Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Departamento de Biología

Diagnóstico del biodeterioro por insectos y hongos de documentos patrimoniales de la Biblioteca Provincial “Martí” de Villa Clara, Cuba

Autora: Jennifer Ramos Rodríguez

Tutora: Dr.C. Daymí I. Carrazana García. (Departamento de Farmacia, Facultad de Química y Farmacia, UCLV. daymic@uclv.edu.cu)

2014

Pensamiento

Las bibliotecas encierran sabiduría, conocimiento, historias,
pero no imaginamos que en muchos de sus antiguos
tomos casi clausurados existe un mundo en movimiento.

"La vida es una promesa: cúmplela".

Madre Teresa de Calcuta

Dedicatoria

A mi mamá y a mi papá por apoyarme siempre.

Agradecimientos

EL primer agradecimiento va para ti, Daimí , porque sin tu apoyo, dedicación y genialidad esta tesis no hubiera sido posible, muchas gracias por ser una tutora muy especial.

A René Cupull y Anarella por ayudarme a dar mis primeros pasos en el laboratorio.

Un agradecimiento muy especial a la Dr Leyanis Mesa por abrirme las puertas del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química , a Cristina ,y a mis compañeras de ingeniería química , muchas gracias por socorrerme tantas veces .

A todo el personal de la biblioteca Provincial "Martí" por permitirme llevar a cabo esta investigación .

A todos mis compañeros de clases porque ha sido fabuloso haberlos conocido, en especial a Jesi y Edgar porque además son mis mejores amigos y hemos dado juntos 5 pasos gigantes para llegar al fin y ha sido un placer haber caminado a su lado.

A mi abuelita por preocuparse siempre por mí.

A mis padres porque sin ellos no hubiera podido llegar aquí , por ayudarme, apoyarme y quererme siempre.

Y no por último menos especial a ti Rafe por estar a mi lado todo este tiempo y comprenderme siempre.

A todos Muchas Gracias

Resumen

Resumen

Se inspeccionaron visualmente todos los ejemplares de los libros raros, así como de las revistas del siglo XIX pertenecientes a la Colección de la Sala de Fondos Raros y Valiosos de la Biblioteca Provincial “Martí”, en Villa Clara, Cuba, con el objetivo de diagnosticar el estado de biodeterioro por insectos y hongos filamentosos. Se determinó el grado de deterioro por ambos tipos de organismos; se estimó el Orden de insectos que ocasionaron daños en el papel; se identificaron las especies, y finalmente se determinó la capacidad deteriorante de los hongos, así como la actividad enzimática de la cepa que representa mayor riesgo para la colección. El 1,7% de los libros y el 8,7 de las revistas presentan afectaciones por insectos; considerándose bajo el grado de afectación por estos. Tanto los libros como las revistas presentan un grado de afectación medio por hongos filamentosos (11,5% y 22,8%) respectivamente. No se encontraron insectos vivos ni muertos, ni sus restos o excretas. De las alteraciones que pueden provocar los insectos solo se encontraron galerías, al parecer causadas por insectos del Orden Isóptera. En orden descendiente la frecuencia de aparición de las alteraciones para hongos son: manchas con micelio, manchas y enmohecido. Se aislaron 11 especies del género *Penicillium,* dos de *Aspergillus,* y una de *Alternaria, Curvularia, Trichoderma* y un hongo imperfecto. Todas las cepas poseen actividad celulolítica y proteolítica; solo uno de los aislados presenta actividad amilolítica. Las actividades celulolíticas (FPasa), β-Endoglucanasa y β-Glucosidasa del aislado fúngico de *Aspergillus* sp evaluado, son bajas en comparación con aislados estudiados para la degradación industrial de residuos lignocelulósicos, pero más altas que las reportadas por una cepa de este mismo género obtenida en un libro antiguo. Se recomienda tomar en cuenta este diagnóstico para trazar la estrategia de control de biodeterioro de los documentos y su restauración.

Palabras claves: actividad celulasa, libro raro, revistas

Abstract

Abstract

It was inspected all the exemplary of the collection of rare value books and XIX century review of the Provincial Library “Martí”,in Villa Clara, Cuba. This investigation was made with the objective of determinate the ratio of affectation due to insects and filamentous fungi. Visual inspection of all the documents was performed to detect the alterations, to identify the species, to determinate the deteriorating capacity of the fungi and enzymatic activity of the more deteriorating capacity strain. The damage by insects represents 1,7% in books and 8,7% in review. This affectation was considerated low. The affectation due to filamentous fungi was medium in books and review (11, 5% y 22, 8%) respectively. Rests of insects, excreta and live insects weren’t found. Only mines were found, due to insects of Isoptera order. Incidences in decrease order of frequency of appearance for fungi damages are: mycelium whit spots, spots and molds. It was isolated 11 species of *Penicillium* genus, two of *Aspergillus* and one of *Alternaria, Curvularia, Trichoderma,* besides of an imperfect fungus. All strains have cellulolytic and proteolytic activity and only one of isolated strains have amilolytic activity. The cellulolytic activities (FPasa), β-endoglucanasa and β-glucosidasa of *Aspergillus* sp. isolates are low when is compared with isolates studied in industrial degradation of lignocelulosic residue. Therefore this result is higher in comparison with a report of an *Aspergillus* strain isolated of rare value books. It is recommended to take into account this diagnosis in order to planning a strategy to control the biodeterioration of these documents and their restorations.

Keywords: celulase activity, rare books, review

Índice

ÍNDICE

1	**INTRODUCCIÓN**	1
2	**REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**	3
2.1	Deterioro microbiológico del papel	3
2.2	Uso de desinfectantes para la eliminación de microorganismos en documentos con soporte de papel	7
2.2.1	Modo de acción de los agentes antimicrobianos	8
2.2.2	Métodos de control con productos tóxicos habitualmente aplicados a objetos históricos	9
2.2.3	Métodos de control con productos no tóxicos	11
2.2.4	Desinfectantes evaluados en el estudio	13
2.2.4.1	Cloruro de benzalconio	14
2.2.4.2	Cetrimide	14
2.2.4.3	Extracto vegetal de *Terminalia catappa* L.	15
2.3	Papeles y tintas empleados en el estudio	16
2.3.1	Papel bond	16
2.3.2	Papel periódico	16
2.3.3	Tintas	16

3	**MATERIALES Y MÉTODOS**	18
3.1	Pruebas microbiológicas	18
3.1.1	Evaluación del crecimiento fúngico sobre papel previamente tratado con los productos	18
3.1.2	Evaluación de la eficacia de los productos en el tratamiento del papel contaminado	21
3.1.3	Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria	22
3.2	Pruebas fisicoquímicas para el soporte	24
3.2.1	Determinación del índice de cobre	25
3.2.2	Evaluación de la reducción del pH del papel	27
3.2.3	Efecto sobre las tintas	27
4	**RESULTADOS**	28
4.1	Pruebas microbiológicas	28
4.1.1	Evaluación del crecimiento fúngico sobre papel previamente tratado con los productos	28
4.1.2	Evaluación de la eficacia de los productos en el tratamiento del papel contaminado	29
4.1.3	Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria	30
4.2	Pruebas físico-químicas para el soporte	30

4.2.1	Determinación del índice de cobre	30
4.2.2	Evaluación de la reducción del pH del papel	32
4.2.3	Efecto sobre las tintas	33
5	**DISCUSIÓN**	36
5.1	Pruebas microbiológicas	36
5.1.1	Evaluación del crecimiento fúngico sobre papel previamente tratado con los productos	36
5.1.2	Evaluación de la eficacia de los productos en el tratamiento del papel contaminado	38
5.1.3	Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria	39
5.2	Pruebas físico-químicas para el soporte	40
5.2.1	Determinación del índice de cobre	40
5.2.2	Evaluación de la reducción del pH del papel	42
6	**CONCLUSIONES**	45
7	**RECOMENDACIONES**	46
8	**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**	
	ANEXOS	

1. Introducción

El patrimonio cultural, constituye la memoria colectiva y una herencia histórica amplia y diversa ante la cual las generaciones presentes tenemos una irrenunciable responsabilidad, ya que representa el testimonio vivo de lo mejor que han realizado multitud de hombres y mujeres de todas las épocas. Su conservación equivale, por un lado, a mostrar el respeto que debemos hacia el legado de los que nos precedieron y por otro al hacerlo entregamos el testigo de nuestra tradición cultural a los que nos sucederán (Valliant et *al*., 2004).

El notorio interés que supone la conservación del patrimonio documental y la contribución que a este efecto puede prestar la investigación biológica y más específicamente, el estudio de los microorganismos contaminantes, implica la necesidad de conocer e investigar tanto las características morfológicas como fisiológicas de estos para poder llevar a cabo una lucha biológica auténtica y eficaz (Valliant *et al*., 2004; Mitchell y Mcnamara, 2010; Michaelsen *et al*., 2010).

La provincia de Villa Clara alberga entre sus grandes tesoros la Biblioteca Provincial “Martí”, Monumento Nacional de la República de Cuba, desde el 24 de junio de 1999. Su construcción data de 1912, originalmente fue vivienda y oficina del Gobierno Provincial y el lateral izquierdo de la planta baja del edificio fue biblioteca del gobierno. Después del triunfo de la Revolución en 1959 todo el edificio pasó a ser biblioteca pública.

La institución cuenta con una Sala de Fondos Raros y Valiosos resultado de la unificación de la colección cubana y el fondo antiguo existente en la institución, los que fueron adquiridos en diferentes etapas hasta constituir hoy el depósito histórico provincial con mayor volumen de documentación (Fundora *et al*., 2007). Forman parte de los fondos de esta sala: bibliografía mínima cubana, libros raros, bibliografía provincial, obra martiana, obras generales, documentos no publicados, publicaciones periódicas, manuscritos, planos y mapas, fotografías, carteles, artículos sobre historia local, costumbres y personalidades del patio y otros materiales especiales efímeros.

La colección de la Sala de Fondos Raros y Valiosos fue inspeccionada en el año 1985 donde se confeccionó un Informe de Servicio Técnico. Este informe realizó un diagnóstico general de su estado de conservación (malo, regular o bueno), en el se refiere que se evaluaron 16 periódicos y 64 revistas, habiéndose encontrado un elevado daño por insectos y bajo por hongos,

identificando los Órdenes y Géneros a los cuales pertenecían. Además se determinó que la temperatura y la humedad relativa dentro del local no eran las adecuadas, pero no se realizaron tomas de datos continuos que permitieran conocer las fluctuaciones existentes en estos parámetros (Morales, 1985).

La institución cuenta con un estudio más reciente en el año 2013 donde se valoraron los factores físicos ambientales: temperatura, humedad relativa, luz y ventilación y se determinó el riesgo de biodeterioro del material de archivo por hongos filamentosos, insectos y vertebrados a partir del análisis de las condiciones ambientales, haciendo una predicción de cuáles podrían ser las condiciones reales de los soportes.

Se determinó que el riesgo de biodeterioro de los documentos por insectos fue bajo; siendo colectados especímenes fundamentalmente del Orden *Psocoptera* además se capturaron algunos insectos del Orden *Himenoptera*, los que pueden actuar como parásitos de los huevos de los primeros (Pinos, 2013).

El aire del Archivo se consideró poco contaminado atendiendo al número de propágulos fúngicos. Se identificaron especies de lo los géneros *Penicillium*, *Nigrospora, Aspergillus, Fusarium y Cladosporium* (Pinos, 2013).

Por lo tanto el problema a abordar en esta investigación es que se desconoce el grado de biodeterioro por insectos y hongos de las colecciones de libros raros y revistas del Siglo XIX, su viabilidad y su capacidad deteriorante.

Si se da respuesta a este se podrá por un lado, correlacionar estos aspectos con el análisis de riesgo realizado anteriormente, y por otro, brindar información útil para el establecimiento de una estrategia de restauración.

Objetivo general:

Realizar un diagnóstico del deterioro por insectos y hongos filamentosos de los libros raros y revistas del Siglo XIX de la Sala de Fondos Raros y Valiosos de la Biblioteca Provincial ¨Martí¨.

Para darle cumplimiento se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar el grado de afectación por insectos y hongos filamentosos en los documentos inspeccionados.
2. Identificar los especímenes de insectos colectados y los aislados fúngicos.
3. Evaluar la capacidad deteriorante de los hongos filamentosos aislados.
4. Determinar la actividad enzimática celulolítica sobre papel del aislado que represente un mayor riesgo de deterioro para el Archivo.

2. Revisión Bibliográfica

2.1 Biodeterioro

El biodeterioro se puede definir como un cambio indeseable en las propiedades de un material siendo causado por la actividad vital de los organismos; referido a las propiedades culturales, es el daño físico, químico y estético causado biológicamente por agentes tales como plantas, insectos, algas, líquenes, hongos y bacterias y soportado por la presencia de sustancias orgánicas susceptibles al ataque de microorganismos heterótrofos y dependientes de las condiciones microclimáticas(temperatura y humedad relativa) (Vaillant y Valentín, 1996).

También puede definirse como proceso causado por microorganismos que forman biofilms sobre los soportes y los utilizan como fuente de carbono y energía, lo que afecta las propiedades del material (Guiamet, 2009).

El biodeterioro no puede ser considerado como un fenómeno aislado, siempre ocurre acompañado de otros procesos de deterioro tales como físicos, químicos o físico-químicos, con los cuales esté íntimamente relacionado (Guiamet,*et al*., 2008).

2.1.1 Consideraciones generales

Los materiales inorgánicos son atacados más fácilmente por organismos autótrofos a diferencia de los materiales orgánicos los cuales son blanco principalmente de organismos heterótrofos. Las poblaciones que se desarrollan van a depender de las condiciones microclimáticas (temperatura y humedad relativa) así como de características más específicas tales como el pH, el contenido de agua en los materiales, etc. (Florian, 2004; Sterflinger, 2010). Por ejemplo, un determinado valor de pH puede favorecer el desarrollo de una microbiota acidófila o basófila, la higroscopicidad de un material y su contenido de agua es un fuerte condicionante para el desarrollo de hongos. La presencia de impurezas de diversa naturaleza puede favorecer el biodeterioro o ampliar el rango de organismos que pueden desarrollarse (Florian, 2004).

Los agentes biodeteriorantes de los materiales de archivos, bibliotecas y museos, están representados por aproximadamente 70 especies de insectos, 200 especies de microorganismos (entre hongos y bacterias) y algunos roedores (Valentín, 2001, 2010).

Los insectos pueden deteriorar completamente un documento y los de mayor frecuencia son: cucarachas (Blattoidea), pececillos de plata (Thysanura), polillas (Anobiidae), piojos de los libros (Corrodentia), termitas (Isópteras) y coleópteros (Dermestidae y Anobiidae) (Vaillant *et al*., 2004; Valentín 2001, 2004). Algunos se nutren del almidón presente en el papel o de las encuadernaciones (Psocoptera). Las excreciones de algunos de ellos producen un líquido oscuro que decolora y mancha el papel (Vaillant *et al*., 2004). Los insectos y roedores son relativamente fáciles de detectar y combatir, pero los microorganismos ejercen una acción sobre el material celulósico mucho más fina y peligrosa, ya que la destrucción es más difícil de evitar (Valentín, 2001).

Cuando el biodeterioro es provocado por microorganismos se denomina microbiodeterioro (Borrego, 2009; Villalba y Malagón, 2011). Entre los agentes microbiodeteriorantes los hongos y algunas especies de bacterias causan los mayores daños. Estos en su actividad contaminante ejercen un doble efecto negativo, por un lado producen daños al soporte documental y por otro afecciones a la salud del personal que está en contacto con las colecciones (Gallup, 2006; Nevalainen y Morawska, 2009; Rojas *et al*., 2002; Florian 2004; Borrego *et al*., 2008, 2010).

2.1.2 Factores que propician el biodeterioro

El biodeterioro puede verse favorecido por las propiedades del soporte, los factores ambientales y las características propias de los microorganismos. Algunas características del papel pueden alterar su microbioresistencia, entre ellas podemos mencionar el grado de polimerización, el pH y la higroscopicidad. (Florian, 2004; Villalba y Malagón, 2011).

Los componentes del papel son casi en su totalidad polímeros, los cuales son más resistentes a la degradación biológica mientras más polimerizados están. Una eventual disminución del grado de polimerización, debido a la acción de algún agente químico o ambiental puede tornar al material más sensible al ataque microbiológico. Mientras más higroscópicos sean los materiales más propician el desarrollo de hongos. La higroscopicidad varía entre los diferentes materiales y puede aumentar con el proceso de restauración (Florian, 2004).

Los microorganismos que conforman la microbiota habitual del patrimonio documental necesitan para su desarrollo valores de humedad relativa superiores

al 65% y un contenido de agua en los materiales entre 8-10% por encima de los valores normales (Florian, 2004; Karbowska-Berent *et al.,* 2011). El contenido de humedad en un material es uno de los factores más importantes en el crecimiento microbiano, que entre otros fenómenos determina la cantidad de agua presente para la germinación de las esporas microbianas.

