The background of the cover features a central white rectangular area with a black border. This area is surrounded by abstract, colorful brushstrokes in shades of blue, green, orange, and purple. Scattered throughout the white area are numerous small, circular, brownish structures that resemble microscopic mold spores or fungal hyphae, some appearing in clusters and others in pairs.

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE TRES ACEITES ESENCIALES CONTRA HONGOS AISLADOS DE PINTURA MURAL

CRISTINA DEL RÍO OLIVER

Tutores: Dr. Jose Luis Regido Ros y Dra. Rosa María Montes Estellés

Trabajo final de Máster en Conservación y Restauración de Bienes Culturales



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Conservación
y Restauración
de Bienes
Culturales
Máster
Universitario
UPV



ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE TRES ACEITES ESENCIALES CONTRA HONGOS AISLADOS DE PINTURA MURAL

CRISTINA DEL RÍO OLIVER

Tutores: Dr. Jose Luis Regidor Ros y Dra. Rosa María Montes Estellés

Trabajo final de Máster en Conservación y Restauración de Bienes Culturales



UNIVERSITAT
POLITÀCNICA
DE VALÈNCIA



Conservación y Restauración
de Bienes
Culturales
Máster
Universitat
UPV





RESUMEN

Los microorganismos juegan un papel muy importante en el deterioro del patrimonio cultural debido a los daños estéticos, físico mecánico y químicos (asimilatorios y desamilatorios) que pueden causar. El objetivo del presente trabajo es estudiar productos naturales de menor toxicidad y mayor respeto con el medio ambiente que los biocidas convencionales, que cumplan las mismas funciones y sean capaces de controlar los crecimientos biológicos.

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron 6 géneros diferentes de hongos, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Trichoderma* sp., *Alternaria* sp. y *Absidia* sp., todos ellos fueron aislados de las pinturas murales situadas en la ermita de Santa María de Arcos en Tricio (La Rioja, España) datadas entre el siglo XI y XII. Durante la investigación se seleccionaron tres aceites esenciales con buenas propiedades antifúngicas, de acuerdo a la bibliografía consultada, aceite esencial de Orégano, Tomillo y Clavo.

Primero se comprobó la actividad antifúngica de los aceites esenciales sobre todos los hongos en placas Petri con medios *Sabouraud Dextrose Agar* (SAB), empleando como control positivo Cloruro de Benzalconio (neo[®]Desogen). Posteriormente se comprobó la eficacia de los aceites emulsionados en diferentes concentraciones (100%, 50%, 10%, 5%, 1%). Finalmente se comprobó la efectividad de la concertación inhibidora mínima sobre la superficie de una probeta de características similares a las pinturas de este estudio.

PALABRAS CLAVE

Aceite Esencial de Orégano; Aceite Esencial de Tomillo; Aceite Esencial de Clavo; Pintura Mural; Biocidas; Patrimonio Cultural

RESUM

Els microorganismes juguen un paper molt important en el deteriorament del patrimoni cultural a causa dels danys estètics, físic mecànic i químics (asimilatoris i desamilatoris) que poden causar. L'objectiu del present treball és estudiar productes naturals de menor toxicitat i major respecte amb el medi ambient que els biocides convencionals, que complisquen les mateixes funcions i siguen capaços de controlar els creixements biològics.

Per a dur a terme este estudi es van utilitzar 6 gèneres diferents de fongs, *Aspergillus níger*, *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Alternaria sp.* i *Absidia sp.*, tots ells van ser aïllats de les pintures murals situades en l'ermita de Santa Maria d'Arcs en Tricio (La Rioja, Espanya) datades entre el segle XI i XII. Durant la investigació es van seleccionar tres olis essencials amb bones propietats antifúngiques, d'acord amb la bibliografia consultada, oli essencial d'Orenga, Timó i Clau.

Primer es va comprovar l'activitat antifúngica dels olis essencials sobre tots els fongs en plaques Petri amb mitjans Sabouraud Detroxe Agar (SAB), emprant com a control positiu Clorur de Benzalconio (neo[®]Desogen). Posteriorment es va comprovar l'eficàcia dels olis emulsionats en diferents concentracions (100%, 50%, 10%, 5%, 1%). Finalment es va comprovar l'efectivitat de la concertació inhibidora mínima sobre la superfície d'una proveta de característiques semblants a les pintures d'este estudi.

PARAULES CLAU

Oli Essencial d'Orenga; Oli Essencial de Timó; Oli Essencial de Clau; Pintura Mural; Biocides; Patrimoni Cultural

