicerol, eritritol o trehalosa, que se forman con una actividad del agua (a_w) decreciente. Dichos compuestos son producidos para la osmorregulación cuando los hongos se encuentran una a_w baja. Si las conidias presentan de estas reservas de azúcares aumentadas, estas tendrán una mayor viabilidad y una germinación acelerada (van Laarhoven *et al.*, 2017). Al presentarse en un ambiente con sales inorgánicas, azúcares y aminoácidos, germinarían para la formación del micelio (Osherov & May, 2001).

Según Baltussen *et al.* (2019), hay varios elementos que confieren resistencia a las conidias de *Aspergillus*. Por ejemplo, el daño provocado por el estrés térmico es controlado por las proteínas de choque térmico, la trehalosa y el manitol. La deshidratación y desecación son contrarrestadas gracias a la acción de las proteínas de choque térmico, la trehalosa y las deshidrinas. Finalmente, el efecto del estrés oxidativo se ve disminuido por el manitol y la trehalosa.

Además de *Aspergillus*, durante este estudio se lograron aislar hongos del género *Cladosporium*. Estos se caracterizan por presentar una colonia de aspecto seca, verduzca, plana, aterciopelada y con algunos surcos. En el anverso se tiene una colonia de gran tamaño que puede cubrir todo el medio de cultivo, y en el reverso presenta una pigmentación negra difusa en el medio. En un plano microscópico, se observa un hongo filamentosos, fuliginoso, cuyo micelio tiene de 2 a 4 μm de diámetro y es septado. *Cladosporium* presenta un conidióforo ramificado corto, durante su fase reproductiva asexual; mientras que en la fase reproductiva sexual algunas especies pueden producir ascosporas a partir de un ascocarpo (Bonifaz Trujillo, 2012).

Las especies de *Cladosporium* son cosmopolitas y se suelen encontrar comúnmente en todo tipo de materiales; además se aíslan con frecuencia del suelo, los alimentos, la pintura, los textiles y otras materias orgánicas (Bensch *et al.*, 2012). Otro elemento que favorece la dispersión de *Cladosporium*, y una de las razones por las que se cree que se halló este microorganismo en la pintura, es que sus esporas son livianas y pequeñas. Lo expuesto previamente les permite a las esporas viajar distancias tan largas como las corrientes de aire se lo permitan.

Otro de los microorganismos hallados en el presente trabajo fue *Penicillium rubens*, el cual pertenece a la sección *Chrysogena*. El género *Penicillium* posee a nivel macroscópico colonias planas, polvosas y aterciopeladas, con un color verde y un halo blanquecino en la periferia. Al igual que los hongos del género *Cladosporium*, presenta crecimiento rápido en el medio de cultivo (Bonifaz Trujillo, 2012). Las especies comparten caracteres fenotípicos, como la producción de conidióforos ramificados terverticilado o cuartoverticilados y fiálides ampuliformes cortas ($< 9 \mu\text{m}$). Los colores y ornamentación de las conidias, la producción del ascoma y las ascosporas, y las tasas de crecimiento en otros medios de agar, como agar Czapek-Dox y agar Malta, son valiosos para la identificación de las especies (Houbraken *et al.*, 2012; Visagie *et al.*, 2014).

P. rubens es actualmente reconocido como el hongo que Alexander Fleming identificó como el productor original de la penicilina (Houbraken *et al.*, 2011). Sus colonias son de crecimiento rápido, presentan una textura velutinosa (compacta, fina y blanda), los estipes de conidióforos generalmente son terverticilado o cuartoverticilados, sus fiálides son relativamente cortas ($< 9 \mu\text{m}$), y sus conidias se caracterizan por disponer de paredes lisas y elipsoidales (Houbraken *et al.*, 2012; Houbraken *et al.*, 2020). Son hongos que suelen encontrarse en ambientes interiores, causando daños a la infraestructura (Segers *et al.*, 2016).

En cuanto a las conidias de *P. rubens* se debe mencionar que, como la mayoría de las formas de resistencia, la relación entre el agua y el crecimiento de hongos a menudo se realizan en condiciones de humedad constante. Por lo que, a una menor disponibilidad de agua, se da un mayor tiempo de germinación y una menor tasa de crecimiento (Ruijten *et al.*, 2021).