Muchas especies de hongos y bacterias comienzan su desarrollo en función del contenido de humedad sobre la superficie de un objeto. Asimismo, ha de tenerse en cuenta que los microorganismos durante su desarrollo producen agua metabólica, la cual incrementa el contenido en humedad de un material, favoreciendo a su vez la multiplicación celular (Vaillant *et al*., 2004).

2.2 Daños que producen los insectos y hongos

Según Bello y Borrell (2002) los daños que producen los insectos y hongos a los documentos son los siguientes:

Reblandecimiento: estado de debilitamiento en que se puede encontrar un documento cuando pierde su consistencia original y se vuelve delicado, cediendo a la presión; adquiere una apariencia floja y flácida que puede ser causada por una humedad excesiva (hidrólisis) o por el ataque de microorganismos.

Galería: pasillos formados por la suma de agujeros continuos que presentan diferentes trayectos y ocasionan la pérdida de parte del material del soporte. Los principales órdenes que provocan daños son: Coleoptera, Isoptera, Tysanura, Blattodea, Psocoptera y Lepidoptera.

Erosión: desgaste provocado en el documento por causas mecánicas y físico-biológicas que dañan la superficie y que pueden llegar a ocasionar perforaciones y pérdidas de parte del documento.

Enmohecido: moho provocado por microorganismos, desarrollado a expensas de diversas sustancias orgánicas que provocan la descomposición del material, la aparición de manchas o una capa de terciopelo, y que hace posible la destrucción de la obra si no se detiene el crecimiento. Su aspecto es el de una capa de algodón o terciopelo de diversas coloraciones, según el nutriente y las especies desarrolladas.

***Foxing*:** multitud de pequeñas manchas de color marrón producidas por microorganismos que reaccionan con las impurezas de origen metálico del papel

cuando se combinan con un exceso de humedad. Las causas que originan esta alteración aún no están bien determinadas.

Excrementos: excreciones de los insectos en los documentos (principalmente de moscas) que dejan manchas minúsculas de color oscuro sobre la superficie de la obra.

Otros autores describen otras alteraciones que pueden ocasionar específicamente los hongos y que son sumamente dañinas para los documentos, entre ellas se encuentran: la degradación enzimática de la celulosa, de las proteínas, la excreción de ácidos y pigmentos así como la acción mecánica sobre el material (Martínez, 2003; Borrego y Perdomo, 2011). Los indicadores de la alteración son: cambios de color, erosión superficial y reblandecimiento del soporte (Vaillant *et al*., 2004). Los daños de origen microbiano sobre el papel se pueden dividir en: alteración cromática, alteración estructural del componente de base del soporte documental y alteración de los aditivos esenciales del papel.

El primero de los daños mencionados es el más común; se manifiesta por la presencia de manchas de diferentes colores (rosado, violeta, carmelita, negro, verde entre otros), estas pueden ser delimitadas o difusas, más o menos grandes, pero nos sirven como criterio de identificación del agente deteriorante en cuestión. El segundo es el más devastador de todos y se debe a la acción de las enzimas (Vaillant, 1992). Pero la acción de los microorganismos tiene un doble papel, por un lado la acción enzimática para degradar y asimilar los nutrientes y por otro, la excreción de productos de desecho del metabolismo, entre los que se encuentran ácidos orgánicos como ácido cítrico, ácido fumárico, ácido láctico, etc., que bajan el pH de los soportes considerablemente acidificándolos (Martínez, 2003).

2.2.1 Insectos que causan biodeterioro

El éxito de los insectos se debe a su capacidad para adaptarse a los más diversos hábitats y hábitos de vida. Su plasticidad ecológica les permitió ocupar todos los hábitats, aun los más adversos, como los polos, desiertos y grandes alturas y hasta prosperan en presencia de insecticidas (Vaillant *et al*., 2004).

Orden Thysanoptera: Insectos ápteros más primitivos que existen, cuya falta de alas no ha sido el resultado de su evolución sino que es original. Son identificados comúnmente como pececillos de plata. Una de sus características distintivas es la forma de su abdomen, que está terminado en varios apéndices. En el caso de

Lepisma spp. el abdomen finaliza en tres cerdillas articuladas. Su cuerpo es de forma cilíndrica y brillante debido a que está cubierto de escamas (razón por la cual reciben el nombre de Lepisma) cuyo color varía de acuerdo al estadio en que se encuentre el insecto. En la cabeza poseen dos antenas alargadas y sus pies son cortos, con dos artejos y una uña en cada tarso. Presenta fobia a la luz, por lo que suele habitar en espacios oscuros y, teniendo en cuenta su dependencia hacia la humedad, lo más seguro es encontrarlo en casas o edificios viejos, sótanos frescos, depósitos poco iluminados y con poca ventilación, detrás de los zócalos y de los muebles, en las grietas o fisuras de las paredes, sobre todo si éstas contienen manchas de humedad, o lugares donde haya pérdidas de agua, incluso en los baños y cocinas. Se alimenta de colas y de celulosa. Este insecto deja la superficie del papel llena de erosiones, llegando, a veces, a perforarlo. En ocasiones puede dañar totalmente un documento, un grabado o dibujo, pues las erosiones afectan, a menudo la parte dibujada, escrita o impresa (Bello y Borrell, 2002). Los ejemplares más conocidos como causantes de biodeterioro son *Lepisma saccarina y Thermobia domestica.*

Orden Dictyoptera: Las más conocidas son *Blattela germanica, Blatta orientalis y Periplaneta americana*, conocidas comúnmente como cucarachas. Prefieren la humedad y la nocturnidad, son omnívoras, viven ocultas en zócalos, fisuras de las paredes, etc., y es muy frecuente encontrarlas en depósitos, almacenes y zonas de desagüe. En el material de archivo deja erosiones superficiales y manchas producidas por sus excrementos, que suelen ser muy oscuros (Bello y Borrell, 2002).

Orden Psocoptera: Son insectos muy pequeños, casi imperceptibles, conocidos como piojos de los libros. Se alimentan de material vegetal y animal, concretamente de otros insectos u hongos; también se encuentran en las encuadernaciones y dentro del bloque de libros. Produce pequeños agujeros en la superficie del papel y ligeras erosiones (op. cit.).

Orden Isoptera: Forman parte de los grupos de insectos más peligrosos y difíciles de erradicar, especialmente, porque algunas especies (termitas subterráneas), forman sus nidos primarios fuera de las edificaciones al que posteriormente acceden a través de tuberías, o conducciones eléctricas, para instalar sus nidos secundarios y acceder a los materiales celulósicos localizados en el interior del inmueble.

Las termitas, son insectos sociales. El número de individuos en una colonia varía de una especie a otra, oscilando entre 1000 y 1 000 000. Dentro de las colonias, el rey y reina corresponden a las castas reproductivas y las obreras y soldados a las castas estériles. Las termitas más comunes incluyen un escaso número de familias. La familia Rhinotermitidae (termitas subterráneas) son las más peligrosas y difíciles de erradicar. Construyen sus nidos principales en la tierra, en la madera húmeda en contacto con la tierra o en las raíces de los árboles. *Reticulitermes lucífugus* es la especie más frecuente en países del área mediterránea. Una humedad baja afecta sensiblemente a las colonias de termitas. Asimismo, la luz les perjudica mucho debido a su falta de pigmentación. Por todo ello, se ocultan en el interior de túneles que construyen, por los que se trasladan fácilmente y donde conservan su humedad manteniéndose ocultas de la luz. Solo el rey y la reina poseen alas para desplazarse durante el vuelo nupcial. Están pigmentados para protegerse de la luz. Las obreras y soldados no tienen alas, ni están pigmentados a excepción de la cabeza de los soldados que necesitan salir de los nidos para defender las colonias. Destruyen todo tipo de material orgánico, especialmente si está húmedo y contaminado por microorganismos (Valentín, 2003).

Orden Coleoptera: Llamados comúnmente carcomas. El mayor peligro lo representan las larvas, que se alimentan de la celulosa formando largas galerías desde la periferia de la obra hasta el centro y depositando dentro de estas sus excretas con forma de arenilla. Las principales especies son *Lasioderma serricorne y Stegobium paniceum* (Bello y Borrell, 2002).

2.2.2 Hongos bibliófagos más destacados

Los géneros de hongos más directamente implicados en la posible degradación del soporte celulósico y fundamentalmente del papel son: *Rhizopus, Alternaria, Aspergillus, Penicillium, Cladosporium,Trichoderma, Fusarium* y *Chaetomium.*

Entre ellos, los géneros *Aspergillus, Penicillium* y *Chaetomium* son los más frecuentemente aislados (Calvo *et al*., 2005).

Género *Alternaria*: Se incluye entre los Deuteromycetes u Hongos Anamorfos. Sus especies son capaces de degradar el papel y producir manchas de color pardo en el soporte. Este género daña los siguientes materiales: papel/cartón, pergamino, colas animales/vegetales, materiales sintéticos, tejidos, sellos de cera

y cintas magnéticas. Dentro de este género existen muchas especies que destacan por atacar el papel como*: A. tenuis*, *A. humicola*, *A. chartarum*, entre otras (Calvo *et al*., 2005).

Género *Aspergillus*: Se incluye entre los Deuteromycetes cuando se halla en fase Imperfecta y entre los Ascomycetes, si podemos detectar la formación de esporas. Es el más común y el responsable del 80% de las destrucciones de las encuadernaciones y de los daños ocasionados en archivos y bibliotecas. Puede provocar acidez y manchas de diferentes colores en el soporte (op. cit.)

Estos microorganismos atacan y destruyen la celulosa, descomponiendo la fibra del papel en su totalidad. Su temperatura óptima de desarrollo es de 24-30ºC, la mínima -10ºC y la máxima 50ºC. La humedad relativa óptima es de 75-100%, y la mínima de 50% (Valentín *et al.*, 1998).

El género *Aspergillus* es capaz de dañar los materiales siguientes: papel/cartón, pergamino, tintas, colas animales/vegetales, materiales sintéticos, tejidos, sellos de cera, fotografías y cintas magnéticas. Las especies que destacan por atacar el papel son: *A. fumigatus, A. sulphureus, A. niger, A. versicolor, A. flavus*, entre otras (Valentín *et al.*, 1998).

Género *Cladosporium*: Perteneciente a los Deuteromycetes, daña los materiales siguientes: papel/cartón, pergamino, materiales sintéticos, tejidos, sellos de cera y cintas magnéticas. Las especies de este género son capaces de destruir las fibras del papel y provoca alteraciones cromáticas de color verde oscuro o negruzco, entre las que destaca *C. herbarum* (Calvo *et al*., 2005).

Género *Fusarium*: Este hongo Deuteromycete daña todos estos materiales: papel/cartón, pergamino, colas animales/vegetales, materiales sintéticos, tejidos, sellos de cera y fotografías. Como especie destacada encontramos *a F. oxysporum* (Calvo *et al*., 2005).

Género *Penicillium*: Este microorganismo incluido entre los Deuteromycetes se desarrolla en ambientes con baja humedad (50-55% HR) y bajas temperaturas (15-30ºC) y su contaminación, como *Aspergillus*, se elimina con el uso de germicidas. Su capacidad enzimática puede ser inferior que el *Aspergillus*, aunque degrada las fibras; provoca acidez y manchas verdes en el soporte. Entre las especies más destacadas por atacar el papel encontramos: *P. notatum*, *P. frequentans*, *P.vermiculatum,* entre otras. El género *Penicillium* daña todos estos materiales: papel/cartón, pergamino, tintas, colas animales/vegetales, materiales

sintéticos, tejidos, sellos de cera, fotografías y cintas magnética (Calvo *et al*., 2005).

Género *Rhizopus*: Se incluye entre los Zygomycetes. La temperatura óptima de desarrollo oscila entre 20-30ºC, aunque también se desarrolla a temperaturas inferiores. Daña diversos materiales: papel/cartón, pergamino, tejidos y fotografías, produciendo manchas pardas y acidificación en el soporte (Calvo *et al*., 2005).

Género *Trichoderma***:** Este hongo incluido entre los Deuteromycetes destruye las fibras del papel rápidamente y otras sustancias que se pueden encontrar en las bibliotecas como: cartón, pergamino, materiales sintéticos, tejidos, sellos de cera y fotografías, produciendo manchas de colores verde oscuro. Destaca por atacar el papel la especie *Trichoderma viride* (Calvo *et al*., 2005).

2.2.3 Alteraciones que provocan en el soporte

Cuando los hongos se establecen sobre un papel, se inician una serie de etapas las cuales pueden constatarse al observar unas simples manchas de humedad en el papel. Posteriormente las hifas de los hongos empiezan a penetrar en las fibras celulósicas y, finalmente, llega a producirse la desintegración total o parcial de las fibras, a causa de la acción agresiva fúngica. Los daños ocasionados por una infección fúngica son casi siempre irreversibles y sólo se puede conseguir detener su acción y paliar algunos de sus efectos. Los hongos producen tres tipos de alteraciones en los soportes celulósicos: químicos, mecánicos y cromáticos (Calvo *et al*., 2005).

2.2.3.1 Alteraciones químicas

Los microorganismos liberan sustancias capaces de alterar químicamente la celulosa, transformándola y degradándola, modificando de esta manera las propiedades del papel. Entre estas sustancias podemos destacar enzimas glucosídicas y ácidos orgánicos.

Los hongos celulósicos, mediante enzimas glucosídicas, destruyen los puentes de oxígeno que unen las moléculas que forman la cadena de celulosa llegando a formar celobiosa (polisacárido formado por dos moléculas de glucosa). Este compuesto es degradado, a su vez, por otras enzimas glucosídicos que separan las moléculas de glucosa consiguiendo así el principal nutriente de los hongos.

Durante el metabolismo fúngico se degradan los nutrientes necesarios, dando lugar a la formación de ácidos orgánicos (oxálico, cítrico, succínico, fumárico, acético y láctico) que se depositan sobre el soporte. Estos ácidos provocan daños químicos en el soporte, debilitándolo, ocasionando un descenso del pH del papel y, a la vez, ayudan a un ataque secundario por parte de otros hongos (Calvo *et al*., 2005).

2.2.3.2 Alteraciones mecánicas

Estas alteraciones se producen en el papel cuando los micelios de los hongos se introducen entre las fibras celulósicas. El micelio del hongo puede llegar a expandirse por el soporte celulósico hasta destruirlo en su totalidad, rompiendo todas las fibras. El resultado es un papel frágil, debilitado y de aspecto algodonoso. (Caneva *et al*., 2000).

Las especies implicadas principalmente en modificar las propiedades mecánicas del papel, pertenecen a los géneros *Chaetomium, Trichoderma* y *Stachybotrys* (Caneva *et al*., 2000).

2.2.3.3 Alteraciones cromáticas

La degradación más visible del papel atacado por hongos se constata por la formación de manchas de diversos colores (rojo, violeta, amarillo-marrón, negro, etc.) que pueden observarse en el soporte. Una alteración cromática particular es el llamado *foxing*, que tiene como característica la formación de manchas rojizas y oscuras, de dimensiones variables, que se desarrollan en ciertos papeles de una forma muy localizada.

El color de las manchas en el soporte celulósico provocadas por microorganismos no permite identificar qué tipo de hongo lo provoca. Esto es debido a que el pigmento de cada especie fúngica toma una coloración y una intensidad diferente dependiendo de las particularidades del papel que alteren. Entre las propiedades del soporte celulósico que intervienen en las distintas tonalidades está el pH, la presencia de colas (almidón o gelatinas), existencia de metales, etc. Asimismo influye, el tiempo de persistencia de la infección fúngica y la coexistencia de varios microorganismos (Gallo, 1985).

El proceso que provoca dichas alteraciones cromáticas se relaciona con la presencia de hongos con micelio pigmentado y con la liberación de pigmentos

sobre el sustrato, fundamentalmente este último. Las manchas producidas por microorganismos son el resultado del metabolismo de los hongos. Se producen cuando los hongos metabolizan los nutrientes presentes en el substrato y segregan productos residuales pigmentados. Entre ellos, están los enzimas (celulasas o diferentes tipos de proteasas) y ácidos orgánicos (oxálico, fumárico, acético, láctico, glucónico, glucurónico, etc.), los cuales se depositan sobre el papel modificando sus propiedades químicas y deteriorándolo. Este tipo de manchas están formadas por un núcleo central oscuro y por una periferia de un color más claro. Estas pigmentaciones son muy difíciles de eliminar en las restauraciones, aunque en algunos casos pueden realizarse blanqueamientos puntuales (Caneva *et al*., 2000).

2.3 Causas de contaminación de libros y documentos de archivos

Cuando se produce una contaminación por hongos en un archivo o en una biblioteca, la causa principal de la contaminación es difícil de establecer, como consecuencia de la variedad de causas que pueden provocar una infección y que pueden ser divididas en dos clases, primarias y secundarias (Liénardy *et al*., 1989), dependiendo de su origen.

