



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Facultad de Ciencias

Biodeterioro de la seda

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN BIOLOGÍA

MIC-04

Presentado por: **Silke Martínez Moreno**

Covocatoria: **Junio, 2019**

Curso académico: **2018/2019**

Índice

1. Introducción	1
1.1 Historia	1
1.2 ¿Qué es la seda?	2
1.2.1 Estructura de la seda	3
1.2.2 Formación de la seda	4
1.2.3 Propiedades de la seda	4
1.3 Biodeterioro	5
2. Metodología	6
3. Objetivos	7
4. Biodeterioro de la seda a partir de microorganismos	7
4.1 Biodeterioro efectuado por hongos	8
4.2 Biodeterioro efectuado por bacterias	9
4.3 Prevención y control	14
5. Biodeterioro enfocado a la biomedicina	16
6. Aplicaciones del biodeterioro en industria y biomedicina	20
7. Conclusiones	21
8. Bibliografía	23

Resumen

La seda es una fibra proteica compuesta por sericina y fibroína, producida principalmente por el gusano de seda *Bombyx mori*. Se trata de un biomaterial muy resistente, brillante, con cualidades únicas de flexibilidad, resistencia y tracción que ha llamado la atención desde hace miles de años en la industria textil. Como fibra proteica natural está sometida a biodeterioro a causa de los microorganismos, tanto de hongos como de bacterias. Por lo tanto, el objetivo principal del trabajo es determinar cómo la seda está predispuesta al ataque de los microorganismos y cuáles de ellos pueden deteriorarla, además de saber prevenirlo a través de métodos de control y prevención. Esto es muy importante debido a que muchos tejidos de seda presentan un elevado valor histórico y cultural, siendo de vital importancia preservarlos en condiciones adecuadas de almacenamiento y mantenimiento con vistas a aumentar su longevidad. Por otro lado, la seda, desde el punto de vista de la ingeniería de tejidos, es considerada como un biomaterial novedoso y puntero ya que al ser biocompatible, resistente y biodegradable permite su utilización para la formación de nuevos tejidos “in vivo”. En este sentido tiene, además, el valor añadido de facilitar la adhesión de las células, estimulando su crecimiento y permitiendo la diferenciación celular. Estos aspectos, dada su importancia, también han sido abordados en este trabajo.

Palabras clave: biodeterioro, microorganismos, seda, fibroína, sericina, biomaterial.

1. Introducción

1.1 Historia

La seda tuvo su origen en China alrededor de los 2500 años A.C. Se aprendió a criar los gusanos de seda y a aprovechar la seda que estos producen. China tuvo en secreto el procedimiento de fabricación y mantuvo el monopolio de la seda durante muchos años. Debido a esto surgió una gran ruta comercial conocida mundialmente como la Ruta de la Seda, esta fue muy importante ya que no solo permitía un intercambio de materiales entre continentes sino que, además, permitía el intercambio entre diferentes culturas (Llagostera et al., 2004)

En España, la industria de la seda se inició en el siglo IX en el Al-Ándalus. Hacia el siglo XVI la industria ya se extendía por toda la península y concretamente en Granada, en 1511, se

creó la Casa del Arte de la Seda, en la cual la seda era un producto de lujo que la Granada musulmana exportaba a todo el Mediterráneo (https://www.granadahoy.com/granada/seda-Granada-mejor_0_632037085.html).

1.2 ¿Qué es la seda?

La seda es una fibra proteica producida por algunos animales del filo Arthropoda. Es un biomaterial muy resistente y flexible, que actualmente llama la atención en proyectos de investigación por sus cualidades únicas de flexibilidad, resistencia y tracción.

Desde hace miles de años la seda producida por el gusano de seda *Bombyx mori* se usa para la industria textil, ya que este gusano es fácil de domesticar. Otros artrópodos como las arañas (pertenecientes a la familia Arachnida) también son capaces de producir sedas pero, debido a la naturaleza depredadora y territorial de estas, es muy difícil domesticarlas (Altman et al., 2003; Sonthisombat et al., 2003; Elices et al., 2011).

Las sedas de los distintos artrópodos presentan distintas propiedades ya que cada una tiene una composición de aminoácidos diferente y exhibe propiedades mecánicas adaptadas a sus funciones específicas (Altman et al., 2003; Elices et al., 2011). La seda de araña parece ser que es más resistente que la seda de los gusanos, pero esta es mucho más difícil de producir. Sus propiedades le permiten tener una gran resistencia y flexibilidad que ha iniciado proyectos de ingeniería para reproducir sus increíbles propiedades.

También podemos encontrarnos con otros tipos de seda, de hecho hay dos tipos principales: la seda cultivada y la seda silvestre de la cual, la seda Tussah, es la más importante. La seda cultivada es producida por *Bombyx mori* en lugares proporcionados para ello y alimentados con hojas de morera (*Morus sp.*) (Sonthisombat et al., 2003). Todas las sedas cultivadas son equivalentes en su composición ya que, producen fibroína con esencialmente la misma composición de aminoácidos (Becker et al., 1997). La seda salvaje es nativa de China e India, en especial la Tussah se diferencia en que los gusanos se alimentan de hojas de roble (*Quercus sp.*). La diferencia entre las sedas se puede apreciar a simple vista ya que las sedas cultivadas son de color blanquecino tirando a amarillento y las sedas silvestres son desiguales, marrones y ligeramente menos brillantes (Sonthisombat et al., 2003). En este trabajo nos centraremos en la seda producida por *Bombyx mori* ya que es la más utilizada.

1.2.1 Estructura de la seda

El filamento de seda está formado por dos tipos de proteínas: fibroína y sericina.

Fibroína: es una estructura proteica, flexible, resistente y brillante. Es el componente principal de la seda ya que forma el 75% del peso de esta. Es insoluble en agua y presenta una estructura altamente ordenada y cristalina. Su estructura primaria es periódica, con secciones repetitivas simples divididas por regiones amorfas. Las regiones amorfas son más complejas, contienen aminoácidos con cadenas laterales más voluminosas. En cambio, las secciones repetitivas están compuestas por la siguiente unidad básica “Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser”. Por lo tanto, la fibroína está compuesta de un 45% de glicina, un 30% de alanina y un 12% de serina. “Estos tres residuos contienen cadenas laterales cortas y permiten el empaquetamiento compacto de cristales a través del apilamiento de láminas con enlaces de hidrógeno” (Shen et al., 1998). Además, la fibroína presenta una pequeña cantidad de residuos de cisteína que aporta una cantidad muy pequeña de azufre en la fibra (Becker et al., 1997; Shen et al., 1998; Kojthung et al., 2004). La estructura tan característica de la fibroína provoca que la seda sea “la fibra proteica natural más fuerte; es más fuerte que un filamento de acero de igual diámetro” (Forlani et al., 2000; Tsuboi et al., 2001; Zhang et al., 2002; Kojthung et al., 2004; Laudy et al., 2013).

Sericina: es una sustancia amarilla, quebradiza e inelástica. Actúa como un adhesivo para los filamentos de fibroína, de ahí a que se le llame “goma de seda”. Forma el 25% del peso de la seda cruda y presenta algunas impurezas como ceras, grasas, pigmentos y minerales naturales. Está compuesta de glicina, serina y ácido aspártico (Shen et al., 1998). Oculta el brillo de la fibroína por lo que normalmente la sericina se elimina cuando la seda es utilizada para la industria textil. Esta se puede eliminar mediante múltiples procedimientos, pero el más utilizado es mediante la disolución con una solución de jabón caliente (Avendaño et al., 2018). Una manera más novedosa y eficaz es mediante el desgomado enzimático ya que presenta una serie de ventajas: es una reacción específica, causa un daño mínimo a la fibroína, evita la debilitación de la fibra (ya que se realiza a temperaturas más bajas) y es un procedimiento respetuoso con el medio ambiente. A parte de estas ventajas también presenta dos grandes desventajas que son: el gran coste económico y el tiempo, debido a que este método es mucho más lento (Sonthisombat et al., 2003; Kojthung et al., 2004).