Respecto al hallazgo de *Cladosporium* sp., *P. rubens* y *Aspergillus* spp., se relaciona a que en nuestro país son los géneros más comunes de encontrar al realizar muestreos aéreos ambientales (Jaikel-Viquez *et al.*, 2015; Brizuela-Hernández *et al.*, 2019; Calderón-Mesén *et al.*, 2023). El género *Cladosporium* es de los principales componentes de la micobiota aérea en varias regiones del mundo. Su crecimiento, esporulación y dispersión son dependientes de los cambios en el clima. Aunado a lo anterior, se ha logrado demostrar que existen varios factores climáticos que favorecen la esporulación; de los más importantes son las altas temperaturas, la humedad relativa y la lluvia antes de la diseminación de las esporas (Rodríguez-Rajo *et al.*, 2005; Jaikel-Viquez *et al.*, 2015; Brizuela-Hernández *et al.*, 2019; Calderón-Mesén *et al.*, 2023). Además, los tres géneros mencionados anteriormente, suelen identificarse con mayor frecuencia en obras de arte (Sterflinger, 2010; Gatti *et al.*, 2021; Văcar *et al.*, 2022) y se les considera como los principales asociados al deterioro de textiles, por lo que son agentes importantes para tomar en cuenta (Jose *et al.*, 2023).

Como se ha desarrollado en los párrafos anteriores, *Cladosporium* sp., *P. rubens* y *Aspergillus* spp. son microorganismos ubicuos, sus esporas pueden permanecer suspendidas en el ambiente, y son transportadas por corrientes de aire producidas por el movimiento de personas de un lugar a otro, por ejemplo, los visitantes de un museo. Además, otro factor que influye en el hallazgo de estos hongos, es que cuando la pintura se transporta a oficinas u otros lugares de exhibición, se pueden captar esporas en la superficie de la pintura (Paiva de Carvalho *et al.*, 2018; Savković *et al.*, 2021).

En el reverso de la obra se aisló una levadura, la cual se identificó como *C. haemulonii*. Es importante mencionar que, durante este trabajo, se hablará del complejo *C. haemulonii* y no como una sola especie. El complejo *C. haemulonii* (el cual incluye *C. haemulonii*, *Candida duobushaemulonii*, *Candida pseudohaemulonii* y *Candida vulturna*) está muy relacionado con *Candida auris*, por lo que, a veces, suelen ser identificadas incorrectamente como *C. auris*. Esto suele suceder en laboratorios que no poseen los recursos ni las herramientas moleculares como la secuenciación o la tecnología de MALDI TOF MS. Dichas limitaciones provocan la sub-identificación de las levaduras mencionadas anteriormente, por lo que

actualmente se están realizando esfuerzos para no solo abarcar la identificación genómica de estas especies, sino una comprensión analítica de los perfiles de resistencia que están adquiriendo con el tiempo (Sipiczki & Tap, 2016; Araúz *et al.*, 2018). Además, es un grupo de hongos que presenta un perfil de multi-resistencia a los antifúngicos (Ramos *et al.*, 2015). Al igual que *C. auris*, *C. haemulonii* produce blastosporas globosas, ovoides y elipsoidales, con medidas de (2-7) μm de largo y pueden encontrarse de forma individual o en pares. La mayoría de los aislamientos conocidos son de origen clínico y, en particular, de uñas de los pies y úlceras en pies y piernas; además que se considera como parte de la microbiota cutánea (Kurtzman *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2017).

Cabe destacar, que la presencia de este hongo en el reverso de la pintura pudo haberse dado por un “rasguño” que afectó la capa de cera protectora del reverso de la obra de arte. Este dato nos indica que la persona que estaba manipulando la pintura, estaba trabajando sin guantes o alguna medida de seguridad; ya que los hongos del complejo *C. haemulonii* se encuentran en la piel y en las uñas. Sumado a lo anterior, su capacidad de formar biopelículas y adherirse a otros sustratos, le permitió crecer en esta zona (Ramos *et al.*, 2020).

En general, las pinturas al óleo sobre lienzo proveen una gama mucho más amplia de microhábitats y nutrientes, los cuales son objetos potencialmente colonizables por hongos. Varios de los materiales que componen una pintura al óleo, presentan una diversidad de moléculas orgánicas con un alto contenido nutricional que pueden ser degradados fácilmente por las enzimas de los hongos (Savković *et al.*, 2021). Al momento de realizar un análisis de deterioro microbiológico en pinturas, se debe considerar que; por lo general, es más probable que el deterioro se presente en el soporte antes que en la capa de pintura. La colonización de la pintura por parte de hongos se rige por varios aspectos, además de los que suelen considerarse óptimos para el crecimiento de dichos microorganismos. Tanto la edad de la pintura como el estado físico del aceite secante son factores determinantes. La dureza de la capa de pintura en las pinturas al óleo es dada por la capacidad de estas de absorber gran cantidad de agua, lo que se convierte en otra característica a tomar en cuenta (Eveleigh, 1961).