Se denomina infección primaria a la contaminación producida por hongos en el papel en el momento de la fabricación de la pasta. En este proceso se añaden diversos tipos de materiales, como vegetales, trapos, papeles viejos, adhesivos, maderas o colas. Este tipo de sustancias pueden estar infectadas por conidios, y provocar una contaminación del soporte celulósico. Los microorganismos poseen una gran capacidad de adaptación al medio, pudiéndose quedar en estado latente dentro del papel, hasta que las condiciones medioambientales (humedad relativa y temperaturas altas) sean las más óptimas para su desarrollo (Valls, 1986).

Cuando la infección por hongos se produce posteriormente a la fabricación del papel, se le denomina infección secundaria y las causas de esta contaminación fúngica pueden ser varias. El uso y manipulación de los libros en las bibliotecas y archivos provocan ciertas alteraciones, a veces de carácter irreversible en el soporte celulósico. A causa de esta manipulación por parte del hombre, los hongos pueden desarrollarse sobre sustancias orgánicas como la saliva y la grasa, existentes en dosis pequeñas en el papel y en otros tipos de soporte como el pergamino o la piel de las encuadernaciones (Valls, 1986).

En la restauración de libros y documentos se utilizan sustancias y materiales (papeles, adhesivos, colas, etc...) que pueden estar contaminados con conidios fúngicos o, en su caso, por esporas bacterianas (Calvo *et al.*, 2005).

Una de las causas más importantes de infección en bibliotecas y archivos es el polvo. El polvo tiene una composición heterogénea y variable formada por partículas químicas, huevos de insectos, polen de flores, conidios, esporas, etc... Se trata de un importante elemento dispersor de conidios y esporas fúngicas presentes en el ambiente y que circulan en el aire. Estos propágulos pueden situarse en las superficies de los materiales y desarrollarse cuando las condiciones son las adecuadas, dependiendo de la humedad relativa y de la temperatura (op. cit.).

La introducción de documentos infectados en archivos y bibliotecas también puede ser una fuente de infección. Para evitar este problema, se recomienda someter a los documentos de reciente adquisición o legado a un examen minucioso en un local completamente separado del resto, y a una exhaustiva limpieza y desinfección antes de incorporarlos al archivo (op. cit.).

Una de las causas accidentales que con mayor frecuencia motivan la aparición de hongos son las inundaciones. Éstas pueden ser provocadas por roturas de tuberías, grietas en muros, extinciones de incendios, goteras, etc. Estas catástrofes pueden llegar a crear unas condiciones favorables para el desarrollo de los microorganismos, como es la aportación de humedad al papel, que ayuda a provocar una rápida proliferación de los hongos (Calvo *et al.*, 2005).

2.4 El papel

El papel es una estructura obtenida en base a fibras vegetales de celulosa, las cuales se entrecruzan formando una hoja resistente y flexible (Velásquez, 2007) aunque en ocasiones estas pueden ser minerales, animales o sintéticas (Mosquera, 2000). En la literatura científica se refiere como papel a “aquella hoja delgada que se obtiene por la unión física de materias fibrosas, principalmente, celulosa previamente hidratada” (Asunción, 2001). El nombre se deriva del vocablo en latín *papyrus,* y este del griego *πάπυρος*, proveniente de una antigua planta egipcia C*yperus papyros* (Mosquera, 2000). Ha sido el medio de comunicación más usado a lo largo de la historia por su transportabilidad y comodidad (Velásquez, 2007).

2.4.1 Composición química del papel.

Entre los componentes químicos del papel se encuentran aquellos que forman las fibras, tales como: celulosa, hemicelulosa y lignina.

2.4.1.1 Celulosa

La celulosa es un polímero lineal de β1-4 glucano de masa molecular entre 50 y 400 kDa (Smith, 2000), de hasta 15000 restos de D-glucosa. Posee una estructura muy cohesionada unida por puentes de hidrógeno, lo que le confiere fuerza e insolubilidad (Voet y Voet, 2004). Puede encontrarse en la naturaleza formando las paredes celulares de las plantas (CMPC, 2005), con forma de cadenas largas y lineales, lo cual es posible gracias a la configuración β de los residuos de glucosa, aspecto que la diferencia estructuralmente de la amilasa, la amilopectina y el glucógeno (Nelson y Cox, 2005; Berg *et al*., 2002).

Las cadenas de celulosa a su vez conforman microfibrillas que se encuentran embebidas en una matriz de varios polisacáridos y monosacáridos cementantes, así como de un polímero fenólico semejante a un plástico llamado lignina. Dicha estructura confiere gran resistencia y rigidez a las plantas (Voet y Voet, 2004; CMPC, 2005). La celulosa a pesar de ser insoluble, se degrada en presencia de agua por hidrólisis, oxidación, acción del calor o mecánica y actividad microbiológica (Asunción, 2001).

La celulosa puede obtenerse química o mecánicamente, lo cual depende de los procesos industriales para la obtención del papel. En el primer caso se obtiene a partir de la cocción de la madera con una mezcla de hidróxido de sodio y sulfuro de sodio (Velásquez, 2007) a alta presión y temperatura, con el fin de disolver la lignina (CMPC, 2005). Este procedimiento se aplica cuando se desea un material con alto contenido de celulosa, por lo que comprende procesos que extraen las sustancias no celulósicas (Beck, 1992). Para obtener celulosa por acción mecánica la madera es molida y triturada bajo altas presiones y temperaturas. (CMPC, 2005). Los trozos de madera se desfibran mediante materiales abrasivos. El calor producido por la fricción hace que el agua se caliente, ablandando la lignina y permitiendo que las fibras de celulosa se separen fácilmente (Velásquez, 2007). El agua además disminuye el calor y por ende cualquier daño a las fibras (CMPC, 2005).

Existe una alternativa que se denomina proceso mecánico-químico, que consiste en dos períodos: Desfibrilamiento mecánico y tratamiento químico, pero es un método en desuso por favorecer el deterioro posterior del papel (Beck, 1992).

Una vez obtenida por algunos de los procesos anteriores, la pulpa de celulosa es blanqueada, mediante agentes clorados o peróxido de hidrógeno como agente oxidante e hidrosulfito de sodio como agente reductor para así conservar las sustancias no celulósicas (CMPC, 2005 ; Velásquez, 2007).

2.4.1.2 Hemicelulosa

A este término responde cualquiera de los polisacáridos de la pared celular vegetal que pueda ser extraído de la madera u otro material vegetal con soluciones acuosas de álcalis en las cuales es insoluble la celulosa La hemicelulosa está compuesta por glucosa, manosa y acidoglucurónico (Smith, 2000). A su vez Smith (2000) refiere que las hemicelulosas son, principalmente, xilanos, aunque pueden estar constituidas por otros homoglicanos que contengan residuos de hexosas o pentosas, ácido urónico y otras sustancias pécticas. La hemicelulosa aunque es un polímero complejo, se degrada con más facilidad que la celulosa. Su estructura se asocia a esta última creando un soporte en la pared celular. La presencia de este polímero mejora la flexibilidad del papel, facilita su refinado y aumenta la capacidad de enlace entre las fibras (Asunción, 2001).

2.4.1.3 Lignina

La lignina es un polímero abundante en las plantas vasculares que se encuentra incrustado en el espacio intercelular y en las paredes de fibra. Su función biológica es la de proporcionar rigidez y cohesión además de resistencia a la compresión. Es hidrófoba por lo que dificulta la absorción de agua y por ello propicia protección al ataque microbiano, además dificulta el hinchamiento y refinado de la fibra durante la fabricación del papel (Asunción, 2001; Atlas y Bartha, 2002).

La lignina está constituida por una mezcla de polímeros y posee estructuras aromáticas de fenil-propano unidas mediante enlace carbono-carbono (C-C) y éter (C-O-C) en una estructura tridimensional muy compleja (Atlas y Bartha, 2002). Este compuesto químico suele ser de elevada masa molecular y se forma por

polimerización deshidrogenativa de varios alcoholes 4-hidroxicinamlílicos (Smith, 2000).

2.4.1.4 Colas

Entre los otros componentes del papel se encuentran las colas que se aplican con el objetivo de dar una mayor estabilidad y resistencia al papel frente al agua (Asunción, 2001). Antiguamente se utilizaba el sulfato de aluminio y las colas de colofonia, las que generan un pH ácido en el papel. Actualmente se emplean productos sintéticos que proporcionan un pH neutro. El encolado tiene por objeto disminuir la permeabilidad al agua, (Velásquez, 2007). Sin la utilización de las colas la tinta se correría por el papel al escribir, de modo que el papel más seco y fuerte se desharía frente al agua (Asunción, 2001).

2.4.2 Características del papel

La coloración de las manchas producidas por los hongos también depende de las materias primas utilizadas en la manufactura del papel. Entre éstas encontramos impurezas metálicas de la pasta, aditivos como colas, almidón o gelatinas y fijadores, un pH de la pasta entre 4,8-5,6 (pH óptimo para el desarrollo fúngico). Estas sustancias pueden haberse introducido en la pasta de papel en el momento de su fabricación o posteriormente, al realizarse un reapresto. Por otro lado, el proceso químico utilizado en la manufactura del papel y las condiciones medioambientales en las que se ha producido la infección pueden provocar ciertas pigmentaciones en el soporte celulósico (Valls, 1986).

2.5 Aspectos bioquímicos

Para comprender el rol de los microorganismos en los fenómenos de biodeterioro es necesario tener nociones generales sobre su fisiología y metabolismo (Kaiser, 1988). La energía química contenida en los enlaces moleculares de las sustancias puede ser liberada a través de ciertas reacciones y constituye la fuente primaria de energía de los organismos, excepto los fotosintéticos. La energía requerida para que una reacción química se inicie se llama energía de activación. En los organismos vivos las enzimas son catalizadores biológicos que disminuyen la energía de activación y permiten que las reacciones ocurran a mayor velocidad (García, 1997).

En el papel, los microorganismos cuentan con diferentes compuestos que utilizan como nutrientes a partir de su degradación, tal disponibilidad depende de las características, el origen y la antigüedad del mismo. En los papeles más antiguos al usar como materia prima recortes textiles de algodón y lino fundamentalmente y al no haberse utilizado blanqueadores durante su manufactura, el polímero predominante es la celulosa, en el caso del papel moderno al utilizarse como materias primas residuos madereros y blanqueadores se pueden encontrar algunos otros residuos de la madera (lignina, hemicelulosa, pectina, etc.). Además, durante el proceso de fabricación en las materias primas se pueden encontrar colorantes y otras impurezas originadas por la actividad humana (Cappitelli y Sorlini, 2010).

2.5.1 Enzimas microbianas que degradan el papel

Los tres componentes principales de la madera son la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. La lignina está estrechamente asociada con la celulosa y la hemicelulosa en la pared celular de las plantas (Magalhães y Milages, 2008). Cuando el papel se fabrica la celulosa es deslignificada rindiendo un material más susceptible. La celulosa es el mayor constituyente de la madera y es además el polímero orgánico más abundante de la biosfera (Magalhães y Milages, 2008). Es un polímero de cadena lineal formado por residuos de D-glucosa unidos entre si por enlaces β (1-4) glucosídicos. Dentro del papel no todas las moléculas de celulosa tienen el mismo grado de polimerización, puede encontrarse en forma cristalina es decir organizada formando una red regular con enlaces por puente de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares. Aunque la celulosa forma esta estructura cristalina precisa, la celulosa natural no es puramente cristalina pues presenta algunos sitios amorfos (Magalhães y Milages, 2008). Cuando es sometida a tratamiento físico o químico aparece un número mayor de estos sitios a lo largo de la molécula; este cambio hace a la molécula más susceptible a los ataques enzimáticos (Allsopp *et al*., 2004).

El complejo enzimático celulasa degrada el polímero celulosa hasta un tamaño que permita su mecanismo de transporte a través de la membrana microbiana para que pueda ser asimilada como nutriente por la célula. El nombre común “celulasas” se refiere a tres grupos de enzimas diferentes cuya acción combinada permite la degradación eficiente de la celulosa. Las celulasas se distinguen de

otras glucósido hidrolasas por su habilidad de hidrolizar el enlace β-(1-4) glucosídico entre los residuos de glucosa. Este complejo comprende el siguiente sistema enzimático: (Magalhães y Milages, 2008; Cappitelli y Sorlini, 2010):

- Endoglucanasa (β (1-4) glucan-glucan-hidrolasa)
- Exoglucanasa (β (1-4) glucan-celobio-hidrolasa)
- β-glucosidasa o celobiasa.

El mecanismo de acción es el siguiente (Magalhães y Milages, 2008):

I. celulosa nativa ($C_6H_{10}O_5$) endoglucanasa → oligosacáridos + glucosa
II. celulosa u oligosacáridos exoglucanasa → celobiosa($C_{12}H_{22}O_{11}$) + glucosa
III. celobiosa β-glucosidasa → 2 glucosa ($C_6H_{12}O_6$)

El modelo se explica a partir del ataque de las endoglucanasas sobre las regiones no cristalinas de la fibra de celulosa amorfa, estas enzimas conducen a la formación de cadenas libres, sobre cuyo extremo reductor actúan las exoglucanasas que remueven hidrolíticamente pequeñas unidades de celobiosa y glucosa. La presencia de moléculas de celulosa induce la excreción de celulasas por los microorganismos celulolíticos, Otros inductores de este sistema enzimático son la celotriosa, la celotetraosa, pero concentraciones elevadas de glucosa o celobiosa tienen un efecto represor. El proceso está sometido a represión por producto final (Subash *et al*., 2005). La lignina es un polímero formado por sustancias obtenidas a partir de subunidades de fenilpropano por ello no es un carbohidrato. La lignina no es un compuesto cristalino ni anamorfo y es altamente complejo, insoluble en agua y difícil para los microorganismos de penetrar y degradar (Subash *et al*., 2005). A diferencia de la celulosa y la hemicelulosa que pueden ser degradadas aeróbica o anaeróbicamente, la degradación de la lignina requiere oxígeno y solamente es llevada a cabo por hongos y actinobacterias que producen un complicado grupo de enzimas que hidrolizan el polímero. Como consecuencia la lignina interfiere grandemente en el acceso de las enzimas a la celulosa y es un limitante de la degradación anaeróbica del polisacárido (Cappitelli y Sorlini, 2010).

El almidón y la gelatina son dos componentes comunes del papel (Silva, 2009; Cappitelli y Sorlini, 2010). El almidón es un compuesto mixto de dos fracciones de polisacáridos distintas la amilosa y la amilopectina. La amilosa es lineal, una cadena no ramificada de moléculas de D- glucosa unidas entre si por enlace α (1–4) glucosídico. Además de los enlaces α (1–4), la amilopectina también contiene

uniones ramificadas α (1–6). El almidón es degradado por enzimas llamadas amilasas. La α-amilasa actúa sobre el almidón de manera azarosa, liberando grupos reducidos mientras la β-amilasa produce maltosa. Las glucoamilasashidrolizan enlaces 1,6-α-D-glucosídicos cuando el próximo enlace en la secuencia es 1,4. Algunas preparaciones de esta enzima hidrolizan enlaces 1,6 y 1,3-α-D-glucosídicos en otros polisacáridos. La gelatina puede ser extraída de la piel o los tendones de animales después de tratar con ácido o álcali. Tradicionalmente las fuentes de gelatina han provenido de diversas especies de mamíferos. En la licuefacción de la gelatina interfieren diferentes proteasas (Subash *et al*., 2005; Cappitelli y Sorlini, 2010).

3. Materiales y Métodos

La Sala de Fondos Raros y Valiosos de la Biblioteca Provincial "Martí", se encuentra ubicada en el ala derecha del segundo piso del inmueble (Fig. 1). Esta sala cuenta con una amplia colección de valor patrimonial, de ella fueron objeto de estudio para la presente investigación, la colección de libros raros[i] y las revistas del siglo XIX.

Figura 1. Biblioteca Provincial "Martí"**.** Área de consulta de la Sala de Fondos Raros y Valiosos señalada en el círculo.

3.1 Determinación del grado de afectación causado por insectos y hongos

Para la evaluación del grado del daño causado por insectos y hongos filamentosos a los libros y revistas, se llevó a cabo la inspección visual de todos los libros raros y de todas las revistas del siglo XIX durante el período de octubre 2012 a octubre de 2013.

A cada ejemplar de libro o revista se le asignó un número arábigo consecutivo, teniendo en cuenta su ubicación en el estante correspondiente en el que está archivado.

Cada uno de estos ejemplares fue revisado con el objetivo de detectar alteraciones presumiblemente existentes en los documentos causadas por insectos, tales como: galerías, erosión, insectos vivos o muertos, o restos de alguna estructura; así como alteraciones causadas por hongos, como: manchas, reblandecimiento, presencia de micelio (enmohecido) o *foxing*, según las observaciones de Bello y Borrell (2002). Estos resultados se registraron,

especificando el número que indica su ubicación y los datos bibliográficos, de modo que esta información pueda ser empleada para trazar una estrategia de restauración por los especialistas.