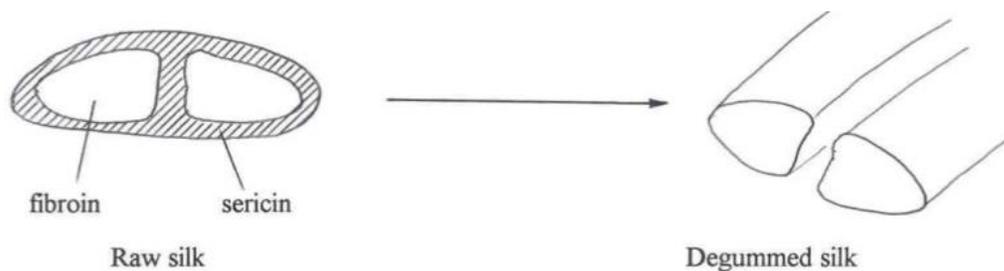


Figura 1. Seda cruda y seda desgomada (Sonthisombat et al., 2003).

1.2.2 Formación de la seda

El gusano de seda presenta una metamorfosis completa con 4 fases: huevos, larvas, pupa y polilla. En la etapa de larva, cuando esta está madura, es cuando produce la fibra que será utilizada para hacer el capullo para la siguiente fase de pupa. La construcción del capullo se realiza mediante la extrusión de fibroína a partir de dos glándulas. Estas glándulas están situadas en la cabeza y a medida que van saliendo los dos filamentos, se cementan entre sí gracias a la sericina. La sericina fluye de otras dos glándulas, situadas de manera simétrica. Finalmente, emerge en el aire un filamento continuo y firme que es la seda (Altman et al., 2003; Sonthisombat et al., 2003; Llagostera et al., 2004).

1.2.3 Propiedades de la seda

Debido a la estructura ya mencionada anteriormente de la seda, esta presenta una serie de comportamientos frente a distintos efectos químicos y físicos.

Efectos de diferentes factores químicos:

El comportamiento de la seda frente al agua, es que el agua no disuelve a la seda, pero puede perder peso si se le somete a agua hirviendo o a vapor de agua a elevadas temperaturas (100° C).

La seda, también presenta cambios ante la presencia de ácidos y álcalis, los cuales pueden causar hidrólisis en las cadenas polipeptídicas. En relación con el pH, según los datos de que se dispone, parece ser que los valores en que la seda se ve menos afectada son los del rango comprendido entre 4-6. Por otra parte, la hidrólisis ácida es más perjudicial para la fibra de

seda que la alcalina. Esto se debe a que la hidrólisis ácida ocurre en todos los enlaces peptídicos de la fibra, mientras que la hidrólisis alcalina afecta primero al final de las cadenas peptídicas. Cabe destacar que los compuestos alcalinos débiles (jabón, amoníaco) suelen disolver la sericina, aunque también pueden atacar a la fibroína si el tratamiento se excede en el tiempo.

La fibroína puede verse afectada negativamente en presencia de agentes oxidantes. Los agentes oxidantes se usan para blanquear la fibra y hay que tener sumo cuidado ya que las reacciones de oxidación ocurren en las cadenas laterales de la tirosina, en los enlaces peptídicos y en los residuos amino-terminales de las cadenas principales. En cambio, los agentes reductores no parece afectarle (Sonthisombat et al., 2003).

Efectos de diferentes factores físicos:

Respuesta a la tracción: la capacidad de resistencia a la tracción de la fibra de seda seca varía de 2.4 a 5.1 gramos por denier (unidad de medida de la densidad lineal de masa de fibras). En húmedo, es un poco menor, aproximadamente un 15% - 20% menos de capacidad de tracción que en seco. Esto es interesante tenerlo en cuenta ya que la seda es capaz de absorber agua, dependiendo su naturaleza higroscópica de varios factores: si está cruda o desgomada, del tipo de seda y de la humedad relativa del ambiente.

Alargamiento de rotura: una de las propiedades físicas que se miden para ver el biodeterioro de las fibras de seda, aparte de la capacidad de tracción, es el alargamiento de rotura de la fibra, valor que, en condiciones normales, oscila entre el 20 y 25%.

Resistencia al calor: la seda es bastante tolerante al calor. Soporta la temperatura de 140° C durante un largo periodo de tiempo sin verse afectada, pero a partir de los 150° C ya se descompone rápidamente (Altman et al., 2003; Sonthisombat et al., 2003; Zhanget al., 2002).

1.3 El biodeterioro

La palabra deterioro proviene del verbo deteriorar que la RAE (Real Academia Española) lo define como: “Dicho de una cosa o de una persona: Pasar a un peor estado o condición”. El prefijo (bio-) hace referencia a agentes biológicos por lo tanto, el biodeterioro es el proceso en el cual están implícitos los agentes biológicos que causan el deterioro. Por lo tanto, el deterioro es un término que refiere al concepto de una disminución en la calidad o el valor de

un artículo que, después de haber sido sometido a biodeterioro, puede conservar un grado de calidad o de valor que lo haga aun utilizable y apreciado por la humanidad (Rose et al., 1981).

El biodeterioro está relacionado con las condiciones ambientales a las que está sometido el objeto en cuestión. Las condiciones ambientales más importantes que afectan al biodeterioro son la humedad relativa y la temperatura ya que estos factores están íntimamente relacionados con el crecimiento de microorganismos. Además, si el objeto en cuestión, en nuestro caso la seda, se encuentra deteriorada debido a agentes ambientales tienen más posibilidades de convertirse en sustratos para el crecimiento microbiano (Arai et al., 2004; Valentin et al., 2004).

Cabe destacar que la seda es una de las fibras naturales más resistentes al biodeterioro debido a su estructura anteriormente mencionada (Laudy et al., 2013). Aun así, por el simple hecho de ser una fibra proteica, es susceptible al biodeterioro debido a enzimas proteolíticas de distintos microorganismos. Por lo tanto, la velocidad y el grado de deterioro van a depender de las características que presente la seda y de sus condiciones ambientales (Arai et al., 2004).

En cuanto al término biodeterioro se refiere, su ámbito es más amplio que el comentado anteriormente, ya que no solo se limita al deterioro producido por microorganismos sino que engloba cualquier tipo de deterioro que se origine por acción fluidos, enzimas u otro cualquier agente biológico. En este sentido cabe reseñar el biodeterioro de muchos materiales que han sido utilizados como implantes quirúrgicos (Lesniewicz et al., 2010) o para la ingeniería de tejidos y hoy en día la seda es un material pionero en este campo.

2. Metodología

Este trabajo corresponde a la modalidad de revisión bibliográfica. Se ha realizado una búsqueda bibliográfica desde Noviembre de 2018, hasta Abril de 2019, utilizando las principales fuentes y buscadores académicos: Scopus, SciELO, Google Scholar, World Wide Science, Springer Link y Scholarpedia. Se han seleccionado artículos y documentos relevantes publicados en los últimos años y algunos más antiguos debido a que son relevantes para el tema tratado. Toda la información obtenida está relacionada con el tema de este estudio y se ha incidido principalmente en aquellos artículos que hablan del biodeterioro, de la seda y de microorganismos que atacan a la seda. La búsqueda ha sido realizada

principalmente en inglés por ser la lengua más utilizada en el ámbito científico, también se ha utilizado el castellano pero de manera más puntual. Las palabras clave utilizadas para la búsqueda han sido: *biodeterioration*, *silk*, *microorganism*, *historical*, *mycobiota*, *bacterial* y *degradation*. Los operadores booleanos más utilizados han sido: “AND” y “OR”. Las palabras clave y los conectores han sido combinados para poder encontrar artículos válidos. El operador booleano “NOT” no ha sido apenas utilizado debido a que no ha sido necesario.

Criterio seguido para la selección de artículos: se han incluido todos aquellos artículos que hacían referencia a como afectaban los microorganismos y las condiciones ambientales a las fibras de seda, ya fuese a la fibra en si o en tejidos. También han sido incluidos aquellos artículos que trataban el deterioro de la seda en un sentido biomédico, para la investigación de futuros usos de la seda. Han sido excluidos aquellos artículos que únicamente trataban la seda como un producto para ser usado en la industria textil

3. Objetivos

El objetivo general del trabajo es poner al día la información que hay sobre el biodeterioro de la seda para poder tener una visión más general y reciente. En este trabajo se pretende ofrecer una idea global de como la seda esta predispuesta al ataque de los microorganismos y que microorganismos son los que pueden deteriorarla. Además, también se trata de hacer hincapié en como las condiciones ambientales juegan un papel esencial en este proceso. Otro de los objetivos es poner en contexto los distintos métodos de prevención y control de estos ataques microbianos. Por último, se pretende dar una idea innovadora sobre usos de la seda en biomedicina (ingeniería de tejidos biológicos), un ámbito muy interesante y novedoso que puede ser crucial en el futuro de la medicina.