Otros elementos que influyen en el desarrollo de los hongos y el biodeterioro que estos causan son las características topográficas de la superficie de la obra y la superficie de las esporas. Por ejemplo, si la obra presenta zonas con trazos que le brindan aspereza a la superficie, es más probable que una espora fúngica se fije y se retenga en esta que en una superficie más lisa. En cuanto a las esporas, si estas son lisas tienen menos oportunidad de unirse al sustrato que una espora rugosa o equinulada. Además, se debe tomar en cuenta que un mayor tiempo de exposición de la obra hacia las esporas incide directamente en si se da el crecimiento de hongos. Precisamente, la remoción de esporas es más difícil (o es necesario aplicar una mayor fuerza física) si estas han estado adheridas a una superficie por mayor tiempo respecto a otras (Whitehead *et al.*, 2021).

Con los factores discutidos anteriormente, el hallazgo de los hongos aislados de la obra si son congruentes a lo que se esperaría encontrar en esta clase de estudio. Se debe recalcar que *Aspergillus* spp. *P. rubens* y *Cladosporium* son hongos ubicuos y es bastante común encontrar conidias de estos en el aire. Considerando que un óleo presenta zonas ásperas por los trazos de pintura que se realizan, es muy probable que conidias (las cuales sus ornamentaciones son variables entre especies) se posen sobre la obra.

En este trabajo, se utilizó aceite de linaza como diluyente de los pigmentos. Este es un aceite secante, que se extrae de la semilla de lino (*Linum usitatissimum*). El lino ha formado parte de la cultura humana desde la Edad de Piedra, y se suele cultivar principalmente para producir fibras. Generalmente, se ha cultivado en países bálticos, Canadá, Estados Unidos de América, Argentina, India y Europa central. Esta semilla contiene de un 32 a 43 % de aceite y sus principales ácidos grasos son el ácido linoleico y el ácido linolénico. El aceite de linaza se ha utilizado como materia prima para pinturas, además de que se siembra también con propósito alimenticio. Cabe resaltar que las capas de aceite de linaza son estables al agua y otros agentes; sin embargo, no son lo suficientemente estables a la luz y se amarillenta (Jhala & Hall, 2010).

El aceite de linaza suele verse afectado durante su producción y almacenamiento por hongos los cuales, a través de lipasas, degradan este sustrato para obtener compuestos necesarios

para su crecimiento (Mondal & Nandi, 1984). El aceite de linaza utilizado como diluyente en pinturas más viejas puede ser degradados por hongos con enzimas esterases (Zabel & Morrell, 2020). En este estudio se observó que conforme se aumentó la dilución del pigmento (mayor cantidad de aceite), el hongo tuvo mayor capacidad de asimilar los componentes orgánicos del óleo, ya que los componentes inorgánicos (los pigmentos) no suelen ser de interés para el hongo.

También, se han realizado estudios que demuestran que el uso de aceite de linaza en materiales como madera, previenen el deterioro y alarga la vida útil de esta. Por lo que al adicionar un pigmento que presenta algún metal pesado, se evita en alguna medida el deterioro provocado por microorganismos. Sin embargo, esta protección no es tan eficaz si la pintura presenta algún daño físico que haya comprometido su integridad, porque al exponerse una capa de soporte, se da oportunidad a los hongos a colonizar un sustrato que es permisible para estos, como lo es el lienzo. Además, se ha comprobado que varios de los géneros aislado en la obra, producen lipasas que degradan el aceite de linaza; por lo que no se ve reflejada la protección de este compuesto (Figura 3) (Terziev & Panov, 2010; Humar & Lesar, 2013).

Un 66 % de los hongos aislados presentaron actividad proteasa que se observa con el agar caseína, el cual determina la presencia de proteasas de manera inespecífica; por lo que no se puede identificar la clase de proteasas de los hongos que resultaron positivos (Figura 3). El lienzo es degradado por la acción de celulasas y proteasas, que en combinación provocan una extracción de la pectina (específicamente de la ramnosa) (Panouillé *et al.*, 2006).