ABSTRACT

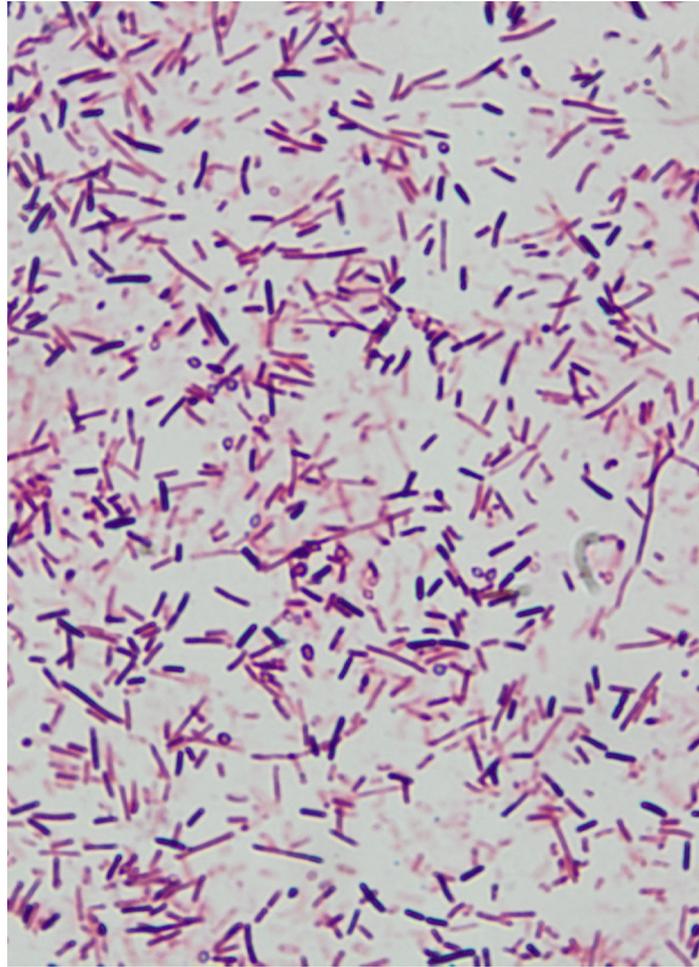
Microorganisms play an important role in the deterioration of cultural heritage due to the aesthetic, physical-mechanical and chemical damage they can cause. The aim of this work is to study natural products of less toxicity and greater respect for the environment than conventional biocides, which fulfill the same functions and capable of controlling biological growths.

To carry out this study, 6 different genera of fungi were used, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Trichoderma* sp., *Alternaria* sp. and *Absidia* sp., all of them were isolated from the mural paintings located in the hermitage of Santa María de Arcos in Tricio (La Rioja, Spain) dated between the 11th and 12th century. During the investigation three essential oils with good antifungal properties were selected, according to the consulted bibliography, essential oil of Oregano, Thyme and Clove.

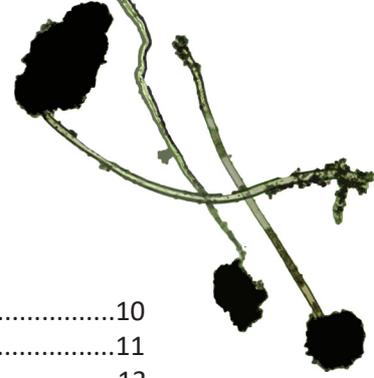
The antifungal activity of the essential oils was checked on all the fungi in Petri dishes with Sabouraud Dextrose Agar (SAB) media, using as a positive control Benzalkonium Chloride (neo[®] Desogen). Subsequently, the effectiveness of emulsified oils in different concentrations was verified (100%, 50%, 10%, 5%, 1%). Finally, the effectiveness of the minimum inhibitory concentration was tested on the surface of a sample with similar characteristics to the mural paintings of Tricio.

KEY WORDS

Oregano Essential Oil; Thyme Essential Oil; Clove Essential Oil; Mural Painting; Biocides; Cultural Heritage



ÍNDICE



INTRODUCCIÓN.....	10
ESTADO ACTUAL DE LA CUESTIÓN.....	11
OBJETIVOS.....	13
METODOLOGÍA.....	14
1. BIOLOGÍA Y SERES VIVOS. Hongos y Bacterias.....	16
2. FACTORES AMBIENTALES EN EL DESARROLLO BIOLÓGICO.....	18
2.1. Factores limitantes.....	18
2.2. El agua y los microorganismos.....	18
2.3. Factores climáticos.....	19
2.4. Contaminantes atmosféricos.....	21
3. BIODETERIORO.....	22
3.1. Biodeterioro de material inorgánico.....	24
4. MÉTODOS DE CONTROL.....	25
5. NUEVAS ALTERNATIVAS PARA LA ERRADICACIÓN BIOLÓGICA.....	28
5.1. Aceites esenciales.....	29
6. CONTROL AMBIENTAL.....	32
6.1. Registro climático.....	32
6.2. Humedad superficial de los muros.....	33
6.3. Análisis microbiológico del aire.....	34
7. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS PINTURAS MURALES.....	36
7.1. Detección de ATP.....	36
7.2. Análisis de velo blanquecino.....	37
7.3. Aislamiento e identificación de Hongos y denominación de Bacterias.....	39
8. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES (AEs).....	45
8.1. Actividad antifúngica de los AEs de orégano y tomillo.....	48
8.2. Actividad antibacteriana de los AEs.....	49
9. CONCENTRACIONES INHIBITORIAS.....	51
10. TEST DE EFICACIA ANTIFÚNGICA DE AEs EN PROBETAS.....	53
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	55
CONCLUSIONES.....	57
BIBLIOGRAFÍA.....	60
AGRADECIMIENTOS.....	63
ÍNDICE DE FIGURAS.....	64
ANEXO.....	66

INTRODUCCIÓN

La contaminación biológica se ha convertido a lo largo de los años en una cuestión clave para la conservación del patrimonio cultural. Con el avance de la biotecnología se han comenzado a descubrir nuevos caminos viables para gestionar métodos de prevención y control del biodeterioro.

En el año 2016 se comenzó a desarrollar un estudio sobre el estado de conservación del conjunto mural de la ermita de Santa María de Arcos en el municipio de Tricio, La Rioja, España, declarada Bien de Interés Cultural en 1978. Se realizó como trabajo final del Grado en Conservación y Restauración de Bienes Culturales por la Universidad Politécnica de València¹ de la misma autoría y dirección de la presente investigación.