4. Biodeterioro de la seda a partir de microorganismos

La seda es considerado un material muy resistente al biodeterioro y menos susceptible a la invasión microbiana debido a su composición química (es insoluble en agua) y a la estructura molecular de la fibroína (explicada anteriormente), pero aun así también puede sufrir biodeterioro (Brzozowska et al., 2018). Hasta la "cocoónasa", que es una proteinasa que produce la polilla del gusano de seda para salir del capullo, es incapaz de hidrolizar la fibroína

(Seves et al., 1998; Forlani et al., 2000). Aun así, las bacterias tienen un enorme potencial para generar proteasas y poder sobrevivir en todo tipo de sustratos y condiciones ambientales. También, se ha encontrado que algunos mohos pueden deteriorar la seda, sobre todo si esta está envejecida.

4.1 Biodeterioro efectuado por hongos:

Seves et al., 1998, no consiguieron aislar hongos en sus estudios sobre el biodeterioro de la seda, pero en estudios posteriores se ha observado que algunos hongos pueden utilizar la seda para su crecimiento causando así deterioro. Cuando un moho crece puede ser detectado a simple vista o mediante el uso pruebas microbianas como cultivos. El examen visual es útil cuando crece en la superficie de un objeto, el problema es que no siempre crecen en la superficie de los objetos ya que muchas telas históricas de seda están hechas a partir de capas y el moho puede crecer entre estas capas pudiendo no ser detectado a simple vista. Para ello, es útil la detección de compuestos orgánicos volátiles (MVOC, por sus siglas en inglés), estos son emitidos por los mohos activos en cada etapa de su desarrollo. Por lo tanto, se pueden usar para detectar mohos aunque no estén en la superficie de un objeto.

Sawoszczuk et al., 2018, que trabajan en este campo propone tres tipos de medios de cultivo para analizar el perfil de MVOCs emitidos por los mohos que crecen en la seda. Los medios de cultivo que proponen son los siguientes: A) muestras de seda pura colocadas en medios microbianos, B) muestras de seda histórica colocadas en medios microbianos y C) agar que contiene aminoácidos que forman la estructura de fibroína. Los medios A y B no contenían carbono orgánico, nitrógeno ni azufre. El objetivo era que el único nutriente disponible fuese la seda para confirmar que los hongos que creciesen tuviesen propiedades fibroinolíticas y para que los MVOCs emitidos fuesen de la descomposición enzimática de la seda y no del metabolismo de otros compuestos. El medio C contenía los siguientes aminoácidos: glicina, alanina, serina, tirosina, valina, ácido aspártico, leucina, ácido glutámico, arginina, prolina, lisina y cisteína (la cisteína presenta un átomo de azufre), en la misma proporción que en la molécula de fibroína (este medio recrea el envejecimiento de la seda). En este caso, los hongos no requieren fabricar proteasas para romper la fibra de la seda ya que los aminoácidos están disponibles en el medio, por lo que en estas condiciones emiten una cantidad muy pequeña de MVOC.

De 15 especies de mohos inoculados en los medios con seda, solo cinco especies mostraron actividad fibroinolítica: *Alternaria alternata*, *Chaetomium globosum*, *Aspergillus fumigatus*,

Aspergillus niger y *Penicillium chrysogenum*. Estas especies suelen estar en el aire en lugares como museos. Estos mohos emitieron MVOCs. Muchos de estos MVOCs eran comunes en las cinco especies, pero cada especie de moho tenía su perfil individual de MVOC diferente al resto. Esto es importante ya que permite identificar los mohos presentes según los MVOCs que son captados. Los MVOCs emitidos por los mohos que crecieron en el medio con aminoácidos libres son diferentes en comparación con el perfil de los mohos que crecen en los otros dos medios con diferentes muestras de seda, ya que los que crecen en el medio con aminoácidos libres no requieren producir proteasas para romper la seda, por lo que utilizan un metabolismo diferente emitiendo otros MVOCs.

También se realizó un análisis cuantitativo de los MVOCs emitidos para observar que especie presentaba más actividad fibrioinolítica y los resultados fueron que las especies más activas son *Aspergillus niger* y *Chaetomium globosum* frente a las menos activas que fueron *Penicillium chrysogenum*, *Alternaria alternata* y *Aspergillus fumigatus* (Seves et al., 1998). Los valores tan bajos posiblemente fueron por la resistencia que presenta la seda ante el biodeterioro. Cabe destacar que se detectaron MVOCs con azufre, esto confirma que los mohos deterioran las muestras de seda ya que no había otros compuestos orgánicos con azufre en el medio (Sawoszczuk et al., 2018).

4.2 Biodeterioro efectuado por bacterias:

Se ha observado que muchos géneros son capaces de deteriorar la seda para utilizarla como sustrato. Algunos de los géneros que se han aislado de fibras de seda son los siguientes: *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces* y *Bacillus* (Laudy et al., 2013). En estos ensayos se ha observado que *Bacillus sp* coloniza los hilos de seda en condiciones de laboratorio durante la primera hora de cultivo causando los primeros síntomas de deterioro, y después de diez horas, produce cambios notorios en la estructura de la seda. En concreto, más del 95% de la actividad proteolítica de *Bacillus subtilis* A164 está relacionada con enzimas específicas para digerir las proteínas de la seda (Laudy et al., 2013).

En el estudio Suwannaphan et al. 2017, los autores aislaron una cepa bacteriana de *Bacillus*. Esta presentaba un 99.8% de similitud con *Bacillus subtilis inaquosorum* y recibió el nombre de *Bacillus sp. C4 SS-2013* (número de registro AB841263) por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés). Esta cepa de *Bacillus* produce una proteasa extracelular que es capaz de degradar la sericina sin dañar la fibroína. Esto es un tipo de biodeterioro que es aprovechable para las industrias y se explicara en el apartado 6.

En otro estudio realizado por Brzozowska et al. 2018, se identificó la comunidad de bacterias presente en textiles de seda históricos biodeteriorados. Los textiles estudiados en este caso se encontraban en 5 salas distintas del Museo del Palacio del Rey Juan III en Wilanow (Varsovia, Polonia). Las telas se encontraban envejecidas debido a fluctuaciones de humedad relativa, temperatura, exposición a radiación ultravioleta e infrarroja. Además, el polvo, la contaminación y la suciedad atrapada en las fibras aceleraron el proceso de envejecimiento. Pero nunca sufrieron severas circunstancias ambientales perjudiciales. Teniendo en cuenta las condiciones ambientales de las distintas salas se encuentra que los valores promedio de temperatura varían entre 16 y 24°C y la humedad relativa entre 45 y 65%; por lo tanto, no hay diferencias significativas. Las sedas de las distintas salas se remontan al siglo XVIII pero los trabajos principales de restauración se llevaron a cabo en los años 1955-1962. Además, las muestras de textiles difieren en la práctica de conservación ya que en el museo se practicaba la desinfección, la aspiración o el lavado, pero no se realizaba el mismo tipo de conservación en las distintas salas.

Para el estudio realizado por Brzozowska et al. 2018, se recolectaron muestras de cada una de las salas con el fin de realizar un método novedoso en este tipo de estudio. Se aplicó una metodología de NGS (Next gen secuencia) para identificar la comunidad total de bacterias en los textiles de seda (normalmente en este tipo de estudios, las cepas se identifican a partir de aislamientos en cultivos). La NGS es una metodología de alto rendimiento que permite la secuenciación rápida de los pares de bases en muestras de ADN o ARN. Para realizarlo, se llevó a cabo una extracción de ADN y se analizaron las secuencias. Estas se clasificaron y todas las que no eran de bacterias se eliminaron.

En las distintas muestras de seda se encontraron Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes, con los representantes de γ -(especialmente Enterobacteriaceae) y α -Proteobacteria. Dentro de la clase Clostridia lo más abundante fue el orden Clostridiales y en la clase Bacilli el orden más abundante fue Lactobacillales y seguidamente el orden Bacillales. También hubo una notable representación de las Actinobacterias.