Debido a la naturaleza de los pigmentos utilizados en este estudio (los cuales presentan metales pesados como zinc, plomo y cromo en su composición), se esperaría que se presente una mayor resistencia a la biodegradación. En pinturas con pigmentos que contienen metales pesados es más probable hallar poblaciones fúngicas menos densas que en pinturas con pigmentos sin metales pesados (Dhawan & Agrawal, 1986; Savković *et al.*, 2021).

El blanco de zinc está compuesto por óxido de zinc (II), el cual forma partículas translúcidas incoloras a transparentes o de un color amarillo pálido (Eastaugh *et al.*, 2008). Este pigmento es estable a la luz, no presenta decoloración ante este factor, por lo que no se considera como causante de deterioro. Además, presenta una leve capacidad antimicrobiana que puede inhibir el crecimiento de algunos hongos y bacterias (Kühn, 1986). Precisamente, en los últimos años ha emergido el uso de nanopartículas de óxido de zinc (II) como un método que evita el crecimiento fúngico. Esto se da a través de una producción de especies reactivas de oxígeno, que deriva en un efecto fungistático y fungicida (Lipovsky *et al.*, 2011; Esparza-Rivera *et al.*, 2014). La razón que podría explicar porque no se presentaba una inhibición del crecimiento de los hongos utilizados en este estudio, es que no se ha demostrado que el óxido de zinc (II) refleje su actividad antifúngica ante esporas.

Por otro lado, el blanco de plomo es considerado uno de los pigmentos más importantes en Europa desde el periodo romano. A pesar de que a través de los años han surgido muchos pigmentos derivados del blanco de plomo, que ha causado confusión en la comunidad artística, la composición química del pigmento original es $2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$. Es considerado un pigmento insoluble en agua, permanente y estable (Eastaugh *et al.*, 2008). En el caso del amarillo de cromo este es producido al combinarse el ion cromato (CrO_4^{2-}) con distintos metales pesados que forman PbCrO_4 y $\text{PbCrO}_4 \cdot \text{PbSO}_4$. Estos pigmentos son insolubles en agua y en ácidos débiles (como el ácido acético); sin embargo, se logran disolver con sustancias alcalinas o ácidos minerales (Kühn & Curran, 1986).

El verde viridiano está compuesto por óxido de cromo hidratado ($\text{Cr}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Se caracteriza por ser un verde brillante; el cual, durante el siglo XX, presentaba un precio de tres a cuatro veces más caro respecto a otros pigmentos de tonalidades verdes. De ser preparado adecuadamente, este pigmento puede ser resistente a sustancias alcalinas y ácidas, además de ser insoluble en agua. Sin embargo, puede verse afectado por ácidos concentrados calientes si el proceso de preparación no fue el correcto (Newman, 1997).

Koestler y colaboradores (1993) realizaron un estudio en el que analizaron blanco de plomo, blanco de zinc y verde viridiano, en conjunto con fungicidas comerciales (como amonios

cuaternarios, ortofenilfenol, fluoruro de sulfurilo y nitrógeno gaseoso). El objetivo de este estudio consistía en determinar la capacidad fungicida de estos productos, y observar un posible efecto sinérgico junto a los pigmentos. Sin embargo, hubo cambios de brillo y del color de los pigmentos debido al uso de estos fungicidas, excepto el nitrógeno gaseoso. De acuerdo a lo anterior, estos fungicidas comerciales no se consideran como una alternativa viable para el mantenimiento de las pinturas, ya que se da un deterioro físico de los pigmentos. Además, no se ha logrado demostrar que estos pigmentos presenten una actividad inhibitoria en el crecimiento de hongos filamentosos.

Según Petushkova y Lyalikova (1986), microorganismos heterótrofos presentan la capacidad de oxidar metales por medio del peróxido de hidrógeno que dichos microorganismos producen. De esta manera, logran deshacerse de este metabolito que suele ser dañino para bacterias y hongos. El pigmento con el que se trabajó durante dicho estudio fue el blanco de plomo (que se ha mencionado anteriormente es $2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$), el cual se llega a oxidar por medio de reacciones redox. Además de la oxidación, la conversión de otros compuestos de plomo es posible; a través de otras reacciones se puede llegar a sulfuro de plomo (lo cual se observa como oscurecimiento del pigmento).