El grado de afectación por insectos y hongos filamentosos se estableció según el porcentaje de ejemplares de libros y revistas afectados. Se consideró bajo cuando comprendiera entre un 0 y un 10 % de documentos afectados, medio si comprendía entre el 11 y 50 % y alto cuando superase el 51% del total de los documentos inspeccionados.

3.2 Identificación de los insectos y hongos filamentosos

En caso de detectarse la presencia de insectos estos fueron conservados en frascos con etanol (70%) para su posterior observación en estereomicroscopio. Para el almacenamiento de restos de insectos o sus excretas se prepararon sobres de papel.

La identificación fue realizada por un especialista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UCLV (Universidad Central de Las Villas, Cuba)[1]. Este especialista también realizó, basándose en las características de los daños en el papel, la estimación de los Órdenes de insectos causantes de los mismos.

De las alteraciones probablemente causadas por hongos filamentosos se realizó una selección de aquellas que mostraron diversidad entre ellas, del total de las detectadas. De aquellas que resultaban aparentemente iguales se seleccionaron dos para ser muestreadas por hisopado, empleando aplicadores de madera con hisopos secos, que fueron colocados en tubos de ensayo con 1mL de solución salina al 0,9% para garantizar la viabilidad de los hongos. Posteriormente se realizó la inoculación por extensión en placas de Petri que contenían como medio Agar Papa Dextrosa (PDA). Las placas fueron incubadas a 28±1ºC hasta quince días, inspeccionando visualmente su crecimiento a partir del séptimo.

Una vez que se obtuvieron los aislados fúngicos se realizó una selección del total para realizar la descripción cultural, agrupando todas aquellas cepas que culturalmente eran iguales.

Luego se tomó un aislado representativo de cada uno de los grupos y se seccionaron discos de biomasa con un horadador, los que se resembraron en

[1] Dr. Cs. Horacio Grillo Ravelo: Especialista en Entomología. Facultad Ciencias Agropecuarias, UCLV.

placas de Petri con PDA incubadas a igual temperatura una vez pasados cinco días se realizó la descripción cultural de las cepas.

Las colonias fúngicas que se desarrollaron fueron descritas atendiendo a:

- Grado de crecimiento.
- Color de la colonia: varios.
- Color en el reverso: varios.
- Pigmentación del sustrato: varios.
- Textura superficial (suelta, compacta, aterciopelada, flocosa, vellosa, filamentosa, gelatinosa, coriácea, enmarañada).
- Líquido transpirado: presencia o ausencia.

Para la determinación del color de las colonias y la pigmentación del sustrato se empleó el Colour Identification Chart (Edinburgh, 1969).

Cada aislado fúngico así obtenido fue designado mediante una letra R (de revista) o (L) de libro, indicando de donde se aisló y un número indicativo de la cepa correspondiente.

Para la identificación de las cepas fúngicas hasta el nivel de género se realizaron microcultivos, los cuales fueron observados al microscopio óptico, estas cepas fueron identificadas por especialistas y con la ayuda de claves como Hawksworth (1995) y Barnett y colaboradores (1998).

3.3 Evaluación de la capacidad deteriorante sobre papel de los hongos filamentosos aislados

La evaluación de la capacidad deteriorante de los aislados fúngicos se realizó mediante la determinación de la capacidad celulolítica y producción de pigmentos sobre papel, la actividad proteolítica y la amilolítica.

Para la determinación de la capacidad celulolítica y la producción de pigmentos se utilizó el procedimiento descrito por Rautela y Cowling (1986), para lo cual se procedió a inocular a los aislados en un medio de cultivo (MCbase) cuya composición salina para 1L fue: nitrato de sodio (2g); fosfato de dipotasio (1g); sulfato de magnesio (0,5g); cloruro de potasio (0,5g); sulfato ferroso (0,01g); agar 20g; agua destilada c.s.p. 1L; pH = 5,5. Como fuente de carbono se usó en un caso, una tira de papel de filtro de 4,8cm de largo por 1cm de ancho (equivalente a 0,05g de papel de filtro) y en otro, celulosa cristalina (1%). Como control se empleó glucosa (1%). Los cultivos se

incubaron a 28±1ºC durante 21 días. Para cada prueba se realizaron tres réplicas. La evaluación de los resultados se realizó mediante inspección visual y se indicó siguiendo el criterio dado por Hidalgo y Borrego (2006):

· Crecimiento abundante (75% del área o más): +++

· Crecimiento moderado (50% del área): ++

· Crecimiento pobre (25% del área): +

La producción de pigmentos se evaluó en los tubos que contenían el papel de filtro y se señaló como positiva en aquellos casos donde el hongo transfirió color al papel, en cuyo caso se determinó el color usando la clave antes referida. Se consideró negativa cuando el papel de filtró no cambió de color.

La actividad proteolítica se evaluó mediante dos ensayos de hidrólisis de gelatina, uno sobre una placa Petri y otro en un tubo de ensayo. Para el primero, las cepas de los hongos filamentosos fueron inoculados en MCbase, pero se le añadió como fuente de carbono gelatina a 5 $g \cdot L^{-1}$. Después de siete días de incubación a 28±1ºC, 5mL de reactivo de Frazier fueron vertidos sobre cada placa para determinar la presencia de un halo transparente, en cuyo caso la prueba se consideró positiva a la hidrólisis de la gelatina Galiotou-Panayotou *et al*., (1997). El ensayo en los tubos fue realizado para confirmar los ensayos positivos en las placas de Petri. En este caso, cada cepa se inoculó por punción en el medio de cultivo distribuido en un tubo de ensayo. La composición del medio era idéntica al del ensayo en placa de Petri, pero sin agar. Los tubos inoculados se incubaron durante siete días a 28±1ºC. Se almacenaron a 4 °C por 30 minutos, y la reacción de hidrólisis de la gelatina se puso de manifiesto por la licuefacción del medio cuando los tubos fueron agitados (Iwatzu, 1984).

Para la determinación de la actividad amilolítica, las cepas se sembraron en una placa Petri en MCbase que contenía almidón ($5g \cdot L^{-1}$) como única fuente de carbono. Después de siete días a 28±1ºC, 5 mL de reactivo de Lugol fueron vertidos sobre cada placa de cultivo y la presencia de una zona de color azul alrededor del crecimiento micelial fue tomada como indicador de hidrólisis positiva (Galiotou-Panayotou *et al*, 1997).

3.4 Determinación cuantitativa de las actividades enzimáticas celulasa total sobre papel de filtro, β-endoglucanasa y β-glucosidasa

A la cepa fúngica que presentó una capacidad celulolítica elevada y alto grado de esporulación se le evaluó las actividades enzimáticas celulasa total sobre papel de filtro, β-endoglucanasa y β-glucosidasa.

Para la obtención de biomasa, el aislado fúngico fue inoculado en 50 mL de un medio de cultivo para fermentar (Anexo II) contenido en un Erlenmeyer ajustando el pH a 5,5. Posteriormente fue colocado en una Incubadora-Agitadora Termostatizada (Sartorius) a 28±1ºC a velocidad de agitación de 150 rpm (Fig. 2). Transcurridas 72 horas se tomó 1mL de esta suspensión y se inoculó en 100 mL de medio de cultivo Mandels (Anexo II) contenido en un Erlenmeyer, esto se realizó por duplicado y posteriormente fueron colocados en la referida Incubadora-Agitadora.

Se determinó la actividad enzimática celulasa total en papel de filtro, β-endoglucanasa y β-glucosidasa según el protocolo del (LMB) Laboratorio de Micología y Biotecnología, Universidad Nacional Agraria La Molina.

Transcurridas 24 horas se tomaron muestras de 2 mL, de cada cepa y de cada réplica las que se centrifugaron a 30ºC y 14000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se utilizó en la determinación de las actividades enzimáticas. El desarrollo del color se obtuvo al adicionar ácido dinitrosalisílico (DNS), que detecta la presencia de glucosa. Se determinó la densidad óptica en un espectrofotómetro a 540nm.

Figura 2. Cultivo fúngico para la determinación de las actividades enzimáticas celulasa total, β-endoglucanasa y β-glucosidasa.

El procedimiento de análisis para la determinación de la actividad celulasa en papel de filtro se describe en la Tabla I.

Los tubos fueron agitados y se determinó la densidad óptica contra blanco de reactivo (BR).

El cálculo de la concentración de glucosa en los tubos BPF, BM y M se realizó utilizando la curva estándar.

La concentración de glucosa estuvo dada de la siguiente manera:

$$[Glu] = [M] – ([BM] + [BPF])$$

Una unidad de enzima se definió como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de glucosa por minuto.

La actividad de papel de filtro se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\text{Celulasa } (U \cdot mL^{-1}) = [Glu] \times 0{,}1852 \times \text{dilución};$$

Donde 0,1852 es un factor para obtener el número de µmoles de glucosa formados en un minuto.

Tabla I. Procedimiento de análisis del ensayo de actividad enzimática en papel de filtro (FPasa).

Reactivos	Blanco reactivo (BR)	Blanco papel de filtro (BPF)	Blanco muestra (BM)	Muestra (M)
Tampón acetato 50 mM, pH 4,8 (mL)	1,5	0,5	1,0	---
Dilución de enzima (mL)	---	---	0,5	0,5
Se introdujeron los tubos en baño termostatado a 50°C.				
Tira de papel de filtro Whatman Nº1 0,05 g (1x6 cm)	NO	SI	NO	SÍ
Se incubaron los tubos por 30 minutos en baño termostatado a 50°C.				
Reactivo DNS (mL)	3,0	3,0	3,0	3,0
Se colocaron los tubos en baño de agua hirviente durante 5 minutos e inmediatamente enfriarlos en baño de agua corriente.				
Agua destilada (mL)	5,0	5,0	5,0	5,0

La determinación de la actividad β-endoglucanasa y β-glucosidasa se realizó siguiendo el procedimiento antes referido, usando carboximetilcelulosa (CMC) 1mL en lugar de papel de filtro y de salicina (SAL) 10mM, 1mL respectivamente .

El cálculo de la concentración de glucosa en los tubos BCMC, BM y M y BSAL, BM y M se realizó utilizando la curva estándar.

La concentración de glucosa estuvo dada de la siguiente manera:

[Glu] = [M] – ([BM] + [BCMC]) para el caso de CMC

[Glu] = [M] – ([BM] + [BSAL]) para el caso de SAL

Una unidad de enzima se definió como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de glucosa por minuto.

La actividad β-endoglucanasa se calculó mediante la expresión:

β-endoglucanasa $(U \cdot mL^{-1}) = [Glu] \times 0,37 \times dilución$

Donde 0,37 es un factor para obtener el número de µmoles de glucosa formados en un minuto.

La actividad β-glucosidasa se calculó mediante la expresión:

β-gucosidasa $(U \cdot mL^{-1}) = [Glu] \times 0,37 \times dilución$

Donde 0,37 es un factor para obtener el número de µmoles de glucosa formados en un minuto.

Para la obtención de la curva estándar, a partir de una solución de glucosa a una concentración de 50mg de glucosa anhidra en 50 mL de Tampón acetato 50 mM, pH 4.8 se siguió el procedimiento que se refiere en la Tabla II.

Los tubos fueron agitados y se determinó la densidad óptica contra blanco de reactivo (BR).

La densidad óptica se graficó contra la concentración de glucosa. Usando la regresión lineal $y = a + bx$; donde y =densidad óptica, x = concentración de glucosa.

El cálculo de la concentración de glucosa en la determinación de actividad enzimática se realizó con la ecuación de regresión obtenida.

Tabla II. Procedimiento para la obtención de la curva estándar de glucosa.

Reactivos	Blanco Reactivo	1	2	3	4	5
Solución estándar de glucosa (mL)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Tampón acetato pH 4,8 (50 mM) (mL)	1,5	1,4	1,3	1,2	1,1	1,0
Concentración final de glucosa, $g \cdot mL^{-1}$	---	0,0002	0,0004	0,0006	0,0008	0,001
Reactivo DNS (mL)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Los tubos fueron colocados en baño con agua a temperatura de ebullición durante 5 min e inmediatamente enfriados baño de agua corriente						
Agua destilada (mL)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

[i] Libros raros: aquellos que por su antigüedad o características se consideren raros o valiosos (Incunables, ediciones príncipe y originales, libros de los siglos XVI-XVIII, ediciones especiales de los siglos XIX y XX, ejemplares apostillados y/o dedicados por personalidades relevantes, ejemplares con ex-libris o super ex-libris relevantes, con encuadernaciones o ilustraciones valiosas, curiosos por su formato, impresos en materias poco comunes, ejemplares únicos o de los que se confirme que existan pocos ejemplares en Cuba y el mundo, aquellos salidos de las imprentas de los impresores extranjeros más relevantes de cada siglo, ejemplares numerados, ediciones de bibliófilo, ediciones privadas y facsímiles de lujo).
Libros impresos en la provincia o que contengan información relevante sobre esta, de autores naturales de la provincia o que contengan información sobre ellos, de los siglos XVIII y XIX, editados después de esta fecha que por su rareza bibliográfica tengan carácter patrimonial, publicados en el extranjero que se refieran a la provincia o a sus habitantes naturales, publicados en Cuba o el extranjero que sirvan de base al trabajo de referencia de la sala (Fundora, M.L., Rodríguez, G. (2007) Conservación de la colección de la Sala de Fondos Raros y Valiosos de la Biblioteca provincial "Martí" de Santa Clara, Villa Clara. Documentación de la Sala de Fondos Raros y Valiosos de la Biblioteca provincial "Martí" de Santa Clara, Villa Clara. Cuba.).

4. Resultados

4.1 Determinación del grado de afectación causado por insectos y hongos

Se inspeccionaron un total de 520 libros catalogados como raros y 57 revistas pertenecientes al siglo XIX.

Durante la inspección de libros y revistas no se encontraron insectos vivos o muertos, como tampoco ninguna estructura perteneciente a ellos, ni se detectó la presencia de excretas. Tampoco se observó erosión. Solo fueron observadas galerías. En el caso de los libros en 9 ejemplares (1,7%) y de las revistas en cinco (8,8%), presentando ambos grupos de documentos un grado de afectación por insectos bajo.

De los daños causados posiblemente por hongos solamente se observaron manchas con o sin micelio o áreas de enmohecido sin manchas.

Sesenta libros presentaban estas afectaciones, lo que representa un 11,5% del total, para un grado medio de afectación por hongos.

Un total de 13 revistas presentaron afectaciones presumiblemente causadas por hongos, lo que representa el 22,80% del total de revistas de la colección. El grado de afectación causado por hongos en este caso también fue considerado medio.

En la Figura 3 se muestran galerías causadas por insectos.

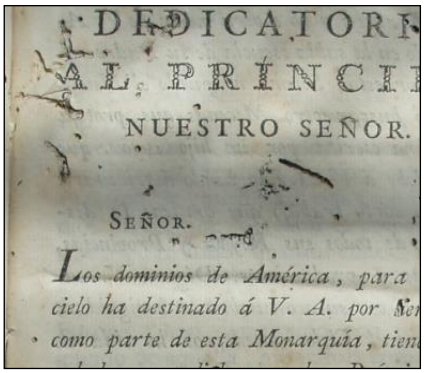

DEDICATORI
AL PRINCI
NUESTRO SEÑOR.
SEÑOR.
Los dominios de América, para
cielo ha destinado á V. A. por Se
como parte de esta Monarquía, tien

Figura 3. Galerías causadas por insectos.

En la Figura 4 se observan daños de los que se aislaron hongos filamentosos.