En el estudio se llegó a una serie de conclusiones bastante interesantes sobre la estructura de la población microbiana en las distintas salas. Resulta que la distribución de secuencias entre diferentes habitaciones parece ser bastante similar en general, el que más difiere es el de una sala que ha estado físicamente cerrada durante muchos años y, debido a la falta de visitantes, tiene la menor cantidad de bacterias en la seda, a pesar de que el aire entra y sale por tres

puntos de orientación diferente. Por lo tanto, parece ser que los procedimientos de conservación tuvieron poco efecto sobre la estructura de la población microbiana. Además, el flujo de aire no influía en la biodiversidad de los microorganismos en las sedas, ya que no había mucha diferencia entre las salas más próximas con las más alejadas. Y por último, cabe destacar que la alta biodiversidad que se encuentra en las sedas probablemente represente la compleja historia de los terciopelos, no el pasado inmediato (Brzozowska et al., 2018).

Seves et al., 1998, descubrieron que algunas especies de bacterias se adhieren y crecen sobre seda enterrada en el suelo causando graves daños al tejido como lo demuestra la reducción de los valores de alargamiento y de tracción de la fibra. Se observó que el crecimiento fue más abundante en la seda cruda que en la desgomada, lo que indica que la mayoría de las bacterias que se encontraron preferían la sericina a la fibroína. Se trató de averiguar que especies de bacterias eran las que degradaban la fibra. En el estudio, se observó que ocurría al enterrar seda desgomada en el suelo. Después del primer mes enterradas, las fibras aparecieron en condiciones favorables, pero al segundo mes mostraron abrasiones y exfoliaciones pronunciadas y además estaban casi completamente cubiertas por una biopelícula microbiana (esto se pudo observar a través de MEB, figura 2). De aquí se aislaron varias especies de bacterias que se encontraban adheridas a la biopelícula y se identificaron. La mayoría de especies que se encontraron eran gram negativas, del género *Pseudomonas*, excepto *Bacillus megaterium*. Las especies identificadas son *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas paucimobilis* y hubo otras dos especies, también del género *Pseudomonas*, que no se pudieron identificar.

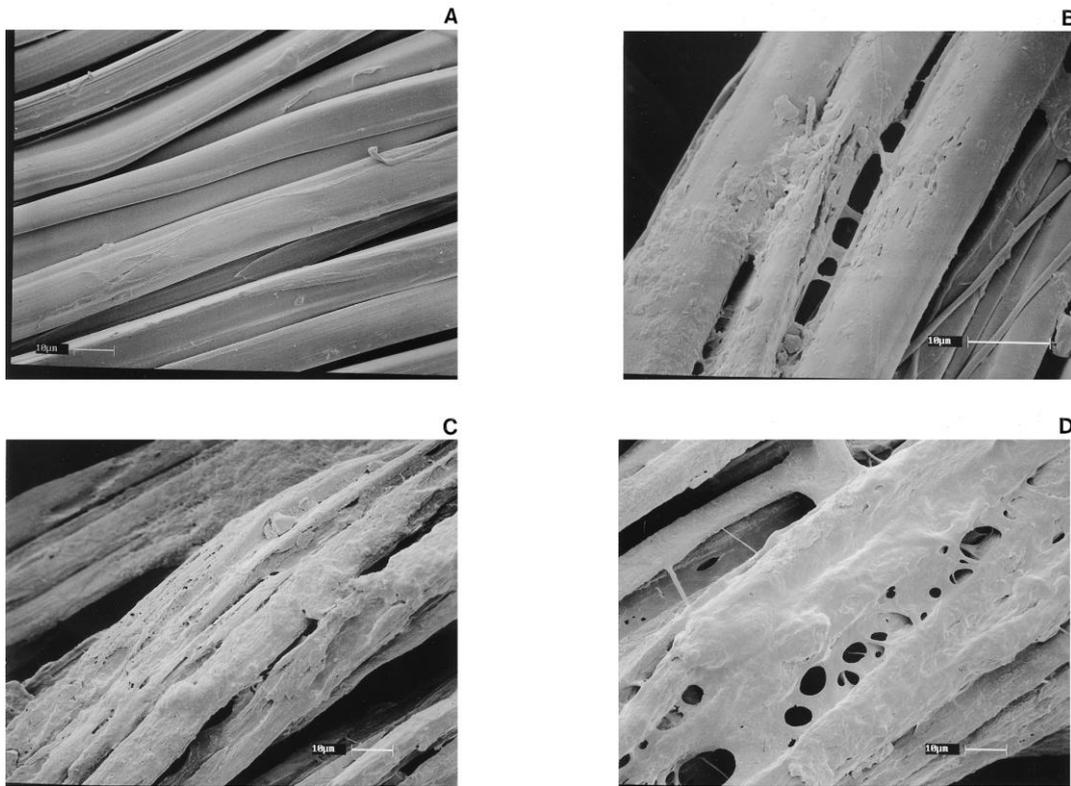


Figura 2. A) 0 días de incubación B) 30 días de incubación C,D) 60 días de incubación (Seves et al. 1998).

También se trató de identificar bacterias aisladas de los capullos de seda. Nuevamente dos especies de *Pseudomonas* no fueron identificadas y *P. cepacia* y *P. paucimobilis* se volvieron a aislar. También se encontraron *Aeromonas hydrophila*, *Chryseomonas luteola*, una bacteria grampositiva (*B. polymixa*), todas habitantes de suelo.

Después se comprobó el crecimiento de estas bacterias aisladas en seda cruda y desgomada, y se observó que aparentemente, *B. megaterium* y *P. paucimobilis* usan sericina para el crecimiento. El hecho de que la sericina sea mucho más soluble que la fibroína hace que la sericina sea un mejor sustrato para el crecimiento.

Solo *P. cepacia* fue capaz de degradar la fibroína como única fuente de nitrógeno y carbono para el crecimiento. Mediante MEB se comprobó que esta bacteria formaba una biopelícula con sustancias polisacáridicas, esta especie por sí sola y, posiblemente, su asociación con otros microorganismos que utilizan los productos de la degradación de la fibroína, puede representar una amenaza considerable para la integridad de los artefactos de seda de interés artístico o histórico (Seves et al., 1998).

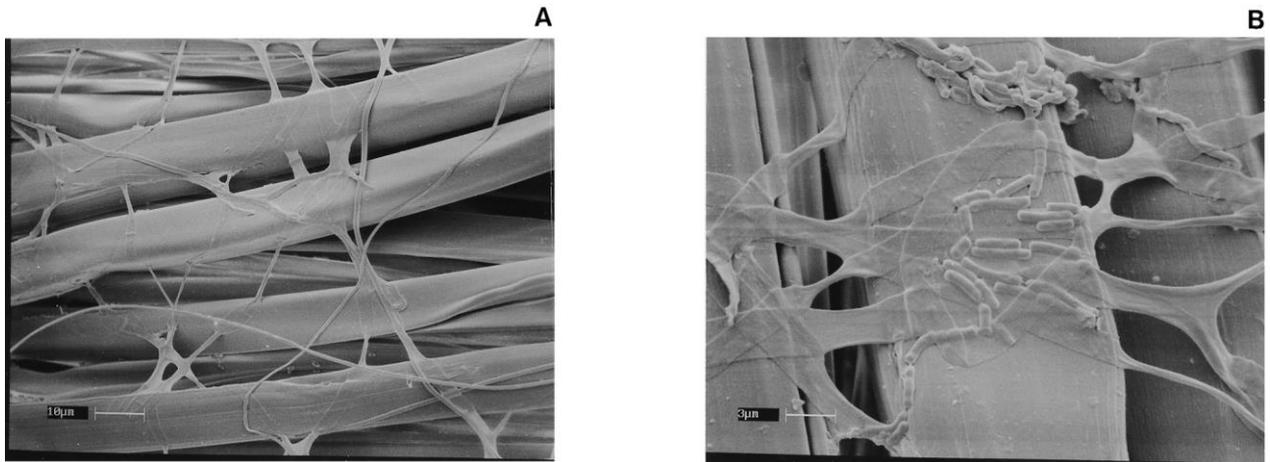


Figura 3. A) Micrografía tomada mediante MEB de la biopelícula producida cuando la seda desgomada se trató durante 15 días con un cultivo de *P. cepacia*. B) Misma fotografía a más aumento, se aprecian las células bacterianas atrapadas en el polímero extracelular (Seves et al. 1998).