Un estudio realizado por Rosado *et al.* (2015) señala que luego de realizar un muestreo de distintas áreas de distintos murales, se lograron aislar hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Cladosporium*. Estas áreas presentaban alteraciones cromáticas como oscurecimiento de pigmento. Se ha descrito que los hongos pueden disolver Pb_3O_4 (también conocido como el pigmento rojo de plomo), provocando la acumulación de iones Pb^{2+} y darse una recristalización de iones Pb^{4+} en plattnerita (un mineral oscuro). No se puede garantizar que el deterioro se le puede atribuir por completo a dichos hongos; sin embargo, en conjunto a otros factores, estos géneros se cree que contribuyen al daño que sufre la obra.

Recomendaciones

No es tan sencillo tener un ambiente completamente estéril y controlado que evite la persistencia de hongos que dañen óleos; sin embargo, se pueden tomar medidas y acciones para evaluar cuál es el riesgo que se presenta. Los monitoreos ambientales de rutina pueden brindar un panorama más amplio de lo que circula en las áreas aledañas a la pintura. Aunque no sea la técnica más sensible ni expresa la cantidad de microorganismos obtenidos por volumen de aire, sigue siendo útil para planificar medidas de contingencia.

El hallazgo de un microorganismo como *Candida haemulonii*, el cual es indicador de manipulación incorrecta de la pintura, indica que la utilización de mascarillas y guantes desechables son medidas recomendadas al momento de trabajar en zonas cercanas a la pintura, o si se muestrea la misma directamente. En conjunto a la persona encargada de la curaduría, se debe procurar que las acciones a tomar eviten cualquier tipo de daño que afecte a la pintura. Por lo que se deben hacer uso de productos que hayan sido manufacturados para trabajar en este tipo de materiales (Jose *et al.*, 2023).

Conclusiones

Se podría pensar que el deterioro presente en la pintura podría ser provocado por los hongos aislados de la misma. Lo anterior es dado en parte por la producción enzimática, específicamente, lipasas y proteasas. Estas enzimas actúan directamente sobre el soporte de la pintura y los pigmentos, por lo que podrían provocar un deterioro en la estructura y en la imagen del óleo.

Sin embargo, no se debe considerar como los responsables del deterioro que sufre la pintura, o al menos no el único factor responsable. Hay que considerar que una combinación de factores ambientales, físicos, químicos, humanos y microbiológicos son los que derivan en el daño de obras pictóricas.

Referencias

- Araúz, A. B., Caceres, D. H., Santiago, E., Armstrong, P., Arosemena, S., Ramos, C., Espinosa-Bode, A., Borace, J., Hayer, L., Cedeño, I., Jackson, B. R., Sosa, N., Berkow, E. L., Lockhart, S. R., Rodriguez-French, A., & Chiller, T. (2018). Isolation of *Candida auris* from 9 patients in Central America: Importance of accurate diagnosis and susceptibility testing. *Mycoses*, 61(1), 44-47. <https://doi.org/10.1111/myc.12709>
- Baltussen Tim J. H., Zoll Jan, Verweij Paul E., & Melchers Willem J. G. (2019). Molecular Mechanisms of Conidial Germination in *Aspergillus* spp. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(1), e00049-19. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00049-19>
- Barrionuevo, F., & Guardia, M. E. (2003). *Tomás Povedano* (1.^a ed.). Editorial Universidad de Costa Rica.
- Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2012). The genus *Cladosporium*. *The genus*, 72, 1-401. <https://doi.org/10.3114/sim0003>
- Berner, M., Wanner, G., & Lubitz, W. (1997). A comparative study of the fungal flora present in medieval wall paintings in the chapel of the castle Herberstein and in the parish church of St Georgen in Styria, Austria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 40(1), 53-61. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(97\)00062-0](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(97)00062-0)
- Bonifaz Trujillo, J. A. (2012). *Micología médica básica* (4.^a ed.). Mc Graw Hill.
- Brizuela-Hernández, M., Jaikel-Viquez, D., Riggioni-Cordero, O., Escalante-Martínez, A., & Gross, N. (2019). Analysis of the seasonal variations of the concentration of air functional spores in the external space of the school of microbiology of the university of Costa Rica. *Acta Scientific Microbiology*, 2(10), 35-42.
- Calderón-Mesén, P., Jaikel-Viquez, D., Barrantes-Madrigal, M. D., Sánchez-Solís, J., Mena-Vega, J. P., Arguedas-Molina, J., Ureña-Alvarado, K., Maynard-Hernández, G., Santamaría-Montero, L., Cob-Delgado, M., Angulo-Pardo, E., Vallejo, F., Sandoval, M. I., Durán-Quesada, A. M., Redondo-Solano, M., & Herrera-Sancho, O. A. (2023). Multidisciplinary approach to the study of large-format oil paintings. *Scientific Reports*, 13(1), 2143. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28777-9>