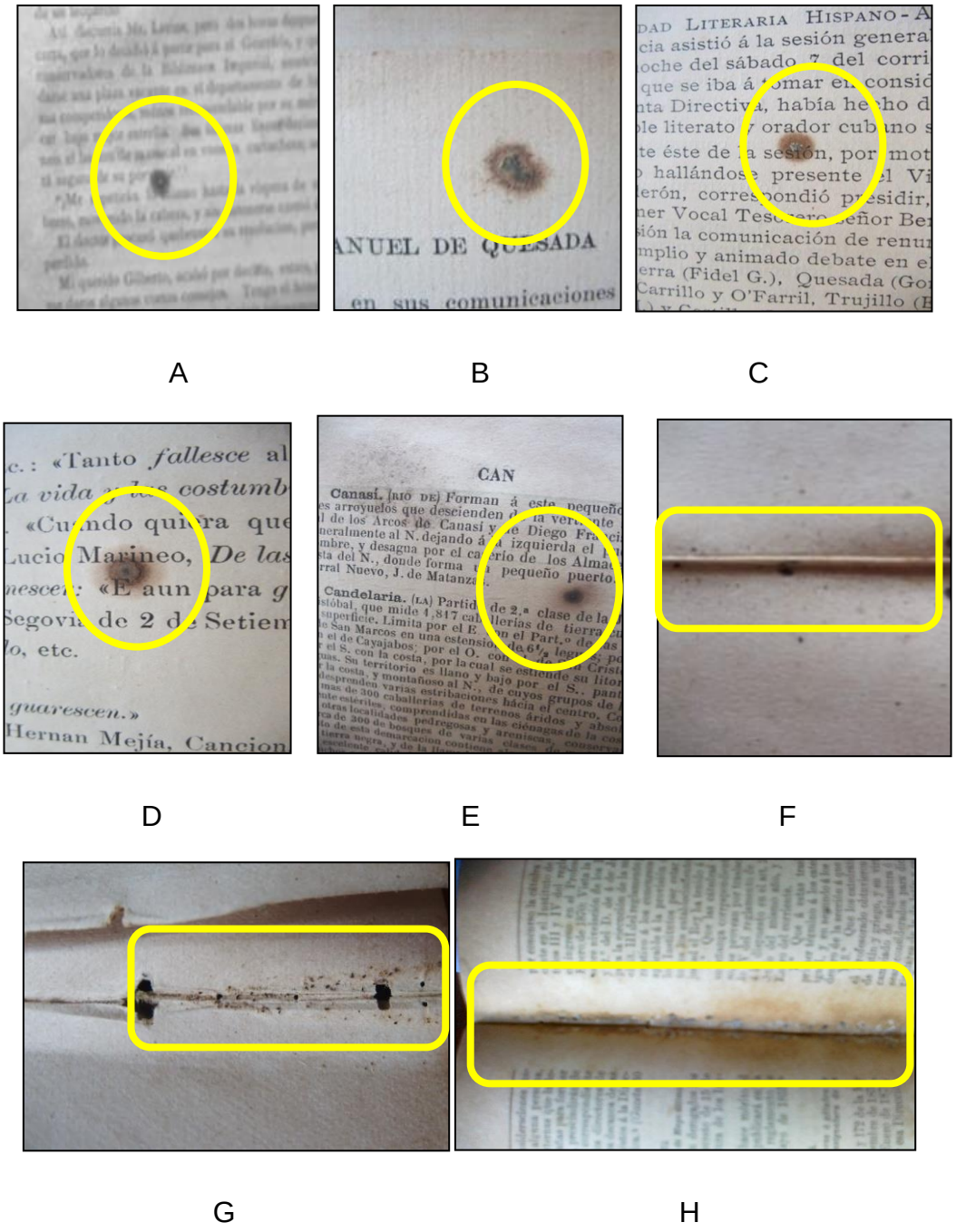


Figura 4. Alteraciones causadas por hongos filamentosos a los libros raros y revistas. F enmohecido, el resto, manchas y micelio.

En orden descendiente la frecuencia de aparición de las alteraciones para hongos son: manchas con micelio , manchas distintas de foxing y enmohecido . En el Anexo I se muestra un registro de los datos bibliográficos de los ejemplares que presentan alteraciones por insectos y hongos, su tipo y su ubicación.

4.2 Identificación de los insectos y hongos filamentosos

Según las características de los daños presentes en los documentos (galerías) se estimaron que fueron causados por insectos pertenecientes al Orden Isoptera.

De los 60 libros con daños presuntamente causados por hongos se seleccionaron 22 ejemplares que presentaban tipos de afectaciones diferentes, para ser muestreados con la finalidad del aislamiento fúngico. De las 13 revistas que presentaban alteraciones las 13 se muestrearon. Diecisiete aislamientos fueron positivos en total de 35 documentos muestreados.

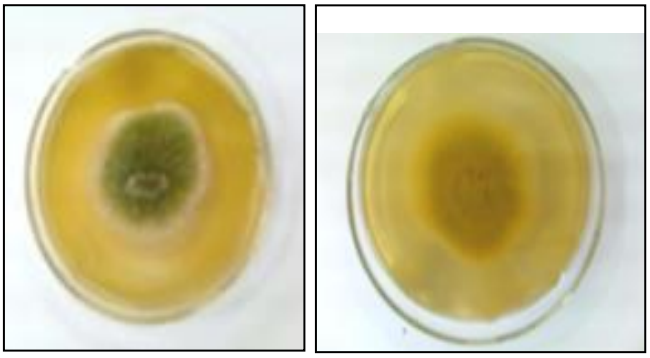
En la Tabla III se muestran los géneros fúngicos identificados. En una oportunidad se aislaron dos hongos con diferentes características de la misma alteración.

Tabla III. Identificación de cepas de hongos filamentosos aisladas de libros y revistas.

Cepa	Género	Cepa	Género
R1	*Penicillium*	L17	*Penicillium*
R6a	Hongo imperfecto	L18	*Penicillium*
R6b	*Trichoderma*	L19	*Penicillium*
R8	*Penicillium*	L19b	*Penicillium*
R10	*Penicillium*	L 21	*Penicillium*
L6	*Aspergillus*	L22	*Alternaria*
L13	*Penicillium*	L23	*Curvularia*
L14	*Penicillium*	L24	*Penicillium*
L16	*Aspergillus*		

De las 17 cepas aisladas, se agruparon todas aquellas que microscópica y culturalmente fueron iguales. De las 11 pertenecientes al género *Penicillium* se hizo un grupo de seis y otro de cinco, continuándose la investigación con dos cepas representativas de estos. El resto de los aislados fúngicos fue incluido en este grupo.

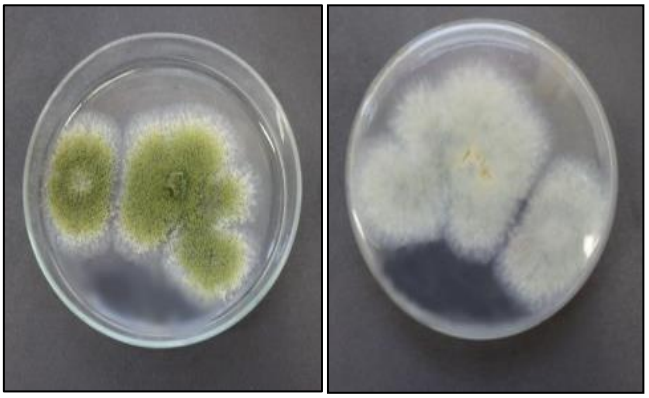
En las Figuras de la 5 a la 12 se muestran estos resultados. Se refiere también la alteración de la cual fue aislada mostrada en el acápite anterior (Ver Fig. 4).



Haz Envés

Figura 5.Cepa L6 *Aspergillus* sp.

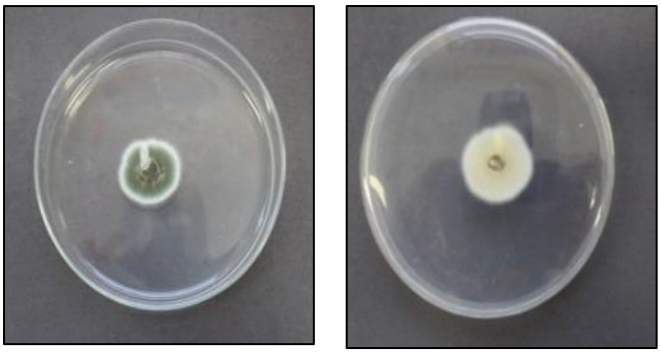
Aislada de la alteración A. Crecimiento a velocidad moderada y abundante, presenta en el envés dos colores, verde pistacho hacia el centro y verde amarillo hacia el borde en el reverso presenta color cromo limón, el margen es blanco y de 2mm.Textura suelta con tendencia a formar filamentos en la zona exterior. No transpira líquido y pigmenta el sustrato en PDA color cromo limón.



Haz Envés

Figura 6 .Cepa L16 *Aspergillus* sp.

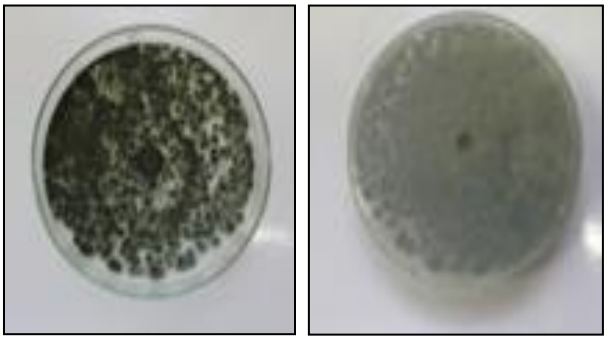
Aislada de la alteración C. Crecimiento a velocidad moderada y abundante, presenta en el envés dos colores verde pistacho hacia el centro y verde amarillo hacia el borde; en el reverso presenta color blanco; el margen es blanco de 2mm.Textura suelta con tendencia a formar filamentos en la zona exterior. No transpira líquido y no pigmenta el sustrato en PDA.



Haz Envés

Figura 7.Cepa L18 *Penicillium* sp.

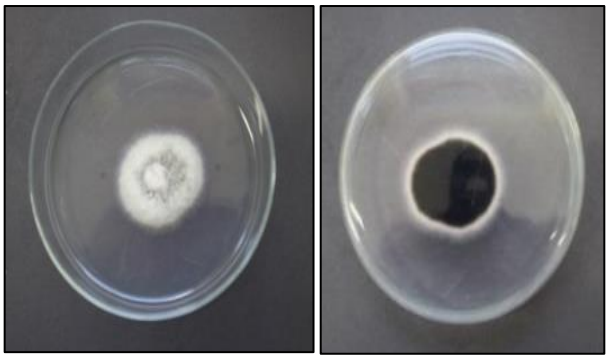
Aislada de la alteración F. Presenta una velocidad de crecimiento moderada y discreta. En el anverso presenta varios colores desde el centro hacia la periferia, hacia el centro es de color gris humo y hacia el margen es de color sepia, el reverso presenta color uniforme blanco crema y el margen es blanco aproximadamente de 4mm. Posee surcos radiales. Textura compacta y aterciopelada. No transpira líquido y no pigmenta el sustrato en PDA.



Haz Envés

Figura 8.Cepa L19b *Penicillium* sp.

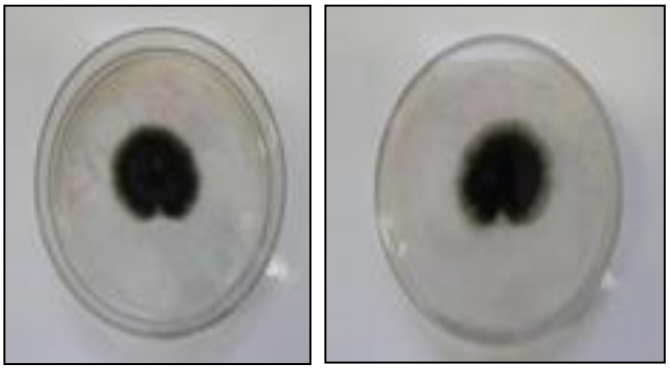
Aislada de la alteración B. Crecimiento rápido y abundante. Las esporas se dispersan con gran facilidad por toda la placa. Color uniforme tanto en el anverso como en el reverso, el anverso presenta gris verdoso y el reverso color sepia. Presenta margen de 2mm de color blanco. Presenta una textura aterciopelada. En PDA no pigmenta el sustrato y no transpira líquido.



Haz Envés

Figura 9. Cepa L22 *Alternaria* sp.

Aislada de la alteración G. Crecimiento a velocidad moderada y discreto, presenta color vario en mosaico en el anverso, hacia el centro es olivo grisáceo y hacia el borde es A, el reverso es uniforme siendo de color ocre el margen es de 6mm de color blanco. Textura vellosa. No pigmenta el sustrato en PDA y no transpira líquido.



Haz Envés

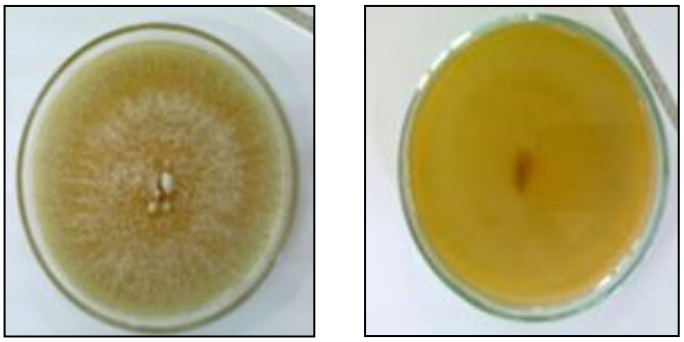
Figura 10 .Cepa L23 *Curvularia* sp.

Aislada de la alteración E .Crecimiento moderado y discreto. Presenta color uniforme en el reverso y en el anverso siendo de color negro y pardo cigarro respectivamente, el borde es verde pistacho y mide 3mm. Su textura es vellosa y posee tendencia a formar filamentos. No pigmenta el sustrato en PDA y no transpira líquido.

Haz Envés

Figura 11.Cepa R6a*Trichoderma* sp.

Aislada de la alteración H. Crecimiento rápido y abundante es zonal formando círculos concéntricos. Presenta en el anverso color verde hoja y hacia el reverso es de color gris verdoso. No forma borde. Su textura es suelta. No pigmenta el sustrato en PDA y no transpira líquido.



Haz Envés

Figura 12.Cepa R6b Hongo imperfecto.

Aislada de la alteración H. Crecimiento Rápido. Presenta color uniforme en el anverso siendo de color amarillo azufrado y en el reverso no se observa. Presenta textura suelta y vellosa. No transpira líquido y pigmenta el sustrato en PDA de color cromo limón. En este medio de cultivo bajo las condiciones de incubación utilizadas no forma conidios.

4.3 Evaluación de la capacidad deteriorante sobre papel de los hongos filamentosos aislados

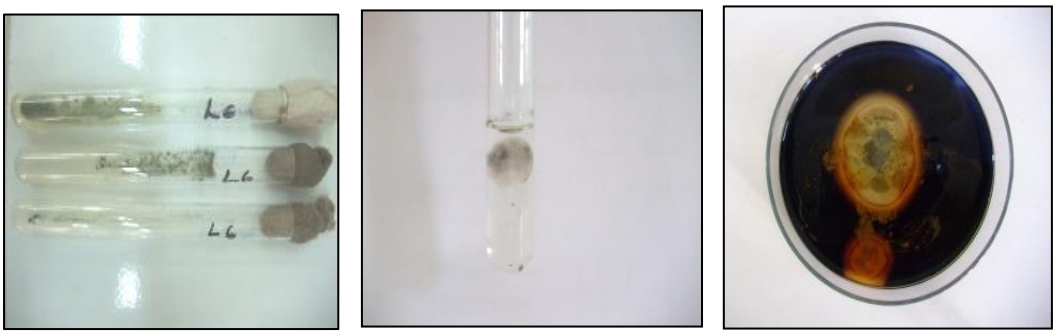
La capacidad deteriorante celulolítica de las cepas fúngicas evaluadas se muestra en la Tabla IV. (Ver Fig.12A).

Tabla IV. Actividad celulolítica y producción de ácidos de las cepas fúngicas aisladas.

		Capacidad celulolítica				Capacidad amilolítica	Capacidad proteolítica
Aislados	Género	Crecimiento con glucosa	Crecimiento con papel	Crecimiento con celulosa	Producción de pigmentos (color)	Hidrólisis del almidón	Hidrólisis de la gelatina
L6	*Aspergillus*	+++	+++	+++	olivo	Negativa	Positiva
L16	*Aspergillus*	+++	+++	++	Verde pistacho	Negativa	Positiva
L18	*Penicillium*	+++	+++	++	olivo		
L19b	*Penicillium*	+++	+++	++	-	Positiva	Positiva
L22	*Alternaria*	+++	+	+	-	Negativa	Positiva
L23	*Curvularia*	+++	++	+++	-	Negativa	Positiva
R6a	*Trichoderma*	+++	++	++	Verde amarillo	Negativa	Positiva
R6b	Hongo imperfecto	+++	++	++	-	Negativa	Positiva

Crecimiento abundante (75% del área o más): +++, Crecimiento moderado (50% del área): ++, Crecimiento pobre (25% del área): +.

Todas las cepas hidrolizaron la gelatina por lo que son positivas a la prueba proteolítica (Fig. 13B). Solo una de ellas (L19b) resultó positiva a la hidrólisis del almidón (Fig.13C).



A B C

Figura 13. A: Capacidad celulolíica de arriba hacia abajo: con glucosa, con papel, con celulosa; B: Respuesta confirmativa positiva a la hidrólisis de la gelatina. Se observa el disco de micelio dentro del medio de cultivo luego de

su licuefacción, cuando se agita el tubo de ensayo; C: Respuesta positiva a la hidrólisis del almidón.

3.4 Determinación cuantitativa de las actividades enzimáticas celulasa total sobre papel de filtro, β-endoglucanasa y β-glucosidasa

Los ensayos realizados para determinar cuantitativamente la actividad enzimática de *Aspergillus sp (cepa L6)* arrojaron los resultados que se muestran en la Figura 14. Todos los valores de concentración de glucosa determinados se encontraron dentro del rango de la curva estándar de glucosa y el valor de correlación obtenido fue R^2= 0.9775.