Dicho conjunto mural reproduce a una de las representaciones artísticas más singulares de la comunidad riojana. Las pinturas están situadas en lo que antiguamente fue un mausoleo romano, a partir del cual se comenzó a edificar la actual ermita a lo largo de los años, simbolizan diferentes escenas de la vida de Jesucristo, entre las escenas que hoy en día se conservan. Con mejor lectura destacamos la Última Cena y la Crucifixión .

Datan aproximadamente entre el siglo XII o XIII, enmarcadas estilísticamente dentro del tardo-románico o gótico lineal. Técnicamente emplean un cromatismo muy reducido (óxidos de hierro y carbón vegetal) recurriendo a la línea como medio de expresión.

Las pinturas fueron descubiertas en 1979, hasta la fecha habían permanecido tapadas por un retablo y yeserías barrocas. Los fragmentos principales, en los que existe mayor cantidad de pintura, fueron restaurados en 1980, los restantes en 1997.

A lo largo del estudio en el pasado trabajo final de grado, se realizaron una serie de controles para determinar con mayor exactitud el estado de conservación del conjunto mural, se centraron en realizar un estudio climatológico, cálculo del índice de absorción y control de la actividad biológica.

Este último se realizó sobre unas manchas de posible origen biológico en zonas anexas a las pinturas. Se llevaron a cabo dos sistemas de muestreo, para el posterior aislamiento de esporas fúngicas y crecimiento en condiciones óptimas para desarrollar colonias. Se ejecutaron mediante métodos de contacto, se detectaron crecimientos de hongos en todas las muestras, colonias del género *Aspergillus* y *Penicillium* y una colonia del género *Alternaria s.p.* Esta colonia, comúnmente conocida como uno de los hongos negros, fue la que se diagnosticó de mayor riesgo, debido a las manchas negras que generan sobre la superficie, de difícil o imposible eliminación. Estos hongos producen este tipo de manchas debido a la melanina presente en el micelio².

El control y la reducción de este tipo de crecimientos biológicos es posible mediante métodos indirectos, como control de temperatura y humedad relativa (HR). Estos factores son decisivos a la hora de realizar tratamientos de larga duración para evitar el desarrollo de microorganismos. En cualquier caso, controlar estos parámetros en ciertos espacios como iglesias, hipogeos o edificios históricos resulta en muchos casos económica y estructuralmente extremadamente complicado o imposible. Estos lugares carecen en la mayoría de situaciones de sistemas de con-

¹ RÍO OLIVER, C. del. (2017). *ESTUDIO DEL ESTADO DE CONSERVACIÓN DE LAS PINTURAS MURALES DEL MAUSOLEO ROMANO DE LA ERMITA DE SANTA MARIA DE ARCOS (TRICIO, LA RIOJA)*. Disponible en: RiuNet.
² CANEVA, G., NUGARI, M.P. Y SALVADORI, S. (2000). *La biología en la restauración*.

trol climático e incluso cuando existen los parámetros suelen ajustarse al uso humano y no a los objetos culturales³

Por este motivo, en la mayoría de casos se recurre al uso de biocidas para controlar la proliferación de microorganismos.

Desde este punto de vista se decidió realizar la presente investigación, teniendo como motivación el estudio y desarrollo de nuevos métodos de erradicación biológica. Empleado como modelo de análisis las pinturas murales anteriormente citadas, sobre las cuales ya se obtienen controles biológicos positivos, nombrados previamente (*colonias del género Aspergillus s.p.*, *Penicillium s.p.* y *Alternaria s.p.*).



Figuras 1 y 2 - Interior de la ermita en la uqe se encuentran las pinturas.



Figura 3 - Pinturas de la ermita de Santa María de Arcos, Tricio, La Rioja.

3 PALLA, F. Y BARRESI, G. (2017). Biotechnology and Conservation of Cultural Heritage. Pag 32.

ESTADO ACTUAL DE LA CUESTIÓN

Plantear un tratamiento apropiado para la eliminación de microorganismos resulta en todos los casos una cuestión problemática. El primer paso para acercarse a una solución efectiva supone la identificación de estas comunidades biológicas y establecer un método de erradicación positivo, que en la mayoría de casos da como resultado el uso de métodos químicos a base de biocidas.

Además de poseer una elevada eficacia hacia los biodeteriogénos, los biocidas deben abarcar un mayor número de condiciones: ausencia interacción con los materiales constituyentes de la obra, baja toxicidad para la salud humana y para la contaminación. Desgraciadamente, la gran mayoría, o bien, todos los biocidas empleados en nuestro campo de trabajo son sustancias tóxicas, contaminantes y de difícil degradación⁴.

Todos los biocidas deben estar registrados por las instituciones del gobierno correspondientes, en el caso de España el Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social según La Agencia de Sustancias Químicas Europea, ECHA (*European Chemical Agency*), donde se reflejan los perfiles toxicológicos de los diferentes constituyentes presentes en los biocidas, así como, listados de elementos descatalogados, prohibidos por sus altos índices de toxicidad, y nuevos productos en proceso de aceptación⁵.

La toxicidad se define como la capacidad de un compuesto para infligir lesiones o muerte en un organismo. Toda sustancia puede ser considerada tóxica, y solo la justa dosis distingue un veneno de una medicina⁶. Esta dosis se indica con las siglas DL_{50} , dosis letal para el 50% de los individuos, CL_{50} para compuestos gaseosos.

En consecuencia, durante los últimos años, se han comenzado a estudiar nuevos métodos y sustancias con capacidades antibióticas que sean capaces de sustituir y solventar estos problemas.

En el campo de la conservación y restauración de bienes culturales, existen ya, varios estudios sobre el uso de métodos de aplicación que ofrezcan mayor seguridad, también la utilización de moléculas sintéticas, como nanopartículas metálicas, y moléculas naturales, procedentes de las plantas.