Se ha estudiado otra cepa bacteriana, aislada de suelo de broza, *Variovorax paradoxu*, que parece ser que utiliza la fibroína para su crecimiento. (Seves et al. 1998; Forlani et al. 2000). Esto puede ser perjudicial para textiles de seda que son encontrados en excavaciones arqueológicas ya que provoca su biodeterioro. Los autores de este estudio pudieron observar como la bacteria *V. paradoxu* crecía en un medio mínimo, en el que la fibroína era la única fuente de carbono y nitrógeno disponible. El crecimiento se detectó debido a que la bacteria, durante su crecimiento, libera

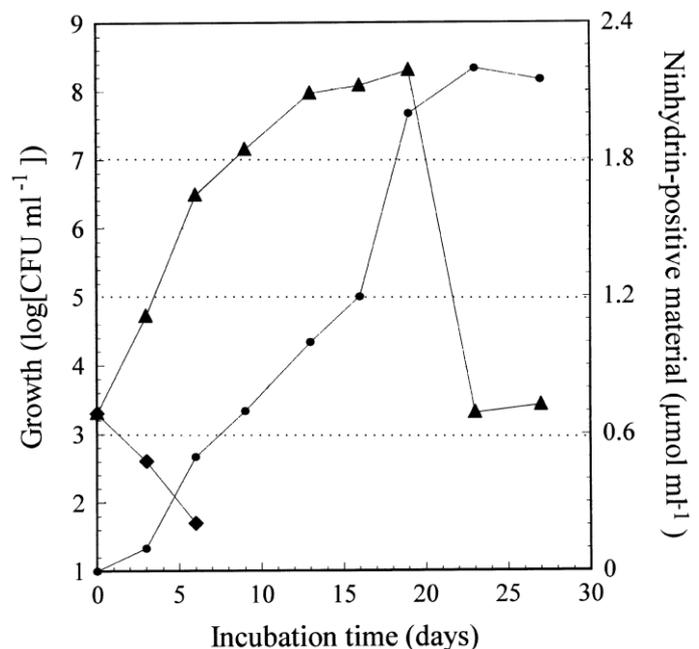


Figura 4. *V. paradoxus* fue inoculado con fibroína (▲) y sin fibroína (◆). La fibroína era la única fuente de carbono y nitrógeno. Medición de ninhidrina- positivo (●) indicador de actividad metabólica (Forlani et al. 2000).

ninhidrina como producto de su metabolismo (figura 4), y este se puede detectar mediante una reacción que produce color, y así se puede determinar mediante el espectrofotómetro. Los resultados del estudio concluyeron que *V. paradoxus* produce una enzima que libera aminoácidos o péptidos pequeños de la proteína y estos pueden ser absorbidos y utilizados para el crecimiento de la bacteria. La especificidad de la enzima hacia la fibroína fue considerablemente alta pero no se pudo concluir si era una fibroinasa específica o una proteasa ácida general muy potente. Por lo tanto, es interesante saber que *V. paradoxus* puede

ser una amenaza para los objetos fabricados con seda de interés artístico o histórico y que la inhibición de crecimiento de *V. paradoxus* puede proporcionar una protección de objetos históricos o de valor cultural (Forlani et al., 2000).

4.3 Prevención y control

La prevención y el control del biodeterioro son muy importantes de cara a la conservación y la apariencia de textiles de importancia histórica. Para empezar hay que conocer la naturaleza del material, el medio que le rodea y como se ha construido dicho material para así poder determinar su grado de deterioro y su estado de conservación (Redondo et al., 2011).

En museos se estila la exposición prolongada y el manejo excesivo de sus objetos, esto puede ser contraproducente para la conservación, mientras que las condiciones adecuadas de almacenamiento y mantenimiento pueden aumentar la longevidad de un objeto de seda como una obra de arte (Becker et al., 1997). El crecimiento de microorganismos en artículos hechos de seda puede provocar la pérdida de calidad o su destrucción debido a cambios en la morfología y en la estructura de la seda. El biodeterioro de un objeto está relacionada con la disponibilidad de humedad y nutrientes. Por lo tanto, los textiles antiguos y aquellos más contaminados, deteriorados y complejos en términos de estructura, tienen más probabilidades de convertirse en sustratos para el crecimiento microbiano ya que sus componentes se convierten en una fuente de carbono y nitrógeno que apoya el desarrollo de microorganismos. La clave para prevenir el crecimiento de estos microorganismos en la seda es el mantenimiento de la temperatura, la humedad relativa, la disponibilidad de nutrientes, la intensidad de la luz y la radiación UV (Laudy et al., 2013; Brzozowska et al., 2018). El mantenimiento de estos factores ambientales no solo es importante para prevenir el crecimiento de los microorganismos, sino por el propio efecto de deterioro que causan por si solos los factores ambientales. El problema principal radica en que la mayoría de las instituciones culturales, incluidos los museos, intentan proteger las colecciones de seda únicamente reduciendo la humedad relativa a través de una regulación de la temperatura (Sawoszczuk et al., 2018)

Un estudio sugiere que la reverencia y el cuidado preventivo practicado por los japoneses han hecho una contribución importante al cuidado a largo plazo de sus objetos históricos y artísticos. Esto se debe a que los japoneses tienen una serie de reglas específicas sobre cómo coser, doblar, usar y almacenar sus telas como por ejemplo el kimono. Los kimonos

generalmente se desmontan y la limpieza se realiza en un tejido bidimensional. El kimono se vuelve a ensamblar, doblar, envolver en papel y almacenar en un cajón. Hoy en día se utilizan métodos modernos de limpieza en seco para limpiar la seda (Becker et al., 1997).

Uno de los elementos esenciales de la conservación preventiva en un museo es el examen del aire del ambiente en busca de microorganismos (Brzozowska et al., 2018). Para identificar los mohos presentes en un lugar se ha propuesto la medición de los MVOC, ya que algunos de los compuestos volátiles determinados pueden ser útiles para detectar hongos activos que crecen en objetos históricos basados en la seda. En primer lugar, debe investigarse si estos mohos están activos, porque la desinfección de los objetos es necesaria solo si los resultados confirman la actividad de los hongos. Esto es muy importante en el caso de telas de seda históricamente envejecidas, que son frágiles y muy sensibles a muchos factores físicos y químicos. Esta técnica aporta una ventaja novedosa y es que puede detectar la presencia de mohos ocultos debajo de la superficie de los objetos. Con otros métodos solo es posible detectarlos en la superficie y no entre las distintas capas de las que están formados algunos tejidos, como ya se ha dicho anteriormente. (Sawoszczuk et al., 2018).

En ocasiones se plantea la aplicación de un potente tratamiento antimicrobiano para eliminar los microorganismos sobre los textiles, pero esto podría llevar a la creación de un nicho ecológico modificado que se adapte mejor al desarrollo de ciertos microorganismos que eventualmente serán más dañinos, además de los posibles daños a la fibra debido al tratamiento. Lo más importante es conocer la diversidad de microorganismos que residen en un objeto de arte, su cantidad y potencial metabólico ya que son de gran importancia para su conservación futura.

De cara a la protección ante el deterioro causado por agentes ambientales hay que tener en cuenta que las fibras de seda son muy sensibles al deterioro causado por la exposición a la luz en el ambiente de un museo. La luz puede provocar fotodegradación en las fibras de seda provocando decoloración, debilitamiento de fibras y desvanecimiento de los tintes. De la luz que llega a la tierra, la radiación ultravioleta (UV) es la porción más destructiva de la radiación solar para todos los materiales orgánicos, las longitudes de onda de la radiación UV van desde los 15 nm a 400 nm. Afortunadamente, la capa de ozono apenas permite el paso de la radiación por debajo de 300nm, pero aun así algunas longitudes de onda de este espectro llegan a la tierra pudiendo afectar a los tejidos. Aunque el número de moléculas que se degradan a partir de la fotodegradación muy pequeño, la radiación UV solar es capaz de

romper un número significativo de enlaces moleculares a lo largo de un año de exposición. Los museos modernos utilizan varios métodos para mitigar el problema como por ejemplo la exclusión de la luz natural, la luz artificial controlada, los filtros UV en las ventanas y estuches hechos especialmente (Koussoulou et al., 1999).