- Cantón, E., Martín, E., & Espinel-Ingroff, A. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Revista Iberoamericana de Micología*, 15(1).
- Chen, A. J., Frisvad, J. C., Sun, B. D., Varga, J., Kocsubé, S., Dijksterhuis, J., Kim, D. H., Hong, S.-B., Houbraken, J., & Samson, R. A. (2016). *Aspergillus* section *Nidulantes* (formerly *Emericella*): Polyphasic taxonomy, chemistry and biology. *Diversity and taxonomy of Indoor Fungi 1*, 84, 1-118. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.10.001>
- Dhawan, S., & Agrawal, O. (1986). Fungal flora of miniature paper paintings and lithographs. *International biodeterioration*, 22(2), 95-99.
- Eastaugh, N., Walsh, V., Chaplin, T., & Siddall, R. (2008). *Pigment Compendium: A Dictionary and Optical Microscopy of Historical Pigments*. Butterworth-Heinemann.
- Gatti, L., Troiano, F., Vacchini, V., Cappitelli, F., & Balloi, A. (2021). An In Vitro Evaluation of the Biocidal Effect of Oregano and Cloves' Volatile Compounds against Microorganisms Colonizing an Oil Painting—A Pioneer Study. *Applied Sciences*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/app11010078>
- Glampedakis, E., Erard, V., & Lamoth, F. (2020). Clinical Relevance and Characteristics of *Aspergillus calidoustus* and Other *Aspergillus* Species of Section *Usti*. *Journal of Fungi*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/jof6020084>
- Gross, N. T., & Salas-Campos, I. (2012). Métodos de diagnósticos en micología médica. *San José: Editorial Universidad de Costa Rica*.
- Guglielminetti, M., De Giuli Morghen, C., Radaelli, A., Bistoni, F., Carruba, G., Spera, G., & Caretta, G. (1994). Mycological and ultrastructural studies to evaluate biodeterioration of mural paintings. Detection of fungi and mites in Frescos of the monastery of St Damian in Assisi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 33(3), 269-283. [https://doi.org/10.1016/0964-8305\(94\)90066-3](https://doi.org/10.1016/0964-8305(94)90066-3)
- Gutarowska, B., Pietrzak, K., Machnowski, W., & Milczarek, J. M. (2017). Historical textiles – a review of microbial deterioration analysis and disinfection methods. *Textile Research Journal*, 87(19), 2388-2406. <https://doi.org/10.1177/0040517516669076>
- Houbraken, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus*, 2(1), 87-95. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.01.12>

- Houbraken, J., Frisvad, J. C., Seifert, K., Overy, D. P., Tuthill, D., Valdez, J., & Samson, R. (2012). New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section *Chrysogena*. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 29(1), 78-100.
- Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C. M., Yilmaz, N., Wang, X.-C., Meijer, M., Kraak, B., Hubka, V., Bensch, K., Samson, R. A., & Frisvad, J. C. (2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Genera of Hyphomycetes: a Tribute to Keith A. Seifert*, 95, 5-169. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002>
- Humar, M., & Lesar, B. (2013). Efficacy of linseed- and tung-oil-treated wood against wood-decay fungi and water uptake. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 223-227. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.07.011>
- Jaikel-Viquez, D., Hernández-Vargas, S., Riggioni-Cordero, O., Salas-Campos, I., & Gross-Martínez, N. (2015). Contaminación fúngica ambiental en tres centros de enseñanza primaria del cantón Central de la provincia de Heredia, Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, 57, 137-142.
- Jhala, A. J., & Hall, L. M. (2010). Flax (*Linum usitatissimum* L.): Current uses and future applications. *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, 4(9), 4304-4312.
- Jose, S., Thomas, S., Pandit, P., & Pandey, R. (2023). *Handbook of Museum Textiles, Volume 2: Scientific and Technological Research*. John Wiley & Sons.
- Jose, S., Thomas, S., Pandit, P., Pandey, R., & Gupta, V. (2023). *Handbook of Museum Textiles, Volume 1: Conservation and Cultural Research*. John Wiley & Sons.
- Jurjevic, Z., Peterson, S. W., & Horn, B. W. (2012). *Aspergillus* section *Versicolores*: Nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. *IMA Fungus*, 3(1), 59-79. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2012.03.01.07>
- Koestler, R. J., Parreira, E., Santoro, E. D., & Noble, P. (1993). Visual effects of selected biocides on easel painting materials. *Studies in Conservation*, 38(4), 265-273. <https://doi.org/10.1179/sic.1993.38.4.265>
- Kühn, H. (1986). *Artists' Pigments: A Handbook of Their History and Characteristics* (R. L. Feller, Ed.; Vol. 1). Publishing Office of National Gallery of Art.
- Kühn, H., & Curran, M. (1986). *Artists' Pigments: A Handbook of Their History and Characteristics* (R. L. Feller, Ed.; Vol. 1). Publishing Officer of National Gallery of Art.

- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). *The Yeasts: A Taxonomic Study* (Quinta edición, Vol. 1).
- Ljaljević-Grbić, M., Stupar, M., Vukojević, J., Maričić, I., & Bungur, N. (2013). Molds in museum environments: Biodeterioration of art photographs and wooden sculptures. *Archives of Biological Sciences*, 65(3), 955-962.
- Newman, R. (1997). *Artists' Pigments: A Handbook of Their History and Characteristics* (E. West Fitzhugh, Ed.; Vol. 3). Publishing Office of National Gallery of Art.
- Oshero, N., & May, G. S. (2001). The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiology Letters*, 199(2), 153-160. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10667.x>
- Paiva de Carvalho, H., Mesquita, N., Trovão, J., Fernández Rodríguez, S., Pinheiro, A. C., Gomes, V., Alcoforado, A., Gil, F., & Portugal, A. (2018). Fungal contamination of paintings and wooden sculptures inside the storage room of a museum: Are current norms and reference values adequate? *Technoheritage* 2017, 34, 268-276. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2018.05.001>
- Panouillé, Maud, Thibault, J.-F., & Bonnin, E. (2006). Cellulase and Protease Preparations Can Extract Pectins from Various Plant Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8926-8935. <https://doi.org/10.1021/jf0617824>
- Petushkova, J. P., & Lyalikova, N. N. (1986). Microbiological degradation of lead-containing pigments in mural paintings. *Studies in Conservation*, 31(2), 65-69. <https://doi.org/10.1179/sic.1986.31.2.65>
- Pinheiro, A. C., & Sequeira, S. (2021). Mycological Studies in Cultural Heritage. En Ó. Zaragoza & A. Casadevall (Eds.), *Encyclopedia of Mycology* (pp. 27-39). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21003-0>
- Raabe Cercone, L. (2017). Una academia de bellas artes en Costa Rica: Modernidad, nación y género (1897-1914). En E. García Buchard (Ed.), *Imaginario de la nación y la ciudadanía en Centroamérica* (1.^a ed.). Editorial Universidad de Costa Rica.
- Ramos, L. S., Figueiredo-Carvalho, M. H. G., Barbedo, L. S., Ziccardi, M., Chaves, A. L., Zancopé-Oliveira, R. M., Pinto, M. R., Sgarbi, D. B., Dornelas-Ribeiro, M., & Branquinha, M. H. (2015). *Candida haemulonii* complex: Species identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(1), 111-115.