Dentro de estas últimas se encuentran los aceites esenciales, cuyos componentes activos han demostrado tener grandes capacidades antifúngicas y antibacterianas. La facilidad que existe hoy en día para la adquisición de aceites esenciales, sus bajos costes y sus bajos niveles de toxicidad⁷ han servido de motivación para su testado en esta investigación, además, de la conclusión en la mayoría de estudios por la necesidad de continuar investigando sobre estas nuevas alternativas, con el fin, de convertir su uso en algo real.

4 Ibid, p.54

5 EUROPEAN CHEMICALS AGENCY, echa.europa.eu

6 CANEVA, G., NUGARI, M.P. Y SALVADORI, S. Op.Cit.

7 *En la mayoría de casos la toxicidad de los componentes de los aceites esenciales está asociada a su ingestión o contacto directo con la piel prolongado, por ello su uso terapéutico o nutricional solo debe ser administrado bajo la supervisión de un profesional. En cualquier caso, en nuestro campo las cantidades empleadas son mínimas reduciendo la toxicidad al máximo.*

OBJETIVOS

El objetivo general de la presente investigación es comprobar la eficacia de los aceites esenciales de Orégano, Tomillo y Clavo, como agentes antifúngicos sobre hongos aislados del conjunto mural de la ermita de Santa María de Arcos, en Tricio, La Rioja. Con la finalidad de poder profundizar e investigar en la propuesta de alternativas a los biocidas convencionales, de baja toxicidad para el ser humano y el medio ambiente.

Con el fin de conseguir este propósito se han planteado los siguientes objetivos específicos:

Realizar un control biológico sobre las pinturas anteriormente citadas, el inmueble y entorno en el que se encuentran, para poder determinar el nivel de contaminación. De este modo, poder comprobar si existe presencia microbiológica en las pinturas murales y de qué manera puede estar afectando al conjunto.

Establecer los posibles factores que favorecen el crecimiento de los microorganismos, para conocer cuáles son las condiciones óptimas para su proliferación. Así, reconocer cuales son los factores de mayor riesgo para la futura conservación de las pinturas y en qué medida podrían afectar al planteamiento de un tratamiento biocida.

Determinar, dentro de los aceites esenciales seleccionados, cuales muestran mayores capacidades antifúngicas en función de los hongos seleccionados para el estudio.

Por último, considerar y reflexionar sobre el uso de sustancias naturales alternativas, en nuestro caso los aceites esenciales, y la viabilidad de uso en el campo de la conservación y restauración.

Como objetivo complementario puesto que también se conoce la existencia de bacterias sobre el conjunto mural, en caso de que obtener resultados positivos con la actividad antifúngica de los aceites esenciales, comprobar sus capacidades antibióticas sobre aislamientos bacterianos.

METODOLOGÍA

Para alcanzar los objetivos planteados anteriormente y poder desarrollar la presente investigación se ha utilizado la siguiente metodología de trabajo:

Realización de un estudio teórico, con dos fines principales: conocer en profundidad el comportamiento de los microorganismos en la pintura mural y recopilar información sobre el uso de tratamientos biocidas y las nuevas alternativas que se están planteando en el campo de la conservación y restauración.

Para ello se han realizado numerosas búsquedas empleando las siguientes bases de datos: Socpus, Science Direct, Google Académico, Dialnet Plus, ResearchGate y Academia.eu.

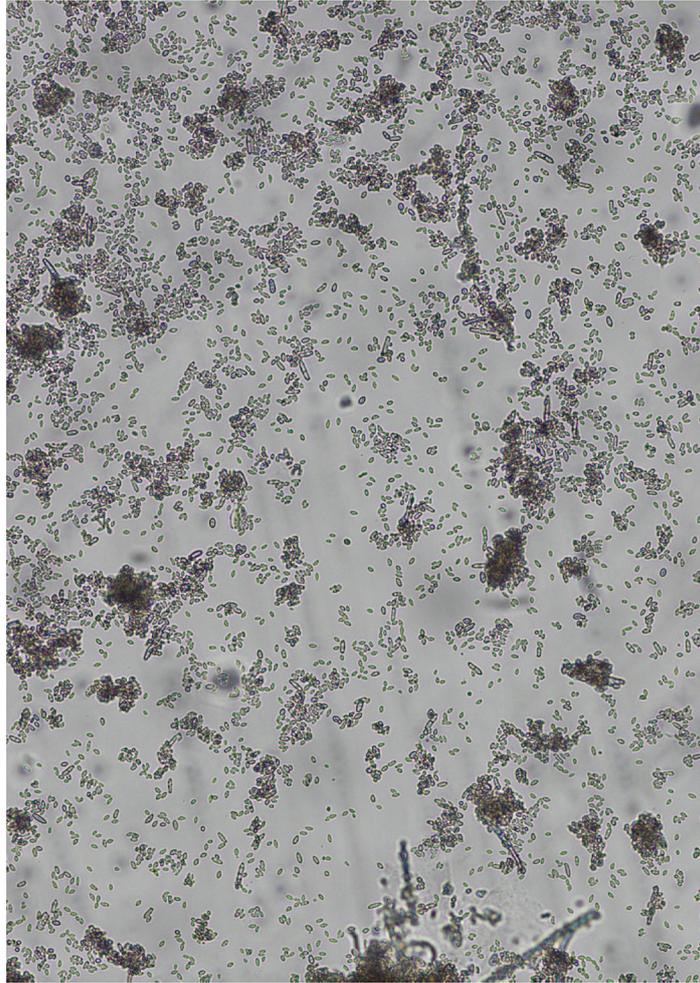
Se realizó un estudio insitu de las pinturas con los directores del presente estudio y se llevaron a cabo una serie de controles sobre el conjunto mural, con la finalidad, de realizar diferentes tipos e toma de muestras para poder determinar el alcance de la contaminación biológica en el entorno y las pinturas. Además, de poder realizar aislamientos fúngicos para la realización de este estudio. Se tomaron muestras de la contaminación microbiológica del aire y sobre las superficies murales.