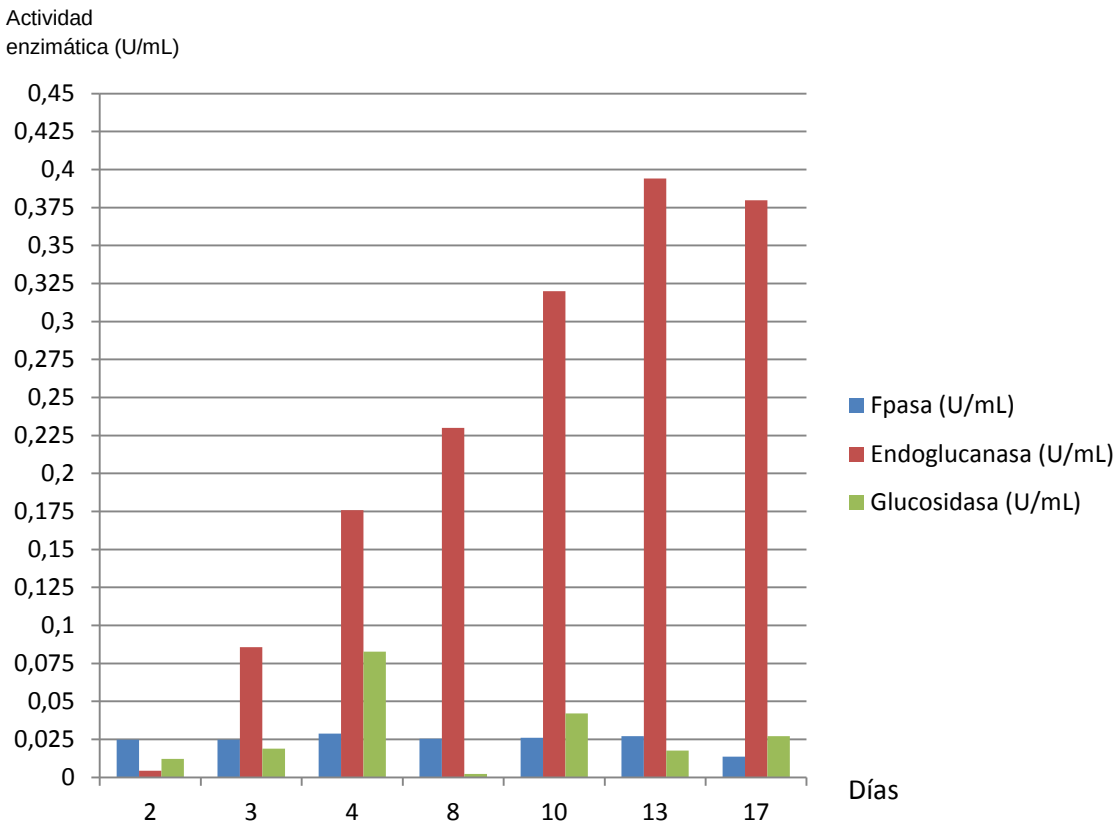


Figura 14. Actividades enzimáticas celulolíticas de la cepa *Aspergillus* sp. (L6).

5. Discusión

5.1 Determinación del grado de afectación causado por hongos e insectos

A partir de la inspección de los documentos se determinó que el grado de afectación por insectos fue bajo. Llama la atención el hecho de que no se hayan colectado insectos vivos, a pesar de que en muestreos realizados con trampas cebo se había determinado la presencia de psocópteros (Pino, 2013). Sin embargo esta autora concluyó que el riesgo de deterioro por estos en el Archivo es bajo, debido no solo a la naturaleza del daño (erosión), sino a la baja frecuencia de aparición de estos insectos. En particular en los estantes dónde se ubican los documentos revisados colectó 1; 1,72; 1,22 y 0,94 insectos por trampa (Pino, 2013). Posiblemente sí hubiese insectos en los libros inspeccionados, aunque con muy baja probabilidad, pero como esta se hizo en horario diurno, dado los hábitos de vida de los psocópteros estos estuvieran refugiados en busca de protección ante la luz (Vergara, 2002). Lo anterior explica el hecho de que no hayan detectado erosiones en los documentos, ya que estas solo son apreciables cuando las infestaciones por psocópteros son muy altas.

El grado de afectación por hongos en el soporte se clasificó como medio, de acuerdo al porcentaje de afectación detectado, aunque el local donde se encuentran almacenados estos documentos presentó un valor medio de 610 $UFC \cdot m^{-3}$ lo que conduce a la clasificación de Archivo POCO CONTAMINADO, según el estudio aerobiológico realizado por Pino, (2013). Aunque el archivo haya presentado esta clasificación se aislaron una gran diversidad de géneros que pueden bajo condiciones favorables establecerse en los documentos como se pudo constatar en esta investigación. Algunos investigadores refieren que la temperatura es un factor muy importante al igual que higroscopicidad en este sentido el local no está climatizado y aunque es muy ventilado las elevadas temperaturas pueden acelerar la oxidación de la celulosa y favorecer la aparición de microorganismos y su actividad enzimática, como la producción de ácidos orgánicos. Esto se traduce en la descomposición de la celulosa y el debilitamiento del soporte. Además resecan a los materiales higroscópicos y reblandecen los adhesivos y las colas (Bello y Borrell, 2002).

La disponibilidad de agua es uno de los principales factores que determina la colonización fúngica del papel. Este es un material higroscópico y por lo tanto la actividad hídrica de un documento está relacionada con los parámetros climáticos humedad relativa y temperatura. Temperaturas por encima de 23 °C y una humedad relativa sobre el 65% conducen a incrementos sustanciales en el número de microorganismos (Cappitelli *et al.*, 2010).

Entre las alteraciones que fueron encontradas en los soportes se destacan manchas de color pardo, manchas con micelio de color verdoso así como enmohecido que empalidecen el soporte. En muchas ocasiones, estas alteraciones son llamadas cromáticas donde se manifiesta la presencia de manchas de diferentes colores (rosado, violeta, carmelita, negro, verde entre otros), estas pueden ser delimitadas o difusas, más o menos grandes, pero nos sirven como criterio de identificación del agente deteriorante en cuestión (Vaillant, 1992).

5.2 Identificación de los insectos y hongos filamentosos

En el caso de las alteraciones provocadas por insectos, las galerías, permitieron identificar el Orden al que deben de pertenecer a partir de sus características. A partir de estas puede referirse que las alteraciones de los documentos analizados fueron provocadas por insectos pertenecientes al Orden Isoptera.

Estas alteraciones se deben a infestaciones antiguas, habiéndose limpiado los documentos en algún momento. Esta observación se basa en el hecho de que se detectó la presencia de galerías limpias, con bordes lisos y en forma vertical, con un diámetro aproximadamente igual a la punta de un lápiz, pero no restos de alas pertenecientes a las formas reproductoras, ni de excremento granulado que observados al estereoscopio o a través de una lupa semejan a un balón de fútbol deshinchado parcialmente, que en caso de proceder de un montón son de igual color, forma y tamaño según se refiere en la literatura científica (UNESCO, 1988).

A partir del estudio realizado se aislaron hongos de soportes de papel pertenecientes a los géneros *Penicillium, Aspergillus,Trichoderma, Alternaria y Curvularia*, los que se describen a continuación:

El género *Penicillium* fue descrito por primera vez por Link en1809.Las especies del género *Penicillium* son ubicuas, de amplia distribución por todo el mundo y consideradas saprófitas. Para su reconocimiento se tiene en cuenta si su conidióforo presenta ramificaciones o no, pues algunas especies carecen de ésta característica. Macroscópicamente, las colonias son verde-grisáceas o con los colores verde y gris entremezclados, cafés al envejecer, algodonosas, de crecimiento rápido y amplio, con margen ancho en las primeras fases de desarrollo. Su reverso es ordinariamente amarillo y el medio de cultivo es incoloro, algunas veces sobre las colonias se tiene presencia de exudados de color dorado (Koneman, 1997). Microscópicamente, los conidióforos emergen por separado y algunos a manera de ramas cortas. Las fructificaciones conidiales presentan una o dos ramas alternas. Sus conidios son globosos, pequeños aunque también fusiformes de color azul-verdoso (*op. cit.*).

Aspergillus Nees: Colonias generalmente lanosas y harinosas, de colores variables que van desde tonalidades claras a pardas. Conidióforo recto, simple, que termina con una vesícula que produce fiálides, o métulas y fiálides en forma empalizada. Producen fialoconidios en cadenas basípetas, unicelulares globosos, frecuentemente ornamentados (op cit.).

Curvularia Boedijn : Colonias negras con abundante micelio, algodonosas. Conidióforos erectos, pigmentados, geniculados con crecimiento simpodial. Poroconidios simples, generalmente curvados, clavados o elipsoidales, con tres o más septos transversales y las células terminales más claras (op cit.).

Alternaria Micheli: Colonias pardas y lanosas. Forman conidios de color pardo claro a pardo oscuro. Conidióforos principalmente simples y usualmente geniculados por crecimiento simpodial. Poroconidios solitarios o en cadenas acrópetas, compuestos por un cuerpo elipsoidal con una base ancha redondeada y un extremo apical puntiagudo. Muriforme con septos transversales y longitudinales (op cit.).

Trichoderma Pers: Colonias de consistencia harinosa, en ocasiones forman círculos concéntricos, coloración verde oscuras a verde claro o amarillo. Conidióforos hialinos, muy ramificados, no verticilados; fiálides simples o en grupos. Conidios (fialosporas) hialinas, de una célula, ovoides, nacen en pequeños clusters terminales. Usualmente fácilmente reconocidos por su rápido crecimiento y color verde de sus conidio en forma de cojín (op cit.).

Del total de cepas aisladas de los documentos muestreados el género más representativo fue *Penicillium,* representando el 64,70% del total, seguido por Aspergillus quien representa el 11,76%. Cepas de estos géneros fueron aislados del aire del Archivo donde están los documentos objeto de estudio por Pinos, (2013) en su estudio aereobiológico. Sin embargo esta autora identificó a hongos filamentosos pertenecientes a géneros no encontrados en los documentos.

La habilidad de los microorganismos de colonizar en ambientes interiores está influenciado por las características químicas o físicas de los componentes que presentan los materiales que ellos colonizan. Entre los factores más importantes, los componentes nutricionales derivados del contenido del sustrato repercuten en el comienzo del desarrollo de las colonias microbianas. Además el crecimiento de los microorganismos depende del mayor grado de disponibilidad de agua retenida en el soporte. Desde el punto de vista microbiológico, la humedad presente en materiales porosos e higroscópicos es descrito mediante los parámetros de actividad hídrica (aw). Varios autores han mostrado que se requiere una actividad hídrica mínima igual a 0,65 para iniciar el crecimiento microbiano en una material que contenga suficientes sustancias nutritivas (Hyvärinen *et al.,* 2001; Shelton *et al.*, 2002) .

Pinos (2013) determinó que en el Archivo de la Sala de Fondos Raros y Valiosos de la biblioteca “Martí” hay un ambiente poco húmedo, detectándose diferencias con el ambiente exterior. Esto se debe a las características constructivas del local, con un puntal muy alto, muy buena impermeabilización y grandes ventanas; condiciones que garantizan una ventilación elevada.

El hecho de que esta autora no refiera a *Trichoderma*, *Curvularia* y *Alternaria* entre los géneros presentes en el aire, puede deberse a que el número de aislamientos identificados por esta fue bajo.

El género *Penicillium* que fue el aislado que se obtuvo en mayor porciento es uno de los más referidos en la literatura científica como causante de biodeterioro en material de archivo y específicamente en papel (Bello y Borrel, 2002), su capacidad enzimática le permite degradar las fibras, además de provocar acidez y manchas verdes en el soporte (Calvo *et al.,* 2005). Además de que ha sido aislado del ambiente, también ha sido aislado a partir de documentos a pesar de ser muy difícil su aislamiento de la superficie de objetos

de arte y documentos (Florian, 2002). En estudios realizados en el patrimonio documental y en el ambiente de diferentes archivos en países tropicales, incluyendo Cuba, ha sido uno de los géneros con mayor frecuencia de aparición (Hyvärinen *et al.,* 2001; Shelton *et al.*, 2002; Medrela-Kuder, 2003).

Hongos de este género tienen la capacidad de degradar celulosa y xilano, actividades enzimáticas accesorias; arabinofuranosidasa, xilosidasa y acetil-esterasa, para la degradación completa de los polímeros (Villalba *et al*., 2004). Lo anterior puede sugerir que estos microorganismos, además de utilizar la celulosa, pueden degradar otros compuestos como la goma arábiga utilizada como encolante, la cual al hidrolizarse produce arabinosa, galactosa, ramnosa y ácido glucurónico (Caneva *et al.*, 1991).

Muchos de los hongos nombrados son responsables de causar el biodeterioro de los libros, objetos de arte, material audiovisual, pintura, papel tapiz, madera, murales, pieles y otros (Gallo, 1992), destacando que los géneros *Aspergillus, Penicillium, Trichoderma, Stachybotris, Stemphilium, Alternaria, Rhizopus* sp *y Mucor* sp son los que mayormente causan el biodeterioro de libros. Además, en una recopilación bibliográfica de trabajos sobre biodeterioro encontraron que los géneros más frecuentemente mencionados son *Penicillium, Aspergillus, Cladosporium* (Nugari *et al*., 1993.).

La presencia de estos géneros tanto en el aire como en el soporte de documentos ha sido referenciada por diversos investigadores siendo todos ellos muy comunes en bibliotecas y archivos. Las concentraciones de esporas fúngicas van a estar influenciadas por parámetros ambientales como la temperatura, humedad, corrientes de aire, precipitaciones y factores como la limpieza, edad y condiciones del establecimiento; así lo señalan, (Ricci *et al*., 1995.) quienes relacionaron las concentraciones de esporas fúngicas de *Alternaria* sp con parámetros meteorológicos; y (Herrero *et al*., 1995.) al realizar un estudio aerobiológico de esporas fúngicas en la ciudad de Palencia (España), donde además reconocieron 26 géneros fúngicos y las mayores concentraciones fueron para *Aspergillus* sp (23%), y *Penicillium* sp (16%).

En un estudio de hongos llevado a cabo en bibliotecas de la Universidad de Carabobo-Valencia los géneros detectados por el método de raspado de libros que más se encontraron corresponden a *Aspergillus* sp y *Zigomicetes* (*Mucor* sp, *Rhizopus* sp, *Absidia* sp), el 87,95% del total de colonias. Los géneros

encontrados en este último método, son los mismos que se obtuvieron en el muestreo ambiental de las bibliotecas de esta universidad (Medina *et al. 1999,)* lo que se relaciona con los resultados obtenidos de nuestra investigación donde se aislaron de los soportes hongos presentes en el aire del local.

El género *Aspergillus* en particular es considerado uno de los principales responsables del biodeterioro debido a que el gran número de especies que comprende el género representa un espectro ecológico muy amplio, el cual puede utilizar una gran variedad de sustratos. De hecho este género ha sido aislado del suelo, del aire, de la vegetación y de materiales como el papel, madera, textiles, pieles, pinturas, gomas, plásticos, vidrio, productos farmacéuticos industriales, etc (op. cit).

En un estudio realizado por Fernández (2008) se aislaron un total de 24 cepas, todas en el grupo de hongos filamentosos. Fueron identificadas a partir de los cultivos puros por taxonomía convencional, representándose en los géneros *Penicillium, Aspergillus, Fusarium, Cladosporium, Tritiriachium*. Los géneros *Penicillium y Aspergillus* fueron los más abundantes, representando 29 y 25 % del total.

Por otra parte Vargas (2004) ubica a estos géneros en el grupo de los organismos patógenos oportunistas capaces producir enfermedades respiratorias, como la aspergillosis, la cual dependiendo del estado del sistema inmune se puede desarrollar de diferentes formas como son: Aspergilosis cutánea primaria, Aspergilosis sinoorbitaria, Aspergilosis pulmonar, Aspergilosis del Sistema Nervioso Central y Aspergilosis invasiva diseminada. Las especies del género *Penicillium* son capaces de causar afecciones cutáneas, respiratorias y diseminadas en pacientes inmunocomprometidos, además es un alérgeno común. Produce alergias del Tipo I y III, produce toxinas dañinas al hombre y produce compuestos orgánicos volátiles que dan un fuerte olor a moho o algo mohoso y que resultan irritantes.