- Ramos, L. S., Mello, T. P., Branquinha, M. H., & Santos, A. L. (2020). Biofilm formed by *Candida haemulonii* species complex: Structural analysis and extracellular matrix composition. *Journal of Fungi*, 6(2), 46.
- Ramos, L. S., Oliveira, S. S. C., Souto, X. M., Branquinha, M. H., & Santos, A. L. S. (2017). Planktonic growth and biofilm formation profiles in *Candida haemulonii* species complex. *Medical Mycology*, 55(7), 785-789. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx005>
- Rodríguez-Rajo, F. J., Iglesias, I., & Jato, V. (2005). Variation assessment of airborne *Alternaria* and *Cladosporium* spores at different bioclimatical conditions. *Mycological Research*, 109(4), 497-507. Cambridge Core. <https://doi.org/10.1017/S0953756204001777>
- Romero, S. M., Giudicessi, S. L., & Vitale, R. G. (2021). Is the fungus *Aspergillus* a threat to cultural heritage? *Journal of Cultural Heritage*, 51, 107-124. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2021.08.002>
- Rosado, T., Gil, M., Mirão, J., Candeias, A., & Caldeira, A. T. (2016). Darkening on lead-based pigments: Microbiological contribution. *Color Research & Application*, 41(3), 294-298. <https://doi.org/10.1002/col.22014>
- Ruijten, P., Huinink, H. P., & Adan, O. C. G. (2021). Hyphal growth of *Penicillium rubens* in changing relative humidity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(12), 5159-5171. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11343-6>
- Sabatini, L., Sisti, M., & Campana, R. (2018). Evaluation of fungal community involved in the biodeterioration process of wooden artworks and canvases in Montefeltro area (Marche, Italy). *Microbiological research*, 207, 203-210.
- Savković, Ž., Stupar, M., Unković, N., Knežević, A., Vukojević, J., & Ljaljević Grbić, M. (2021). Fungal Deterioration of Cultural Heritage Objects. En K. Ferreira Mendes, R. Nogueira de Sousa, & K. Cabral Mielke (Eds.), *Biodegradation Technology of Organic and Inorganic Pollutants* (p. Ch. 15). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.98620>
- Segers, F. J., van Laarhoven, K. A., Huinink, H. P., Adan, O. C., Wösten, H. A., & Dijksterhuis, J. (2016). The indoor fungus *Cladosporium halotolerans* survives humidity dynamics markedly better than *Aspergillus niger* and *Penicillium rubens* despite less growth at lowered steady-state water activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17), 5089-5098.
- Sipiczki, M., & Tap, R. M. (2016). *Candida vulturna* pro tempore sp. Nov., a dimorphic yeast species related to the *Candida haemulonii* species complex isolated from flowers and clinical

- sample. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(10), 4009-4015.
- Siqueira, J. P. Z., Sutton, D. A., García, D., Gené, J., Thomson, P., Wiederhold, N., & Guarro, J. (2016). Species diversity of *Aspergillus* section *Versicolores* in clinical samples and antifungal susceptibility. *Integrative Taxonomy - Uncovering Fungal Diversity*, 120(11), 1458-1467. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.02.006>
- Sterflinger, K. (2010). Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal Biology Reviews*, 24(1), 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2010.03.003>
- Sun, B. D., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Jiang, X. Z., Chen, A. J., & Samson, R. A. (2020). New species in *Aspergillus* section *Usti* and an overview of *Aspergillus* section *Cavernicolarum*. *En International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (Vol. 70, Número 10, pp. 5401-5416). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004425>
- Taft, W. S., & Mayer, J. W. (2001). The science of paintings. *Measurement Science and Technology*, 12(5), 653-653.
- Terziev, N., & Panov, D. (2010). Plant oils as “green” substances for wood protection. *Minimizing the Environmental Impact of the Forest Products Industries-Ecwood; Fernando Pessoa University: Porto, Portugal*, 143-149.
- Văcar, C. L., Mircea, C., Pârvu, M., & Podar, D. (2022). Diversity and Metabolic Activity of Fungi Causing Biodeterioration of Canvas Paintings. *Journal of Fungi*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/jof8060589>
- Van den Berg, K. J., Bonaduce, I., Burnstock, A., Ormsby, B., Scharff, M., Carlyle, L., Heydenreich, G., & Keune, K. (2019). *Conservation of Modern Oil Paintings*. Springer.
- van Laarhoven, K. A., Peeters, L. H. M., Bekker, M., Huinink, H. P., & Adan, O. C. G. (2017). Conidia of *Penicillium rubens* formed at low water activities can attract more water. *MicrobiologyOpen*, 6(6), e00526. <https://doi.org/10.1002/mbo3.526>
- Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S.-B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T., & Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78, 343-371. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>
- Vukojevic, J., & Grbic, M. L. (2010). Moulds on paintings in Serbian fine art museums. *Afr. J. Microbiol. Res*, 4, 1453-1456.

- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Whitehead, K. A., Liauw, C. M., Lynch, S., El Mohtadi, M., Amin, M., Preuss, A., Deisenroth, T., & Verran, J. (2021). Diverse surface properties reveal that substratum roughness affects fungal spore binding. *iScience*, 24(4), 102333. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102333>
- Zabel, R. A., & Morrell, J. J. (2020). Chapter Seventeen—Paint mildew and related degradative problems. En R. A. Zabel & J. J. Morrell (Eds.), *Wood Microbiology (Second Edition)* (pp. 437-454). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819465-2.00017-6>