Como complemento al estudio de campo se llevó a cabo un control climatológico para poder aumentar los datos obtenidos en la pasada investigación y conocer la mayor cantidad de información posible sobre el entorno sobre el que se realizó el muestreo.

La fase experimental en laboratorio se llevó a cabo en el departamento de biotecnología de la Escuela de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de València. Los aceites esenciales testados en esta investigación se seleccionaron en función de la bibliografía estudiada, así como, los procesos llevados a cabo durante toda la experimentación en cuanto a porcentajes y concentraciones.

En la primer fase de la investigación de laboratorio se comprobó la efectividad de los aceites esenciales a diferentes cantidades, una vez examinados los resultados se llevo a cabo la segunda fase, donde se testaron los aceites emulsionados a diferentes concentraciones. Por último se comprobó la capacidad de estas emulsiones en una probeta de naturaleza similar a una pintura mural como la del caso de estudio, con el fin de poder hipotetizar sobre su uso en una obra real.

Todas estas fases serán explicadas detalladamente a lo largo e la presente investigación.



1. BIOLOGÍA Y SERES VIVOS

HONGOS Y BACTERIAS

La diferencia entre un ser vivo y uno no vivo es el grado de organización de los elementos químicos que lo componen. Todos los organismos vivos comparten una alta complejidad y organización, la capacidad de transformar y utilizar la energía y la posibilidad de reproducirse.

Una célula es la estructura más sencilla capaz de realizar las funciones propias de un ser vivo, nutrición, relación y reproducción⁸. Las células se dividen en dos tipos según su modelo de organización, procariotas y eucariotas.

Las células procariotas son el tipo de célula más primitiva y menos evolucionada, carecen de núcleo y su información genética reside en un cromosoma único. Dentro de este tipo de células se encuentran las bacterias, cianobacterias y actinomicetos⁹.

Las células eucariotas, están constituidas por núcleo y citoplasma. Las células eucariotas son la unidad base de plantas, animales, hongos, protozoos y algas¹⁰.

Bacterias

Son organismos unicelulares, no tienen membrana nuclear pero sí citoplasmática que está rodeada por una pared con función protectora y mecánica. Esta pared determinará la forma de la bacteria, según la cual, se pueden clasificar en: *cocos*, *bacilos*, y *espirilos*¹¹.

Algunas bacterias podrán formar esporas como medio para sobrevivir a condiciones ambientales desfavorables. Existen bacterias autótrofas o heterótrofas y fotosintéticas o quimiosintéticas¹².

Hongos

Son organismos multicelulares, se forman a partir de una célula inicial, espora, después cada célula se diferenciará realizando diferentes funciones¹³. Se clasifican según cuatro clases: Ascomycetos, que son el grupo más abundante y complejo, *Basidiomicetos*, *Zygomycetos* y *Deuteromycetes*¹⁴. Los hongos son seres heterótrofos, se caracterizan por tener un talo filamentosos formado por hifas, el conjunto de estas forman el micelio. Se diferencian de las células vegetales porque no tienen cloroplastos, por lo tanto no pueden llevar a cabo la fotosíntesis. Tampoco pueden incluirse dentro de los animales, ya que, carecen de funciones de locomoción y de ingestión de alimentos, puesto que los absorben.

Las hifas pueden ser de dos tipos, vegetativas que llevarán el agua necesaria para la vida y las reproductivas que formarán esporas. La germinación de estas se puede producir inmediatamente, con el crecimiento correspondiente de los micelios, si las condiciones ambientales son favorables¹⁵.