También se han estudiado los efectos térmicos que presentan la seda. Se ha observado las fibras de seda presentan respuestas morfológicas, de coloración y sustanciales debido al deterioro frente a exposiciones a altas temperaturas, pero a temperaturas moderadas como las que se presentan en los museos y exposiciones, la seda no presenta cambios alarmantes (Zhanget al., 2002).

5. Biodeterioro enfocado a la biomedicina

Durante siglos, la seda del gusano de seda *Bombyx mori* se ha utilizado como material de sutura biomédica, el problema es que había incompatibilidades provocadas por la sericina. Se ha comprobado que la fibra de seda desgomada, sin sericina, no provoca incompatibilidad ni respuestas de hipersensibilidad (Altman et al., 2003).

Hoy en día, se ha visto que pueden ser efectivas en otras muchas aplicaciones clínicas como por ejemplo en la ingeniería de tejidos biológicos. La seda es un biomaterial idóneo para la ingeniería de tejidos, ya que facilita la adhesión de las células, estimula su crecimiento y permite la diferenciación. Además, es biocompatible, resistente y biodegradable. La ingeniería de tejidos trata de implantar células a un sustrato (andamio biológico) para que se adhieran y sea un soporte físico para guiar a la formación del nuevo tejido u órgano. Estas células adheridas al andamio proliferan, segregan matrices extracelulares y estimulan la formación de nuevos tejidos. Durante este proceso, el andamio se va degradando y puede llegar a desaparecer. Sometiendo a las fibras a procesos térmicos, modificaciones por tensado, por tratamientos químicos o por modificaciones a partir de enzimas producidas por microorganismos, mediante el ajuste del tamaño y la disposición de la estructura cristalina de la proteína (Elices et al., 2011).

La seda está clasificada como no degradable, pero hay evidencia de que, como proteína, es susceptible a la degradación proteolítica in vivo y que serán absorbidas lentamente. En general, las fibras de seda pierden la mayor parte de su resistencia a la tracción dentro de un año in vivo y no pueden ser reconocidas en el sitio implantado a los dos años (Altman et al.,

2003). Para comprobar que la seda es susceptible a degradación proteolítica *in vivo*, se ha estudiado la biodegradación de la seda a partir de enzimas. Algunas de estas son extraídas de microorganismos y se pueden utilizar para hacer estudios “*in vitro*” (Horan et al., 2004).

Arai et al., 2004, estudiaron la biodegradación *in vitro* de la fibroína de la seda (procedente de *Bombyx mori*) y de películas de seda a partir de las siguientes enzimas proteolíticas: colagenasa tipo F, α -quimotripsina tipo I-S, proteasa tipo XXI de *Streptomyces griseus*. Para realizar el estudio se utilizó seda desgomada, sin sericina, a la cual se le eliminaron las materias grasas residuales para evitar problemas de incompatibilidad e hipersensibilidad.

Los factores que se midieron para ver si la fibra se degradaba fueron la pérdida de peso, la resistencia a la tracción y la morfología de superficie. La pérdida de peso se determinó con la incubación de las enzimas con las muestras a una temperatura de 37°C en un tiempo de 1 a 17 días. Los cambios de peso se midieron en diferentes momentos y se expresó como porcentaje de pérdida de peso seco respecto al inicial. Se observó que hubo cambios significativos en las películas de seda pero no en las fibras de seda (no superaba el 2% de cambio en comparación con el peso en seco inicial). El hecho de que solo haya una pérdida de peso significativa en las películas de seda confirma que la morfología y la estructura del sustrato afectan al ataque enzimático y a la velocidad en que lo realiza.

La pérdida de peso en las películas de seda depende de tres factores: el tipo de enzima, el tiempo y la proporción de enzima sustrato. Como se puede observar en la figura 5 la enzima que produjo más pérdida

de peso fue la proteasa tipo XXI, esto se debe a que es la menos específica en cuanto a la secuencia del sitio de escisión. A pesar de la disminución de la actividad enzimática, aumentando el tiempo de tratamiento, aumentaba el grado de pérdida de peso.

Por último, a más proporción de enzima, más pérdida de peso se produce.

TABLE I
Weight Loss of Silk Fibroin Films*

Degradation time (days)	Weight loss (%)					
	Collagenase		α -Chymotrypsin		Protease	
	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
1	2.6	3.8	6.0	9.0	18.2	35.0
3	4.1	5.5	9.2	11.8	27.4	45.5
10	7.4	8.9	13.0	14.9	35.7	55.6
17	9.4	10.7	14.7	16.5	45.5	64.3

Figura 5. Porcentaje de pérdida de peso provocado por la colagenasa, la α -quimotripsina y la proteasa a medida que aumenta el tiempo de exposición (Arai et al. 2004).

Las propiedades de tracción de las fibras de seda se observan mediante el análisis de la carga de rotura y el alargamiento de rotura. La proteasa tipo XXI fue la más agresiva que provocó una disminución, después de 17 días, la carga de rotura un 33% y el alargamiento un 45%. Esto confirma que aunque no haya una pérdida significativa de peso, las fibras de seda son susceptibles al ataque proteolítico, y este ataque se manifiesta con las alteraciones indicadas.

Los cambios morfológicos de las fibras de seda y de las películas de seda se examinaron mediante observación por microscopia electrónica de barrido (MEB) y se puede encontrar que tras la exposición durante 17 días a la acción de la proteasa tipo XXI que el efecto más drástico se daba en las películas de seda. Aun así, también se puede observar un aumento en la rugosidad de las fibras de seda después del tratamiento (Arai et al., 2004).

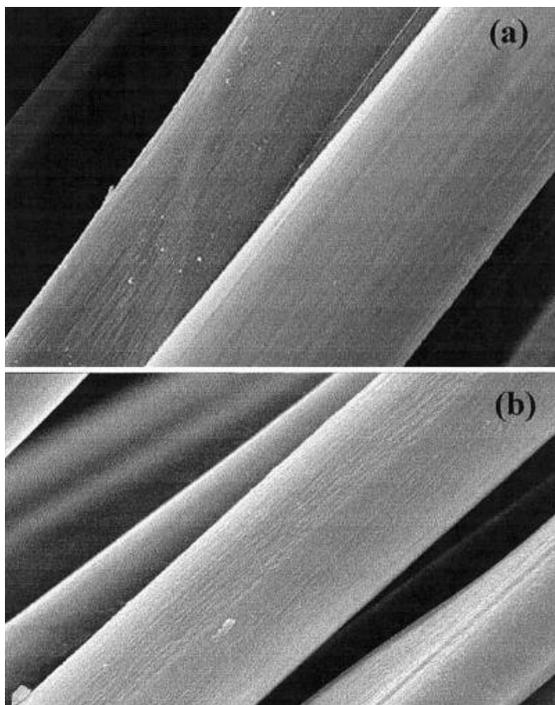


Figura 6. Microfotografías MEB de fibras de seda sin tratar (a) e incubadas con proteasa de *S. griseus* durante 17 días (b) (Arai et al., 2004).

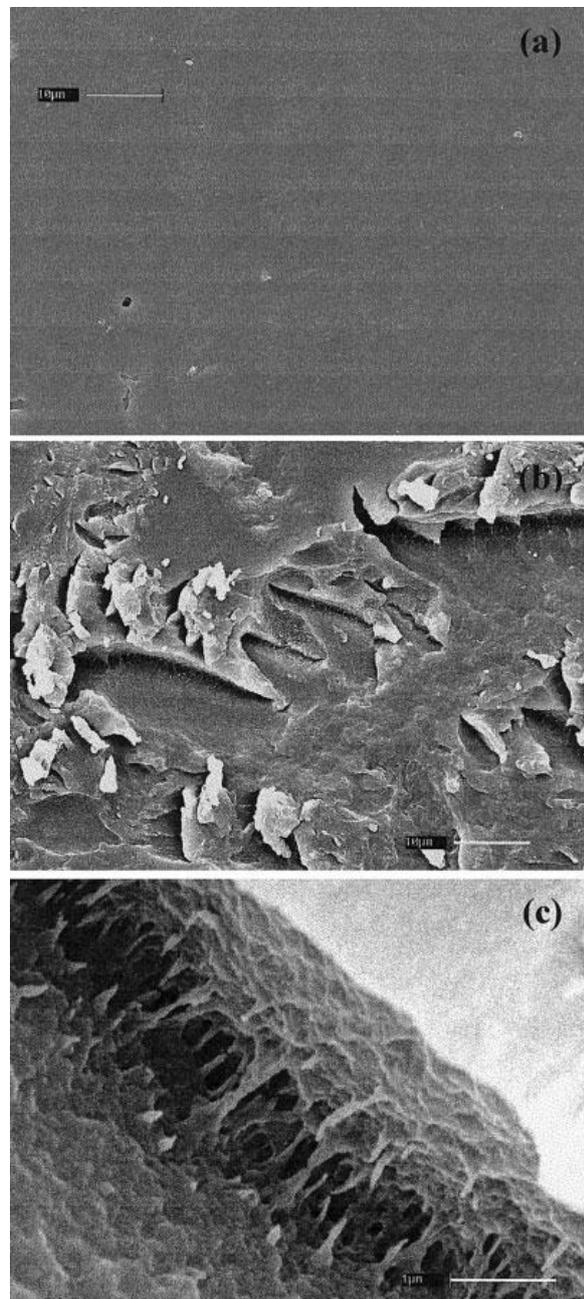


Figura7. Microfotografías MEB de biopelículas de seda sin tratar (a) e incubadas con proteasa de *S. griseus* durante 17 días (b); (c) microfotografía (b) más ampliada (Arai et al., 2004).