Los hongos pertenecientes al género *Curvularia* producen una enfermedad llamada Feohifomicosis, la cual desde el punto de vista clínico se caracteriza principalmente por una localización subcutánea quística crónica, afectación de senos paranasales o una forma invasiva generalizada también es un alérgeno común que produce alergias del Tipo I ocasionando con mucha frecuencia sinusitis alérgica por hongos, también puede causar queratitis ocular,

neumonías y en pacientes inmunodeprimidos o con tratamientos de esteroides puede provocar endocarditis, absceso cerebral y diseminación de la infección. El género *Alternaria* es considerado un alérgeno común que produce alergias del Tipo I y III, además produce lesiones nasales, subcutáneas, oculares y en uñas, puede producir toxinas dañinas a la salud y otras que tienen propiedades mutagénicas, así como producir micosis severas (Martínez, 2003 y Ellis, 2006). Es conocido que la pared de las esporas fúngicas está compuesta por sustancias (β [1-3]-D-glucanos) que desencadenan reacciones tóxicas en el organismo de los seres humanos (Gorny *et al*., 2002) aun cuando estas no son viables, provocando reacciones no específicas como fatiga, dolor de cabeza, irritación de ojos, nariz y garganta (Borrego *et al*., 2008). Las micotoxinas de muchos hongos pueden ingresar al cuerpo por las vías respiratorias. Se ha registrado por lo menos un caso de síntomas neurotóxicos posiblemente relacionados con la exposición a micotoxinas transportadas por el aire en un ambiente muy contaminado (Baxter *et al*., 1981). La piel es otra vía potencial de exposición a las micotoxinas. Las toxinas de diversos hongos han producido casos de dermatosis severa (Eagle Industrial Hygiene Associates, 2004). En vista de que las micotoxinas provocan serios efectos tóxicos, debería hacerse mínima la exposición a los hongos que las producen (Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente, 2004). Por lo anterior, se sabe que los hongos son agentes que pueden afectar la salud de las personas, provocándoles reacciones que generalmente se agrupan en tres categorías: reacciones alérgicas (asma, rinitis alérgica, neumonía por hipersensibilidad), infecciones (aspergilosis, micosis cutánea) y respuestas por toxicidad a determinadas sustancias (Borrego *et al*., 2008).

5.3 Evaluación de la actividad deteriorante sobre papel de los hongos filamentosos

Las ocho cepas fúngicas identificadas fueron capaces de crecer a expensas del papel de filtro y la celulosa cristalina como única fuente de carbono. El crecimiento fue más del 50% en siete cepas y solo *Alternaria* tuvo un crecimiento más limitado sobre la cuña del medio de cultivo, pero en general las ocho cepas crecieron sobre estos medios lo que prueba que aunque el ensayo es semicuantitativo, las cepas son altamente celulolíticas. Se aprecia

que la intensidad en la coloración del crecimiento fúngico debido a la esporulación de los hongos es diferente entre los tres medios de cultivo, incluyendo el control con glucosa como fuente de carbono, siendo mayor en papel de filtro, esto junto a la producción de pigmentos de cuatro aislados constatan el riesgo de biodeterioro de los documentos en papel, almacenados en el Archivo.

De igual forma, el 100% de las cepas crecieron en celulosa cristalina, de más difícil asimilación, lo que respalda el planteamiento anterior.

Todas las cepas fúngicas presentaron actividad proteolítica. Por otra parte, solo uno de los aislados fue capaz de degradar el almidón. Por lo que este es el de mayor potencial deteriorante.

Estos resultados permiten demostrar que los hongos presentes en el ambiente del Archivo pueden incidir en el deterioro de los documentos de presentarse condiciones que propicien su desarrollo sobre el papel. Incluso si la humedad relativa aumentara por cualquier motivo, sus esporas se depositarían con mayor rapidez sobre los documentos y podrían desarrollarse en 24 h comenzando a degradarlo aceleradamente (Borrego *et al*., 2008)

Del total de cepas aisladas cuatro de ellas produjeron pigmentos siendo estos de color olivo, verde pistacho y verde amarillo. Los pigmentos son sustancias químicas que imparten color a otros materiales por el efecto óptico de la refracción de la luz. Los pigmentos producidos y excretados por los hongos ocasionan manchas sobre los sustratos cuya eliminación es muy difícil. Resultando esta consecuencia uno de los problemas más graves que origina la contaminación microbiológica (op.cit). En la investigación realizada por (Fernández, 2008.) del total de cepas aisladas, siete produjeron pigmentos. Los colores de los pigmentos que se evidenciaron fueron amarillos, ocres y rojos, estas manchas indeseables y perdurables disminuyen y afectan la calidad del patrimonio en general.

5.4 Determinación cuantitativa de las actividades enzimáticas en papel de filtro, β-endoglucanasa y β-glucosidasa

En la literatura científica consultada sobre actividad biodeteriorante de cepas fúngicas en soporte de valor patrimonial no apareció la evaluación cuantitativa de la actividad celulolítica. Estas determinaciones son frecuentes en artículos

científicos donde se refiere la utilización de hongos filamentosos para la degradación de residuos lignocelulósicos con fines industriales (Rodríguez y Piñero, 2007; Colina y Gutiérrez-Correa*,* 2009; Manjarrés, *et al.,* 2011).

En el año 2012 se realizó un estudio por (González ,2012) en una biblioteca donde se aisló una cepa perteneciente al género *Aspergillus* que fue identificado como *A.sclerotium.* La mayor actividad FPasa que presentó el aislado *de Aspergillus slerotiorum* fue de 0,031 U· mL^{-1} a los 17 días de incubación en nuestra investigación el mayor valor obtenido para nuestro aislado fue de 0.027 UmL^{-1} al día 13 siendo menor. Esto pudiera deberse en primer lugar a la utilización de medios de cultivos diferentes pues la autora utilizó como fuente de carbono glucosa y en nuestra investigación la fuente de carbono fue papel de filtro con el objetivo de acercarnos más a la realidad, pues en las condiciones reales los hongos están creciendo sobre papel y tendrán que degradar la celulosa para obtener la glucosa.

Sin embargo los valores obtenidos para la actividad β-endoglucanasa fueron muy superiores a los obtenidos por González (2012) en su estudio, pues se obtuvo como valor máximo 0.3940 UmL^{-1} al día 13 en nuestra investigación, mientras ella obtuvo 0.02 UmL^{-1}al día 17.

Manjarrés y colaboradores (2011) determinaron la actividad FPasa en un cultivo superficial en una especie de *Aspergillus* obteniendo un valor máximo de actividad enzimática de 0,15 U·mL^{-1} a los nueve días de fermentación.

Villena y Gutierrez-Correa (2003) al cuantificar la actividad FPasa de *Aspergillus niger* ATCC 10864 en un cultivo superficial, encontraron una actividad máxima de a 1,4 U·mL^{-1} a las 24 horas de cultivo. Sin embargo en un cultivo sumergido empleando el mismo medio de cultivo el valor máximo fue de 1,0 U·mL^{-1}. Lo anterior pudiera explicarse por la menor disponibilidad de oxígeno y crecimiento de biomasa bajo la segunda condición, que correspondió con el sistema de fermentación empleado en la presente investigación. Por otro lado los autores referidos realizaron sus investigaciones con cepas de actividad celulolítica reconocida en la degradación de residuos celulósicos. El aislado de *Aspergillus* evaluado se obtuvo a partir de un discreto crecimiento micelial sobre papel, lo cual pudiera explicar el menor valor de actividad enzimática obtenida y su expresión más tardía. Además aquellos incorporaron al medio de cultivo inductores que estimularon al complejo enzimático celulolítico.

El incremento de la actividad metabólica está relacionado con la densidad celular. Se ha comprobado que la producción de celulasa cuando el hongo se encuentra creciendo sobre un soporte es mayor que cuando se encuentran en un cultivo libre. La adsorción de los microorganismos a superficies genera una respuesta fisiológica distinta reflejada en el aumento de la producción de celulasas (Villena *et al.,* 2001).

Se observaron mayores resultados de la actividad β-endoglucanasa que FPasa y β-glucosidasa , es importante destacar que dentro del papel no todas las moléculas de celulosa tienen el mismo grado de polimerización, puede encontrarse en forma cristalina es decir organizada formando una red regular con enlaces por puente de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares. Aunque la celulosa forma esta estructura cristalina precisa, la celulosa natural no es puramente cristalina pues presenta algunos sitios amorfos (Magalhães y Milages, 2008) por lo que la expresión en mayor cantidad de una u otra enzima depende mucho de las adaptaciones que haya desarrollado el microorganismo en el medio donde tenga que estar adaptado para sobrevivir, pero según el mecanismo de acción del complejo de la celulasa la enzima β- Endoglucanasa actúa sobre las regiones no cristalinas de la fibra de celulosa amorfa, estas enzimas conducen a la formación de cadenas libres, sobre cuyo extremo reductor actúan las exoglucanas que remueven hidrolíticamente pequeñas unidades de celobiosa y glucosa sobre las cuales actúa la β-glucosidasa (op. cit.).

6. Conclusiones

1. Se determinó que el grado de afectación en los libros raros y las revistas del Siglo XIX por insectos es bajo y por hongos es medio.
2. No se encontraron insectos vivos, restos o excretas solo galerías provocadas por insectos del Orden Isoptera.
3. Se identificaron los géneros *Penicillium, Aspergillus, Curvularia, Alternaria* y *Trichoderma*, con prevalencia de los dos primeros.
4. Las actividades celulasas de Aspergillus sp. (L6) obtenidas son bajas, pero se expresan tempranamente.

7. Recomendaciones

1. Evaluar las actividades enzimáticas celulasas de otros de los aislados fúngicos obtenidos y compararlos entre sí.
2. Evaluar la producción de ácidos de las cepas fúngicas.
3. Utilizar el diagnóstico de las alteraciones causadas por insectos y hongos y la viabilidad de estas últimas para trazar una estrategia de conservación y restauración de los documentos de la Colección de Libros Raros y Valiosos y de las revistas del siglo XIX de la Biblioteca Provincial “Martí”.

Literatura citada

- Allsopp, D., Seal, K., Gaylarde, C. (2004): Introduction to Biodeterioratión, 2nd ed. Cambridge University Press. Cambridge. United Kingdom.
- Asunción, J. (2001): El papel: Técnicas y métodos tradicionales de elaboración Barcelona. España, Paramón Ediciones S. A.
- Atlas, N. & Bartha, R. (2002): Ecología microbiana y Microbiología Ambiental., Madrid.España, Pearson Educación S.A.
- Barnett, H. L. & Hunter, B. B. (1998): Illustrated Genera of Imperfect Fungi, St. Paul. Minnesota.
- Baxter C.S. Wey H.E. and Burg W.E. (1981): A prospective analysis of the potential risk associated with inhalation of aflatoxin-contaminated grain dusts. Food Cosmet Toxicol., 19, 763-769.
- Beck, I. (1992): Manual de Conservación de Documentos. México D.F: Archivo General de La Nación.
- Bello, C. y A. Borrell (2002): El patrimonio bibliográfico y documental. Claves para su conservación preventiva. España. 65-73.
- Berg, J. M., Tymoczkoy, J. L. & Stryer, L. (2002): *Biochemistry*.
- Borrego, S. (2009): Factores externos que influyen en el deterioro del patrimonio documental. En: Conservación preventiva en archivos y bibliotecas. Bergaglio C., Pené M. (eds). 1ra. Ed. La Plata: Instituto Cultural de la Provincia de Buenos Aires, pp. 67-124.
- Borrego, S., Guiamet, P., Gómez de Saravia, S., Battistoni, P., García, M., Lavín, P., Perdomo, I. (2010 a): The quality of air at archives and the biodeterioration of photographs. International Biodeterioration and Biodegradation, 64: 139-145.
- Borrego, S., Perdomo, I. (2011): Aerobiological investigations inside repositories of the National Archive of the Republic of Cuba. Aerobiología, DOI: 10.1007/s10453-011-9235-x (in press).
- Borrego, S., Pons, V., Perdomo, I. (2008): La contaminación microbiana del aire en dos depósitos del Archivo Nacional de la República de Cuba. Revista CENIC Ciencias Biológicas, 39: 63-69.
- Calvo, A., Adelantado, C., Corcuera, E. (2005): Principales características de los hongos causantes de alteraciones en materiales celulósicos. Boletín del instituto Andaluz del patrimonio histórico,N_O 53,18-23.
- Caneva, G; Nugari, M.P; Salvadori, O. (1991): Biology in the conservation of works of art. OCCROM. Rome. 61-148.
- Caneva, G; Nugari, M.P; Salvadori, O. (2000): La Biología en la restauración. Hondarribia:Nerea, S.A.
- CMPC. (2005): Composición química del papel y clasificación de la celulosa.Santiago de Chile. Chile: Industria chilena del papel.

- Cappitelli, F. Sorlini, C. (2005): From papyrus to compact disc: the microbial deterioration of documentary heritage. Crit. Rev. Microbiol., 31: 1-10.
- Cappitelli, F., Sorlini, C. (2010): Papers and Manuscripts. Cultural Heritage Microbiology: Fundamental Studies in Conservation Science. Eds. Ralph Mitchell & Christopher J. McNamara. ASM Press, Washington, DC.
- Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (2004). Contaminación del Aire en Interiores. Una Introducción para los Profesionales de la Salud. http://www.Ambientecologicowww.htm.
- Colina, G.K. y M. Gutiérrez-Correa (2009): Cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 from different cellulosic substrates. Revista Técnica de Ingeniería Universitaria. Zulia. 32(2).
- Eagle Industrial Hygiene Associates (2004): Microbial Sampling and Analysis: molds and bacteria, http://www.eagleih.com/micro.html.
- Edimburgh, R. B. G. O. (1969): Colour Identifications chart [Online]. Edimburgh: Royal Botanic Garden. Available: www.rbge.org.uk/ [Accessed 26.febrero 2011].
- Ellis, M. B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes, Kew.
- Fernández, L. (2008): Evaluación de contaminación fúngica en un depósito de libros. Caracterización fisiológica de los aislados.
- Florian, M.L.E. (2002): The four components of biodetrioration and of preservation of our collective memory. International Symposium a Choice and Strategies for Preservation of a Collective Memory. Dobbiaco, Toblach, Italy.
- Florian, M.L.E. (2004): Fungal facts. Solving fungal problems in heritage collections. Archetype Publications Ltd., London, UK.
- Fundora, M.L., Rodríguez, G. (2007): Conservación de la colección de la Sala de Fondos Raros y Valiosos de la Biblioteca provincial “Martí” de Santa Clara, Villa Clara. Documentación de la Sala de Fondos Raros y Valiosos de la Biblioteca provincial “Martí” de Santa Clara, Villa Clara. Cuba.
- Galiotou-Panayotou, M., M. Kapantai y O. Kalantzi (1997): Growth conditions of Aspergillus sp. ATHUM-3488 for polygalacturonase production. Applied Microbiology and Biotechnology. 47: 425-429.
- Gallo, F. (1985): Biological factors in deterioration of paper. Facteurs biologiques de deterioration du papier. Roma ICCROM: Sintesi Gráfica s.r.l., , p. 129-143.
- Gallo, F. (1992). Il biodeterioramento di libri e documenti. , Italia, Centro di Studi per la conservazione della carta. .

- Gallup D. (2006): (Chairman). Fungal library. The Environmental Reporter EMLab. A technical Newsletter for IAQ Professionals. http://www.emlab.com/app/fungi/Fungi.po.
- García, T. (1997): Consideraciones sobre la microbiota de la Mapoteca del Archivo Nacional. Trabajo de diploma. Facultad de Biología. Universidad de la Habana.
- Gorny R.L., Reponen T., Willeke K., Schmechel D., Robine E., Boissier M. and Grinshpun S.A. (2002): Fungal fragments as Indoor air biocontaminants. Appl. Environ. Microbiol., 68, 3522-353.
- Guiamet, P. S.; Lavin, P.; Gómez de Saravia, S.G (2009): Microorganismos que afectan diferentes soportes de información. Revista Argentina de Microbiología, vol. 41, núm. 2, , p. 117.
- Guiamet,P; P.Battistonis. Gómez de Saravia.Biodeterioro. (2008):¿Dónde estás? Desde la patagonia difundiendo saberes ,VoL. 5 núm. 7.
- Hawksworth, D., Kirk, P. M., Sutton, B. C., Pegler, D., Ainsworth, N. & Bisby 1995. Dictionary of Fungi, Wallingford, CAB INTERNATIONAL.
- Herrero, B; Fombella, A; Fernandez, D; Valencia, R. (1996): Aerobiological study of fungal spores from Palencia (Spain). Aerobiología Vol 12, N° 1. 27-35
- Hyvärien, A., M. Vahteristo, T. Meklin, M. Jantunen y A. Nevalainen (2001): Temporal and spatialvariation of fungal concentrations in indoor air. Aerosol Science and Teachnology. 35: 688-695.
- Iwatzu, T. (1984): A new species of Cladosporium from Japan. Mycotaxon XX. 521-533.
- Kaiser, P. (1988) : Elements de bacteriologie appliquée. Patrimoine culturel et alterations biologiques: Actes des Journees d' Estudes de la S.F.I.I.C, Poitiers. París: Section Francaise de l'Institut International de Conservation, 27-43.
- Karbowska-Berent, J., Górny R.I., Strzelczyk A.B., Wlazło A. (2011): Airborne and dust borne microorganisms in selected Polish libraries and archives. Building and Environment, 46:1872-1879.
- Koneman, E. (1997): Micología Práctica de Laboratorio. 3a Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 221p.
- Liénardy, A; Van damme, P. Folia.(1989): Manuel de conservation et de restauration du papier. Bruxelles: Institut royal du Patrimoine artistique,.
- Magalhães, P.O., Milagres A.M.F. (2008): Importância das celulases produzidas por basidiomicetos causadores de podridão branca na biodegradação de lignocelulosicos. Microbiologia in foco, 2: 4-12.
- Manjarrés, K., Y. Piñeros y E. Rodriguez-Sandoval (2011): Evaluación del complejo enzimático producido mediante el cocultivo de *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp. en fase sólida sobre residuos de palma. Bioagro. 23(1): 19-26.