8 VALGAÑÓN, V. *Op.Cit.*

9 CANEVA, G., NUGARI, M.P. Y SALVADORI, S. *Op.Cit.* p.210.

10 VALGAÑÓN, V. *Op.Cit.* p.28

11 PALLA, F. Y BARRESI, G. *Op.Cit.* p.7

12 CANEVA, G., NUGARI, M.P. Y SALVADORI, S. *Op.Cit.* p.217

13 VALGAÑÓN, V. *Op.Cit.* p.27

14 *Ibid.* p.159

15 CANEVA, G., NUGARI, M.P. Y SALVADORI, S. *Op.Cit.* p.222

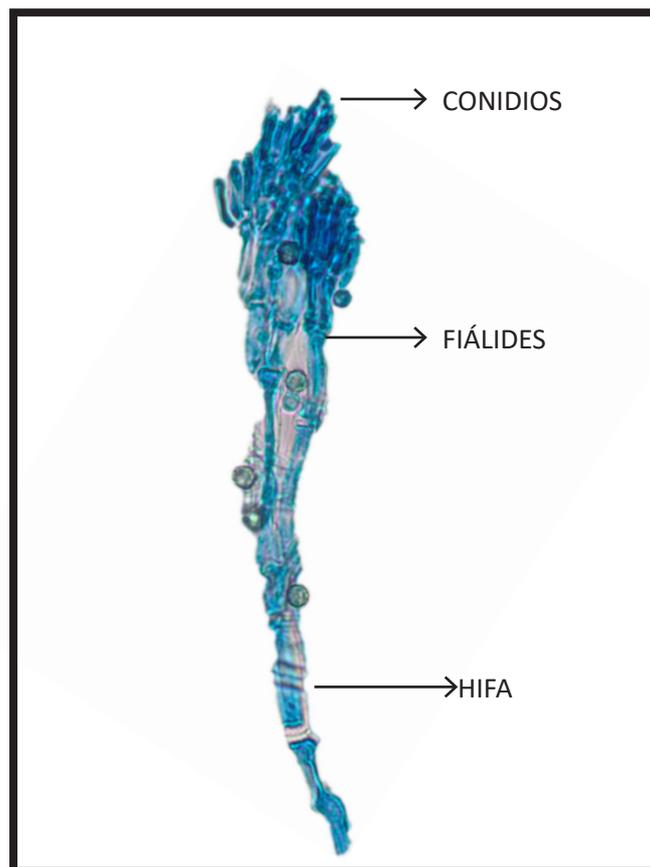
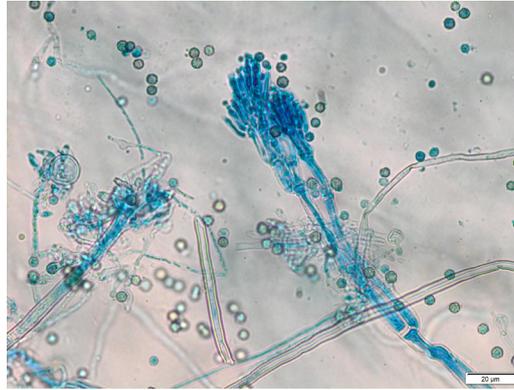


Figura 4 - Imagen de Penicillium observada a microscopio óptico (400 aumentos). Detalle con las partes del Penicillium sp.

2. FACTORES AMBIENTALES EN EL DESARROLLO BIOLÓGICO

La presencia de microorganismos en el patrimonio cultural no solo se debe a la idoneidad de los materiales constituyentes de las obras, sino que, existen una serie de factores necesarios para el desarrollo y proliferación de ciertos organismos.

A lo largo de este apartado se introducirán brevemente los factores más importantes para la presencia de agentes microbianos, haciendo referencia a los aspectos más significativos en pintura mural y edificios históricos.

2.1. FACTORES LIMITANTES

Se comprende como factor limitante aquel factor ambiental que condiciona o cohibe la presencia de especies biológicas¹⁶. La explicación de la importancia entre los factores limitantes y la existencia de poblaciones biológicas esta descrita por dos leyes, la ley de mínimo y la ley de la tolerancia.

La ley del mínimo o *ley de Liebig*, determina que, dentro de todos los elementos necesarios para el crecimiento o aparición de organismos el que se encuentre en una cantidad mínima será el que condicionará el desarrollo de estos, por ejemplo, en un hipogeo la luz será un factor limitante para organismos fotosintéticos¹⁷.

La ley de la tolerancia o *ley de Shelford*, manifiesta que, al igual que un factor puede ser limitante, cuando se encuentre en cantidades mínimas, también puede serlo cuando se encuentra en máximas, ya que, un organismo tiene límites máximos y mínimos de tolerancia, por ejemplo, hay especies que no soportan temperaturas muy altas, por lo que, al alcanzarlas esta se convertirá en un factor limitante¹⁸.

Cualquier factor ambiental podrá ser un factor limitante cuando se encuentre cercano a los valores máximos o mínimos que un organismo tolere para vivir.

2.2. EL AGUA Y LOS ORGANISMOS

El agua desempeña un papel imprescindible para la vida, representa entre un 70%-90% del total del peso de un organismo, por lo tanto, es esencial para la presencia de microorganismos.

Utilizan tanto el agua presente en el ambiente como la del sustrato en el que se encuentre la obra, que llega por medio de distintas fuentes. Dependiendo de la porosidad y la higroscopicidad del muro, la capacidad de captar y retener agua variará, como por ejemplo en el caso de las pinturas murales, influyendo así en el contenido de agua total.

Dentro del contenido acuoso que puede permanecer en el interior del muro, se deben destacar los dos parámetros químicos más importantes para el crecimiento biológico, el pH y la presión osmótica¹⁹

16 CANEVA, G., NUGARI, M.P. Y SALVADORI, S. *Op.Cit.*p.16

17 *Íbid*

18 *Íbid.* p.17

19 *Íbid* p.25

Por lo general, un gran número de organismos y microorganismos prefieren unas condiciones de pH neutras, los neutrófilos. No obstante, existen numerosas especies de hongos que son acidófilas, es decir, prefieren valores más bajos, ácidos. Por otro lado otras especies de bacterias son basófilas, prefieren condiciones neutras o ligeramente alcalinas²⁰. Por ello, no toda el agua presente en los muros o sustratos es apta para todas las especies como nutriente.

Por la presión osmótica, se tiende a generar un equilibrio entre la solución acuosa del interior de la célula a la del medio en que esta se encuentra. Si la célula está en un medio hipotónico (bajo contenido en partículas salinas) el agua entrará en el interior de la célula hinchándola, las células vegetales, bacterianas y fúngicas tienden a equilibrar esta presión por sus paredes rígidas. Sin embargo, si la célula se encuentra en un medio hipertónico, con mayor concentración de partículas que la solución del interior de la célula, el agua saldrá del interior de la célula, si este proceso de equilibrio es muy brusco la célula se desecará²¹.

Por lo tanto el rango de pH y la presión osmótica serán factores limitantes para crecimiento de especies biológicas.