Aunque en los estudios de Arai et al., 2004, señalen que la proteasa tipo XXI es la que más degrada a la fibroína, en la tabla se puede observar que la quimotripsina también la degrada. La quimotripsina escinde las regiones menos cristalinas de la proteína a péptidos que luego pueden fagocitarse para un metabolismo adicional de la célula. Además, los cócteles de proteasas y la quimotripsina (conocidos porque los macrófagos los producen) son capaces de degradar enzimáticamente la seda (Altman et al., 2003).

Otro estudio realizado por Horan et al., 2004, confirma que la seda es un biomaterial mecánicamente robusto con características predecibles de degradación a largo plazo. Se creó un modelo *in vitro* de degradación proteolítica de matrices de seda a través de la proteasa XIX de *Streptomyces griseus* (las soluciones de proteasa se cambiaron diariamente debido a las pérdidas en el nivel de actividad). Se observó degradación *in vitro* en todas las muestras de seda incubadas en proteasa, un aumento de la fragmentación de los filamentos de fibroína individuales en función del tiempo de exposición a la enzima y el diámetro del filamento de fibroína disminuyó exponencialmente (un 66% en 10 semanas). Además, se observó la resistencia a la tracción que disminuyó de manera exponencial un 50% después de 21 días, hubo una pérdida de masa superior al 50% después de 42 días de degradación *in vitro*.

Este estudio se ha utilizado para generar una aproximación de la tasa de degradación a largo plazo de la fibroína de seda y para demostrar su previsibilidad con la idea de poder diseñar un andamio que cumpla con los requisitos de la carga del tejido para diversas aplicaciones en ingeniería de tejidos. La tasa de pérdida de resistencia observada en las muestras incubadas con proteasa fue rápida en comparación con las tasas esperadas *in vivo*, es decir, la seda perderá el 50% de su resistencia a la tracción aproximadamente 100 días después de la implantación y se espera que el hilo de seda pierda el 100% de su resistencia a la tracción aproximadamente 5 meses después de la implantación. Además, es probable que las tasas de degradación se puedan alterar a través del diseño (es decir, la organización del hilo) y la modificación de la superficie. Cabe hacer hincapié en que para determinar la tasa exacta de degradación hay que conocer el entorno *in vivo* específico para el tipo de tejido y la ubicación (Horan et al., 2004).

6. Aplicaciones del biodeterioro en industria y biomedicina

El biodeterioro puede ser visto desde dos puntos de vista diferentes. Los microorganismos pueden atacar la fibra de seda y deteriorarla, pero ¿hasta qué punto podría ser aprovechable por el ser humano? Pongamos por ejemplo la neurotoxina botulínica elaborada por *Clostridium botulinum*, esta toxina es uno de los venenos más potentes del mundo, considerada como arma biológica de destrucción masiva ya que una pequeña cantidad de esta toxina podría matar a una parte de la población bastante considerable. Pues resulta que el ser humano ha sabido utilizarla para usos estéticos como es el botox o incluso para curar el estrabismo. Lo mismo sucede con este biodeterioro de la seda, que teniendo en cuenta las propiedades del biodeterioro podría ser útil para las industrias textiles o incluso en biomedicina.

En el estudio Suwannaphan et al., 2017, los autores aislaron una cepa bacteriana que recibió el nombre de *Bacillus sp. C4 SS-2013*. Como se ha explicado anteriormente, esta cepa es capaz de degradar la sericina sin dañar la fibroína a partir de una proteasa extracelular, ya que permite el desgomado de la fibra de seda conservando la calidad y las propiedades de la fibroína. Esta proteasa extracelular se pudo purificar y se observaron sus propiedades generales que son las siguientes: temperatura óptima entre los 8 y los 50°C, se mantiene estable entre un PH de 5 a 11 y por H₂O₂ (blanqueador de la seda). Además, la actividad enzimática se ve estimulada ante Ca²⁺, su actividad no se ve alterada por bajas temperaturas durante más de 6 meses y posee una actividad específica de 78.0 U mg⁻¹ de sericina con un rendimiento del 6.2%. Debido a estas propiedades, esta proteasa puede ser realmente útil en los procesos de desgomado y una buena opción para las industrias textiles de la seda ya que no daña la fibroína. También puede ser realmente útil en biomedicina ya que sus excelentes funciones de desgomado disminuirían los problemas de incompatibilidad y no provocaría respuestas inmunológicas.

Hay otra proteasa comercial de *Bacillus licheniformis* que también se emplea para el desgomado de la seda en la industria textil pero no es específica para la sericina por lo que reduce la calidad de la fibra (Suwannaphan et al., 2017).

En otro estudio realizado por Tsuboi et al., 2001, se pretendía observar si la luz podía transformar la estructura secundaria de la fibroína, para poder usar proteínas como materiales funcionales en biomimética y bioelectrónica. Observaron que la fibroína con un

fotosensibilizador se excitó a 532 nm (espectro visible) pero no provocó ninguna transformación en la estructura secundaria de la fibroína. En cambio, la fibroína limpia, sin ningún tipo de fotosensibilizador, se excitaba a 266nm (radiación UVC), provocando cambios estructurales en la estructura secundaria ya que se excitaba el triptófano presente en la fibroína.

En el ámbito de ingeniería de tejidos enfocado a biomedicina hay aplicaciones muy prometedoras como lo son las siguientes (Elices et al., 2011):

- Producción de tejido óseo: se puede fabricar estructuras porosas y resistentes con hilos de seda que, sembradas con células adecuadas se degraden lentamente y permitan que el implante se remodele con el tiempo. En estudios realizados por Altman et al., 2003, concluyeron que películas de fibroína indujeron el crecimiento del tejido óseo in vitro cuando se sembraron con osteoblastos.
- Producción de tejido cartilaginoso
- Reconstrucción del ligamento cruzado anterior: cordones formados con hilos de seda y sembrados con células adecuadas se han instalado en biorreactores que simulan la mecánica de la rodilla humana y se ha observado que la matriz de seda favorece la adherencia celular, el asentamiento de los productos extracelulares y la formación de un tejido similar al del ligamento. De hecho, se ha conseguido generar un ligamento cruzado anterior en la rodilla de un cerdo vivo a partir de células pluripotentes implantadas sobre una plantilla de seda.
- Obtención de tubos para sustituir tramos de arterias obstruidas para revascularizaciones coronaria.
- Confección de materiales electrónicos y fotónicos sobre superficies de seda para insertarlas en las honduras del cerebro y así, tratar lesiones epilépticas o de la médula espinal.

7. Conclusiones

1. Los hongos pueden causar el deterioro de los tejidos de seda históricos y de alto valor cultural. Los principales hongos que producen este biodeterioro son *Alternaria alternata*, *Chaetomium globosum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum*. Las especies más activas son *Aspergillus niger* y

Chaetomium globosum frente a las menos activas *Penicillium chrysogenum*, *Alternaria alternata* y *Aspergillus fumigatus*. Estos hongos se encuentran en museos pudiendo ser altamente peligrosos para los tejidos, por lo que se podría hacer un seguimiento de los MVOCs que expulsan, para su detección y control.