- Martínez, H. (2009): “Caracterización de la microbiota contaminante del depósito de fondos de la biblioteca del Museo Nacional de la Música.” Trabajo de Diploma. Facultad de Biología, Universidad de Universidad.
- Martínez, P. (2003): Determinación de la acidez producida por hongos contaminantes en bienes culturales. Boletín Patrimonio y Desarrollo, 9: 3-4.
- Medina, L., Tuozzo, A., Herrera,J.,Perozo,Y., González, L. (1999): Estudio de hongos en bibliotecas de la universidad de Carabobo-Valencia. Vol. 3, N° 1.
- Medrela-Kuder, E. (2003): Seasonal variations in occurrence of culturable airbone fungi in autdoor air in Craców. International Biodeterioration and Biodegradation. 52(4): 203-205.
- Michaelsen, A., Piñar, G., Pizari, F. (2010): Molecular and Microscopical Investigation of the Microflora Inhabiting a Deteriorate d Italian Manuscript Dated from the Thirteenth Century. MicrobEcol, 60:69– 80.
- Mitchell, R., Mcnamara, C.J. (2010): Culural Heritage Microbiology. Fundamental Studies in Conservation Science. Ed.ASM Press. American Society for Microbiology, 1752 N Street, N.W.Washington, DC 20036-2904.
- Morales, R., Ramírez, T., Vázquez, J.R. (1985):Factores que afectan la conservación del patrimonio bibliográfico de la Sala de Fondos Raros y Valiosos de la Biblioteca provincial “Martí” de Santa Clara, Villa Clara y su posible incidencia negativa en la salud de los trabajadores. Documentación de la Sala de Fondos Raros y Valiosos de la Biblioteca provincial “Martí” de Santa Clara, Villa Clara. Cuba.
- Mosquera, C. S. (2000):El reciclaje del papel, celulosa y Trichoderma reesei. Tesis, Universidad de Cauca.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. 2005. *Principles of Biochemistry.*
- Nevalainen, A., Morawska, L. (eds). (2009): Biological Agents in Indoor Environments. Assessment of Health Risks. Work conducted by a WHO Expert Group between 2000-2003. http ://www. ilaqh.qut.edu.au/Misc/ BIOLOGICAL_AGENTS_2009.pdf.
- Nugari, M; Realini, M; Roccardi, A. (1993): Contamination of mural paintings by indoor airborne fungal spores. Aerobiología. Vol. 9, N° 2-3. 131-39.
- Pino, E. (2013): Riesgo de deterioro de documentos en la Sala de Fondos Raros y Valiosos de la Biblioteca Provincial “Martí” de Villa Clara, Cuba. Trabajo de Diploma. Licenciatura en Biología, Universidad Central de Las Villas.
- Rautela, G. S. & Cowlings, E. B. (1986): Simple culture test for 19. Relative cellulolytic activity of fungi. Appl. Microbiol, 14, 892-898.

.

- Ricci, S; Bruni, M; Meriggi, A; Corsico, R. (1995): Aerobiological monitoring of Alternaría fungal spore: comparison between surverys in 1992 and 1993 and local meterological conditions. Aerobiología. Vol. 11, N° 3. 195-99.
- Rodríguez G. I y C. Y. Piñeros (2007): Production of enzymatic complex in solid state fermentation by *Trichoderma* sp. using palm oil empty fruit bunch (EFB) as substrate. Revista Facultad Química Farmaceútica 14: 35-42.
- Rojas, T.I., Martínez, E., Gómez, Y., Alvarado, Y. (2002): Airborne spores of Aspergillus species in cultural institutions at Havana University. Grana, 41: 190e-193e.
- Shelton B. G., K. H. Kirkland, W. D. Flanders y G. K. Morris (2002): Profiles of airborne fungi in buildings and outdoor environments in the United States. Applied and Environmental Microbiology 68: 1743–1753.
- Silva, J. (2009): Conservando el papel. En: conservación preventiva en Archivos y bibliotecas. Bergaglio C., Pené M (Eds.). 1ra Ed., La Plata: Instituto Cultural de la Provincia de Buenos Aires, pp. 11-65.
- Smith, A. D. (2000): Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology., Managing editor.
- Sterflinger, K., 2010. Review. Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage. FungalBiologyReviews, 24: 47-55.
- Subash, C. Gopinath, B. Anbu, P. Azariah, H. (2005): Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. Mycoscience, 46:119-126.
- Vaillant, M. (1992): Reflexiones de un microbiólogo conservador de documentos. Amate (Órgano Bimestral de Comunicación de Sistema Red Latinoamericano de Información en Materia de Conservación de Documentos). Año 2, No 11.
- Vaillant, M. y Valentín, N. (1996): Principios básicos de la conservación documental y causas de su deterioro. Ministerio de Educación y Cultura. Institutito del Patrimonio Histórico Español: pp. 78-90.
- Vaillant, M., Doménech, M.T.; Valentín, N. (2004): Una mirada hacia la conservación preventiva del patrimonio cultural. Ed. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia. pp.322.
- Valentín, N. (2001): Microbial contamination and insect infestation in Spanish museums and libraries.
- Valentín, N. (2003): Análisis del biodeterioro. Infestaciones y su erradicación. Unidad del Biodeterioro del IPHE.
- Valentín, N. (2010): Microorganisms in museum collections. COALITION, No.19:2-5.

- Valentín, N; Garcia, R; de Luis, O; Maekawa, S. Microbial. (1998): Control in Archives.Libraries and Museums by Ventilation Systms. Restaurator, v. 19, p. 85-107
- Valls I Subirá, O. (1986): La Conservació del papel. Barcelona: Imprenta Juvenil,S.A.
- Vargas, H. (2004): Patógenos emergentes en micosis cutáneas y sistémicas. Dermatología Venezolana, Vol. 42, 4 -1
- Velásquez, A. (2007):Procesos productivos del papel. Universidad Americana.
- Vergara, J. (2002): Conservación y restauración de material cultural en archivos y bibliotecas.
- Villalba, L. S., J.F. Mikán, y J. Sánchez (2004): Actividades hidrolíticas y caracterización isoenzimática de poblaciones microbianas aisladas del patrimonio documental del Archivo General de Colombia. NOVA-PUBLICACION CIENTIFICA*,* 2: 50-58.
- Villalba, L.S., Malagón, A. (2011): Biodeterioro de la fuente de Lavapatas, parque arqueológico de San Agustín-Huila. Colombia. Revista Ge-conservación, 2: 65-80.
- Villena,G.; P. Moreno y M. Gutierrez-Correa (2001): Cellulase production by fungal biofilms on polyester cloth. Agro-food-Industry Hi-Tech, 12(Iss1): 32-35.
- Voet, D. & Voet, J. G. 2004. *Biochemistry*.

ANEXO 1

Registro de alteraciones presentadas en las revistas

1. Anales De La Real Academia de Ciencias Médicas, Física y Naturales. Junio 1886.
   Alteración: Presencia de manchas con micelio. **Hongos no viables**.
   Galerías.

2. Revista: Ambas AMÉRICAS. Domingo F. Sarmiento. Noviembre 1867.Volumen I Número 2.
   Alteración: -Presencia de micelio y enmohecido. **Hongos no viables**.

3. Revista cubana 1837.Tomo IV. Director Enrique José Varona. Presencia de manchas.
   Alteración: Presencia de micelio y enmohecido. **Hongos no viables.**

4. Revista cubana 1837.Tomo V. Director Enrique José Varona.
   Alteración: Presencia de manchas con micelio. **Hongos no viables**.

5. Revista cubana 7. 1888. Director Enrique José Varona. **Se aislaron las cepas (R6a y R6b) pag 576.**
6. Revista cubana Tomo VII.Habana 1888. Director Enrique José Varona.
   Alteración: Presencia de manchas con micelio. **Hongos no viables.**
   Galerías.

7. Revista cubana Tomo V.Habana 1887. Director Enrique José Varona. **Se aisló la cepa (R8) pag 293**. Galerías**.**
8. Revista cubana Tomo VI.Habana 1887. Director Enrique José Varona. **Se aisló la cepa (R10) pag 572.**
9. Revista cubana Tomo XIX. Habana 1894. Director Enrique José Varona.

   Alteración: Manchas. **Hongos no viables**. Galerías**.**
10. Revista de Cuba Periódico Quincenal de Ciencias, Derecho Literatura y Bellas Artes. Tomo I Habana 1877. Papelería La propaganda Literaria Director José Antonio Cortinas. **Se aisló la cepa (R1) pag 32.**
11. Revista de Cuba Periódico Quincenal de Ciencias, Derecho Literatura y Bellas Artes. Tomo III Habana 1878. Papelería La propaganda Literaria Director José Antonio Cortinas. Alteración: manchas. **Hongos no viables**.
12. Revista de Cuba Periódico Quincenal de Ciencias, Derecho, Literatura y Bellas Artes. Tomo IV Habana 1878. Papelería La propaganda Literaria Director José Antonio Cortinas. Alteración: Enmohecido. **Hongos no viables**.
13. Revista de Cuba Periódico Quincenal de Ciencias, Derecho.

Registro de alteraciones presentes en los libros

Literatura que presenta alteraciones provocadas por manchas con micelio, pero que por presentar similitud entre sus alteraciones no fueron muestreadas, es decir no están entre los (22) documentos a partir de los cuales se realizó aislamientos de las cepas.

1. Catálogo de la librería Nacional y Extranjera de Miguel de Villa (1883) Habana,calle del obispo num.60.
2. La propaganda Literaria.Enero 1890, calle de Zulueta num.28,entre Virtudes y AnimasDictionnaire universel des contemporains.Paris Librairie Hachete et 79, Boulevard saint-germain,79.Londres 18,
3. King William Street Strand 1893Diccionario de la administracion española. Tomo 1 cuarta edición , Madrid administracion arco de Santa Maria, 41 triplicado principal 1886.
4. Alcubillas.Diccionario de Administración, tomo 2,Madrid 1886.
5. Alcubillas.Diccionario de Administración, tomo 3, 4ta edición. Madrid, administracion arco de Santa María 41, triplicidad principal, 1886.
6. Alcubillas.Diccionario de Administración. Tomo 5 , 1887.
7. R.gómez. Imprenta y Papelería " La Nacional". Calle de Mercaderes # 514 y 515.

   Alteración : Galerías.
8. M.M, Zarzamendi, impresor 40 y 42, Broadway ,1871.
9. Memorias de ultratumbas, 2, 1898, Paris Garnier Hermanos, 6, Des Saints-peres, 6.
10. 10 Informe sobre el Censo de Cuba 1899, Washington, Imp. Del Gobierno 1900, Departamento de la Guerra, oficina del director del Censo de Cuba.Teniente Coronel J.P. Sanger, inspector generaL, Director.
11. Habana; Imprenta del Gobierno y Capitanía General por S.M 1847.
12. Las siete partidas del Rey Don Alonso el Sabio, tomo I, Madrid 1829.
13. Madrid: Imprenta de J. Martin Alegria, cuesta de Santo Domindo, 8, 1845.
14. Nueva York; Imprenta de Hallet, calle de Fulton;# 107, 1864.
15. Historia de la esclavitud de la raza africana en el nuevo mundo y en especial en los países Americo-Hispanos. Por D. Jose Antonio Saco tomo I.Barcelona, Imprenta de Jaime Jesús, 1879.

    Alteración : Galerías.
16. De la vida internacional.TomoIII.Habana, Imprenta "El siglo XIX" de Aurelio Miranda, Teniente Rey 27, 1916

17. Necesidades de Cuba por D.Jacobo de la pezuela.Madrid,1865.Imprenta del Banco Industrial y Mercantil. #3.
18. La unión del crédito territorial hipotecario Habana.Imprenta y papelería de la Viuda de Barcina.Calle de la Reina #6, 1859.
19. Alimensura. 1835
20. Guía para los registros Amarillamientos de la Riqueza rústica y urbana de la isla de Cuba.Habana 1888.

    Alteración : Galerías.
21. Colección oficial de leyes,Reales decretos,Reales Órdenes. Madrid,Imprenta del Ministerio de y Justicia.1883.

    Alteración : Galerías.
22. Legislación Ultramarina.Concordada y notada.Madrid,1865.Imprenta de los señores Viota,Cubas y Vicente.Calle del oso,numero 10.

    Tomo 1
23. Tomo2
24. Tomo3
25. Tomo 4
26. Tomo 5 Alteración : Galerías.
27. Tomo 6
28. Tomo 7
29. Tomo 8
30. Tomo 9
31. Tomo 10
32. Tomo 11 Alteración: Galerías.
33. Tomo 12
34. Tomo13
35. Tomo 14
36. Tomo 15
37. Tomo 16
38. Tomo 17

A continuación se muestran los 22 ejemplares seleccionados a partir de los cuales se realizaron los aislamientos.

1. Historia de la esclavitud desde los tiempos más remotos hasta nuestros días.1875.
   Alteración: Manchas
2. Curso de Economía Rural Española Tomo2. Madrid: 1865.Establecimiento tiográfico de Eduardo Cuesta,Factor 14, bajo. **Se aisló L6**
3. El enjuiciamiento Civil en Cuba y Puerto Rico por Don Antonio Govin y Torres. Abogado. Habana . **Se aisló L23**
4. Colección de Artículos publicadas en El triunfo.Habana.Imprenta "El Cosmopolita". Calle de O Rrelly n.36 1880. **Se aisló L13**
5. Constitución de los Estados Unidos Washington,Imprenta del gobierno,1899.**Se aisló L14**
6. El Derecho Constitucional.Paris. GarniHermanos,Libreros,Editores,1990.
7. Las cortes de España . España **Se aisló L16**
8. Constitución de la monarquía española promulgada el 30 de julio de 1876. **Se aisló L18**
9. Tratado Teórico-Práctico para la enseñanza de los aspirantes al notario.6ta edición-1855 tomo 1.Madrid, Imprenta de Jose Rodríguez..
   Alteración: enmohecido
10. Biblioteca de escribanos.Tomo 2, Madrid, Imprenta de la vianda de Jordan e hijos 1841.**Se aisló L19b**
11. Historia de España en América.1898.Don Jose de Alcazar. Madrid. .Alteración: Manchas con micelio
12. Registro de Legislación ultramarina Tomo1
    .Alteración: micelio.
13. La violación de las leyes de Cuba. **Se aisló L21.** Galerías**.**
14. Red Cédula de 1855. Habana. Imprenta del gobierno y Capitanía General y Real Audiencia Pretorial . **Se aisló L22**
15. Necesidad de Cuba por D. Jacobo de la pezuela .Madrid, 1865:Imprenta del Banco Industrial y Mercantil numero 3. **Se aisló L23**
16. La unión del crédito territorial hipotecario. Habana Imprenta y papelería de la viuda de Varcina. 1859. **Se aisló L24**
17. Las aspiraciones del partido Liberal de Cuba .Habana. 1892.

Alteración: Manchas con micelio. Galerías**.**

18. Deuvres Completes Frwederic Bastiat.Paris,1863. Tomo 4.
    Alteración: Manchas con micelio.
19. Ley de aguas.1825. **Se aisló L19. Galerías.**
20. Febrero novísimo,o Librería de Jueces,abogados y escribanos
    Alteración: Manchas con micelio.
21. La sala.1892.
    Alteración: Manchas con micelio.
22. Certamen del círculo de abogados y Escribanos.
    Alteración: Manchas con micelio.

ANEXO 2. Medios de cultivos utilizados para la actividad enzimática

Medio de Cultivo para Fermentación

Para 1L

Nitrato de sodio (2.0g)

Fosfato de dipotasio (1.0g)

Sulfato de magnesio (0.5g)

Cloruro de potasio (0.5g)

Sulfato ferroso (0.01g)

Agua destilada c.s.p 1L

$pH_{=}$ 5.5

$Temperatura_{=}$ 28 ^{o}C

Glucosa (10.0g)

Medio Mandels

KH_2PO_4 (2.0g)

$MgSO_4\ 7H_2O$ (0.5g)

$CaCl_2\ 2H_2O$ (0.3g)

Peptona micológica (0.5g)

Papel de Filtro (10.0g)

$Fe\ SO_4 7H_2O$ (5.0 mg)

$Mn\ SO_4\ 7H_2O$ (1.6mg)

$Zn\ SO_4\ H_2O$ (1.4 mg)

$Cu\ SO_4\ 5H_2O$ (1mg)

Agua Destilada 1L