Frecuentemente, los organismos necesitan cantidades de agua abundantes para vivir, sin embargo, microorganismos como las cianobacterias y los líquenes, llamados poiquilohídricos, pueden sobrevivir con bajos niveles de agua suspendiendo sus reacciones metabólicas y volviéndolas a activar en presencia de más agua. De la misma manera, algunas bacterias forman endoesporas como mecanismo contra la desecación²².

2.3. FACTORES CLIMATOLÓGICOS

Temperatura

Por norma general, las zonas con climas cálido-húmedos son favorables para la existencia de especies biológicas, sin embargo, existen grupos de organismo capaces de vivir a bajas temperaturas²³.

Con todo, los microorganismos tienen un rango de vida límite, por ello, se debe distinguir entre vida activa y supervivencia inactiva. La mayoría de especies son mesófilas, su rango activo de metabolismo está entre 25°C y 35°C. Las que soportan bajas temperaturas son llamadas psicrófilas y su rango se sitúa entre 0°C y 10°C y las que se adaptan a altas temperaturas, termófilas, entre 30°C y 50°C²⁴.

Al igual que ocurre con el agua, cuando las condiciones de temperatura no son óptimas para una especie, su metabolismo quedará inactivo hasta que se den las condiciones adecuadas y volverá a activarse.

Cuando los valores de temperatura sean muy bajos, por debajo de los 0°C, el agua se congelará, por lo tanto, el agua del interior de las células también, haciendo que algunas especies mueran. Del mismo modo, cuando las temperaturas sean extremas, por encima de los 50°C-60°C, los organismos sufrirán grandes daños²⁵.

La actividad de las enzimas de un organismo tiene valores de temperatura óptimos para su funcionamiento, por lo tanto, marcarán los valores de temperatura adecuados para estos. Así, si se alcanzan las temperaturas extremas la energía aumentará tanto que provocará la ruptura de los

20 Íbid

21 Íbid. p.26

22 CANEVA, G., NUGARI, M.P. Y SALVADORI, S. Íbid. p.24

23 VALGAÑÓN, V. *Op.Cit.* p.89

24 CANEVA, G., NUGARI, M.P. Y SALVADORI, S. *Op.Cit.* p.30

25 VALGAÑÓN, V. (2008). *Op.Cit.* p.91

enlaces y las enzimas quedarán en estado inactivo²⁶.

Por último, la variación de la temperatura influirá en la humedad relativa que será decisiva para el crecimiento de microorganismos. Estas son inversamente proporcionales, a mayor temperatura la humedad relativa disminuirá, y a menor se producirá el efecto contrario²⁷.

Agua

La humedad contenida en el aire también influirá de manera decisiva en el desarrollo de crecimientos biológicos. La humedad absoluta (HA) representa la cantidad de agua existente absoluta y la humedad relativa (HR) determina la cantidad de agua en un cierto volumen de aire y el necesario para alcanzar la saturación. Para el desarrollo biológico será la HR la que marcará los valores óptimos para la proliferación de microorganismos como hongos y bacterias. También influirá en los fenómenos de evaporación y por lo tanto en el contenido de agua de los materiales. La mayoría de especies encuentran los valores óptimos de HR a partir de un 60% -70%²⁸.

Como se ha comentado anteriormente, el agua puede acceder a la obra por medio de diferentes fuentes. Por humedad capilar, el agua llegará por medio de la ascensión capilar de humedad presente en el suelo, donde el agua será absorbida por la red porosa del muro. Por electro-ósmosis, el agua fluirá del polo negativo al positivo, a través de la misma red porosa. Por infiltración del agua de lluvia, que penetrará por roturas de la estructura y se introducirá hacia el interior del muro por las zonas superiores.

Cuando el vapor de agua se condense, por la diferencia térmica entre el muro y la humedad ambiental, las gotas de agua que se generen podrán ser absorbidas capilarmente por el muro.

Luz

La luz será vital para el desarrollo de organismos fotosintéticos, como algas, cianobacterias, líquenes, musgos y plantas superiores. Sin embargo, para la proliferación de algunas especies, como insectos u hongos, la luz puede ser un factor sin importancia incluso negativo para su desarrollo. Por otro lado, existen algunos organismos capaces de producir su propia luz por mecanismos químicos, en los que no se desprende calor, como algunos insectos, algas, hongos y bacterias²⁹.

Viento

El viento, por lo general, puede influir de dos maneras sobre el deterioro y crecimiento de microorganismos en obras. Por una parte, las partículas sólidas que este arrastra pueden erosionar el material, disgregándolo y favoreciendo así el acceso de los seres vivos. De la misma forma, puede transportar y ayudar a la dispersión de orgánulos reproductores de los seres vivos o incluso a ellos mismos³⁰.

26 CANEVA, G., NUGARI, M.P. Y SALVADORI, S.Op.Cit., P.3

27 VALGAÑÓN,V. (2008). Op.Cit., P.87

28 PALLA, F. Y BARRESI,G. Op.Cit, p22

29 VALGAÑÓN,V. Op.Cit, p.96

30 Ibidp.97

2.4. CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA

Entendemos como contaminantes atmosféricos todos aquellos compuestos presentes en el aire (en fase gaseosa, líquida, sólida o en aerosol) que no forman parte de la composición normal del aire³¹.

La atmósfera está compuesta por Nitrógeno (N₂) en un 78,084%, Oxígeno (O₂) 20,946%, Argón (Ar) 0,934% y otros gases en un 0,036%³².

El nitrógeno servirá de nutriente para un pequeño grupo de organismos, denominados fijadores de nitrógeno, entre ellos las cianobacterias. La mayoría de especies necesita oxígeno para sobrevivir, organismos aerobios, en contraste los organismos anaerobios no necesitarán oxígenos para vivir y cuando la cantidad de este supere un 5% serán inhibidos. Además existen organismos capaces de vivir en presencia o ausencia de oxígeno, aerobios y anaerobios facultativos³³.