2. Las bacterias presentan un enorme potencial para sobrevivir en numerosos sustratos distintos, entre ellos la seda, provocando su deterioro. Se han aislado distintos géneros y especies de bacterias en fibras de seda que provocan biodeterioro y son los siguientes: *Pseudomonas sp.* (Filo Proteobacteria), *Serratia sp.* (Filo Proteobacteria), *Streptomyces sp.* (Filo Actinobacteria) y *Bacillus sp.* (Filo Firmicutes). También se han aislado distintos géneros y especies de bacterias que habitan en suelos que provocan el biodeterioro de la seda pudiendo ser perjudicial para los textiles encontrados en excavaciones arqueológicas, como por ejemplo *Variovorax paradoxu* y varias del género *Pseudomonas* (*P. aureofaciens*, *P. cepacia*, *P. chlororaphis*, *P. paucimobilis*).
3. Hay bacterias que tienen preferencias a la hora de atacar a la sericina o a la fibroína. Es más común que las bacterias deterioren sericina ya que esta es más soluble que la fibroína haciéndola un mejor sustrato para el crecimiento. *B. megaterium* y *P. paucimobilis* usan sericina para el crecimiento, en cambio *P. cepacia* y *Variovorax paradoxu* utilizan la fibroína. Por lo tanto, las más alarmantes frente a la degradación de los textiles de seda históricos son estas dos últimas, ya que los textiles se elaboran a partir de seda desgomada.
4. Se ha observado que la alta biodiversidad de microorganismos que se encuentra en las sedas históricas probablemente represente la historia en sí de la seda y no el pasado inmediato (métodos de conservación).
5. Las condiciones adecuadas de almacenamiento y mantenimiento son muy importantes ya que pueden aumentar la longevidad de los textiles de seda históricos. La clave para mantener en un buen estado estos objetos es el mantenimiento de la temperatura, la humedad relativa, la disponibilidad de nutrientes, la intensidad de la luz y la radiación UV para prevenir el crecimiento de microorganismos y el deterioro que causan directamente los factores ambientales.

6. La seda es un biomaterial novedoso y puntero para la ingeniería de tejidos ya que es biocompatible, resistente y biodegradable. Estudios están comprobando que permite la formación de nuevos tejidos mientras la seda se va degradando, pudiendo llegar a desaparecer. Además, se está estudiando la programación de la seda para que se disuelva al cabo de un tiempo determinado.

8. Bibliografía

- ALTMAN, G. H., DIAZ, F., JAKUBA, C., CALABRO, T., HORAN, R. L., CHEN, J., & KAPLAN, D. L. (2003). Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, **24**(3), 401-416.
- ARAI, T., FREDDI, G., INNOCENTI, R., & TSUKADA, M. (2004). Biodegradation of Bombyx mori silk fibroin fibers and films. *Journal of Applied Polymer Science*, **91**(4), 2383-2390.
- AVENDAÑO ARTEAGA, Y., HINCAPIÉ LLANOS, G. A., CASTRILLÓN MARTÍNEZ, D., CARDONA ARISTIZÁBAL, M., BARAJAS GAMBOA, J. A., & ÁLVAREZ LÓPEZ, C. (2018). Propiedades de la sericina de seda colombiana. *Revista Lasallista de Investigación*, **15**(1), 57-66.
- BECKER, M. A., MAGOSHI, Y., SAKAI, T., & TUROSS, N. C. (1997). Chemical and physical properties of old silk fabrics. *Studies in conservation*, **42**(1), 27-37.
- BRZozowska, I., BOGDANOWICZ, A., SZCZĘSny, P., ZIELENKIEWICZ, U., & LAUDY, A. (2018). Evaluation of bacterial diversity on historical silk velvet textiles from the Museum of King John III's Palace at Wilanów, Poland. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **131**, 78-87.
- ELICES, M., PÉREZ RIGUEIRO, J., PLAZA, G. R., & GUINEA, G. (2011). Usos médicos de la seda. *Investigación y ciencia*, **419**(1), 8-35.
- FORLANI, G., SEVES, A. M., & CIFERRI, O. (2000). A bacterial extracellular proteinase degrading silk fibroin. *International biodeterioration & biodegradation*, **46**(4), 271-275.
- HORAN, R. L., ANTLE, K., COLLETTE, A. L., WANG, Y., HUANG, J., MOREAU, J. E., & ALTMAN, G. H. (2005). In vitro degradation of silk fibroin. *Biomaterials*, **26**(17), 3385-3393.
- KOJTHUNG, A., MEESILPA, P., SUDATIS, B., TREERATANAPIBOON, L., UDOMSANGPETCH, R., & OONKHANOND, B. (2008). Effects of gamma radiation on biodegradation of Bombyx mori silk fibroin. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **62**(4), 487-490.
- KOUSSOULOU, T. (1999). Photodegradation and photostabilization of historic silks in the museum environment—evaluation of a new conservation treatment. *Papers from the Institute of Archaeology*, **10**.
- LAUDY, A. (2013). Silk. In: *An Atlas of Biodeterioration* (ed. J. Verran), p. 32. International Biodeterioration and Biodegradation Society
- LESNIEWICZ, A., GACKIEWCZ, L., & ZYRNICKI, W. (2010). Biodegradation of metallic surgical implants investigated using an ultrasound-assisted process combined with ICP-OES and XRD. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **64**(1), 81-85

LLAGOSTERA, E. (2004). La seda china y la Ruta de la Seda. *Boletín de la Asociación Española de Orientalistas*, **40**, 243-265.

REDONDO, S. M. (2011). La “seda cargada” en la indumentaria entre 1880 y 1930. Metodología de estudio y propuesta de conservación-restauración. *Ge-conservación*, **2**, 81-98.

ROSE, A.H. (1981). History and scientific basis of microbial biodeterioration of materials. In: *Microbial Biodeterioration* (ed, A. H. Rose), pp. 1-18. Academic Press, London.

SAWOSZCZUK, T., SYGUŁA-CHOLEWIŃSKA, J., & DEL HOYO-MELÉNDEZ, J. M. (2015). Optimization of headspace solid phase microextraction for the analysis of microbial volatile organic compounds emitted by fungi: Application to historical objects. *Journal of Chromatography. A*, **1409**, 30-45.

SAWOSZCZUK, T., SYGUŁA-CHOLEWIŃSKA, J., & DEL HOYO-MELÉNDEZ, J. M. (2018). The detection of active moulds on historical silk by the means of the headspace–solid phase micro-extraction–gas chromatography–mass spectrometry method. *Textile Research Journal*, **88(9)**, 1013-1025.

SEVES, A., ROMANÒ, M., MAIFRENI, T., SORA, S., & CIFERRI, O. (1998). The microbial degradation of silk: a laboratory investigation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **42(4)**, 203-211.

SHEN, Y., JOHNSON, M. A., & MARTIN, D. C. (1998). Microstructural characterization of Bombyx mori silk fibers. *Macromolecules*, **31(25)**, 8857-8864.

SONTHISOMBAT, A., & SPEAKMAN, P. T. (2003). Silk: queen of fibres–The concise story. *วิศวกรรมศาสตร์ ราช มงคล ธีญบุรี*, **4(1)**.

SUWANNAPHAN, S., FUFUENGSOBUT, E., PROMBOON, A., & CHIM-ANAGE, P. (2017). A serine protease from newly isolated Bacillus sp. for efficient silk degumming, sericin degrading and colour bleaching activities. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **117**, 141-149.

TSUBOI, Y., IKEJIRI, T., SHIGA, S., YAMADA, K., & ITAYA, A. (2001). Light can transform the secondary structure of silk protein. *Applied Physics A*, **73(5)**, 637-640.

VALENTIN, N., & GARCÍA, R. (2004). El biodeterioro de materiales orgánicos. *Jornadas Monográficas Prevención del biodeterioro en archivos y bibliotecas. Instituto del Patrimonio Histórico Español*, **14**, 15-84

ZHANG, H., MAGOSHI, J., BECKER, M., CHEN, J. Y., & MATSUNAGA, R. (2002). Thermal properties of Bombyx mori silk fibers. *Journal of applied polymer science*, **86(8)**, 1817-1820.

https://www.granadahoy.com/granada/seda-Granada-mejor_0_632037085.html (12/02/2019)

<https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing.html> (26/03/2019)

https://www.ecured.cu/Denier_unidad_de_medida (06/04/2019)