Podemos dividir los contaminantes atmosféricos en dos grandes grupos, contaminantes en fase gaseosa y contaminantes en partícula. Estos últimos se subdividen en partículas no vivas y vivas, dentro de las cuales encontramos esporas de hongos, bacterias y algas. En cuanto a los contaminantes gaseosos encontramos compuestos de carbono, azufre, flúor y cloro, ozono y oxidantes y otros compuestos gaseosos³⁴.

Algunos microorganismos pueden utilizar estos contaminantes como nutrientes, favoreciendo así su desarrollo. En algunas ocasiones, serán un factor limitante para la aparición de algunas especies, como líquenes. Igualmente, existen bacterias capaces de transformar sustancias como el sulfuro de hidrógeno (SH₂) en sustancias mucho más dañinas como ácido sulfúrico (H₂SO₄)³⁵.

Bioaerosoles

Como anteriormente se citaba, una parte de los contaminantes presentes en la atmósfera son partículas vivas. El término bioaerosol define una suspensión de aerosoles o partículas matéricas de origen microbiano, vegetal o animal. Pueden ser partículas patógenas o no patógenas, y entre otros elementos, bacterias, hongos, algas, etc, en estado vivo o muerto.

La aerobiología es la ciencia, que desde hace relativamente poco tiempo, estudia el comportamiento de estas partículas aerotransportadas, como afectan al medioambiente y como pueden influenciar en ciertos materiales como obras de arte³⁶.

Estas partículas, son depositadas sobre todo tipo de superficies. Una vez asentadas, interactúan con el sustrato, pudiendo llegar a causar deterioros biológicos³⁷.

31 LALLI, C y LALLI, C. (2004) "Contaminación atmosférica. Daños a los objetos expuestos" en La vetrina per il museo. p.19.

32 VALGAÑÓN, V. Op.Cit, p. 98

33 CANEVA, G., NUGARI, M.P. Y SALVADORI, S. Op.Cit., p.27.

34 LALLI, C y LALLI, C. Op.Cit,

35 VALGAÑÓN, V. Op.Cit, p. 115

36 PALLA, F. Y BARRESI, G. Op.Cit., p.35

37 PALLA, F. Y BARRESI, G. Íbid, p.37

3. DETERIORO BIOLÓGICO

El término biodeterioro es empleado para describir una serie de procesos que han afectado al ser humano desde que comenzó a poseer y utilizar materiales. La definición aceptada de biodeterioro fue propuesta por H.J. Hueck, entre 1965 y 1968, determina como biodeterioro *“cualquier cambio indeseable en las propiedades de un material causado por la actividad de los seres vivos”*³⁸.

Cuando hablamos de seres vivos, nos referimos a agentes biológicos como microorganismos y organismos más complejos. Generalmente, cuando se exponen problemas referentes al biodeterioro en el ámbito cultural, se describen procesos causados por hongos, bacterias, algas, líquenes, insectos, plantas y animales superiores, sin hacer referencia a los deterioros causados por la acción del hombre³⁹.

Podemos dividir el tipo de biodeterioro, según los daños que este cause, en físico o mecánico, químico y estético.

Biodeterioro físico o mecánico

Este tipo de deterioro se da cuando un organismo genera algún tipo de alteración o deformación en el material debido a su crecimiento o movimiento⁴⁰. Este proceso conlleva la pérdida de cohesión de los sustratos debido a la fuerza que ejercen los organismos o sus partes, como las hifas fúngicas o las raíces de plantas⁴¹.

Por lo general, el daño físico que puede producir un microorganismo siempre será de mayor levedad que el que pueda producir un organismo por su mayor tamaño. Estas alteraciones a nivel microscópico se generan por la adhesión de estas especies al sustrato, los hongos por ejemplo, se fijan directamente con las hifas, los líquenes, musgos y plantas, en contraste, poseen diferentes mecanismos de ataque⁴². La capacidad de adhesión de los organismos al sustrato definirá, evidentemente, la extensión y gravedad del deterioro que puedan originar.

Biodeterioro Químico

Esta categoría incluye todos los procesos de descomposición o transformación que llevan a cabo los organismos mediante procesos de asimilación o excreción.

Biodeterioro químico asimilatorio

Son los procesos en los que el organismo utiliza el material como fuente nutritiva. Extraen carbón o energía, que se liberan gracias a la acción enzimática.

Biodeterioro químico desasimilatorio

En este caso, los materiales sufren alteraciones de tipo químico como resultado de la excreción de los productos metabólicos de desecho que generan algunos organismos⁴³.

Compuestos ácidos, durante los procesos metabólicos, algunos organismos son capaces de generar gran cantidad de ácidos, que además de los daños que generen sobre la superficie también pueden actuar como agentes quelantes. La producción de ácidos puede cambiar las

38 ALLSOPP, D., SEAL, K. y GAYLARDE, C. (2008) Introducción al biodeterioro. p.1

39 VALGAÑÓN, V. Op. Cit., p.120

40 ALLSOPP, D., SEAL, K. y GAYLARDE, C. Op. Cit., p.3

41 CANEVA, G., NUGARI, M.P. Y SALVADORI, S. Op. Cit., p.46

42 ALLSOPP, D., SEAL, K. y GAYLARDE, C. Op. Cit., p.5

43 Ibid, p.3

condiciones ambientales y favorecer la aparición de especies acidófilas⁴⁴.

Compuestos básicos, del mismo modo que con los ácidos, durante los procesos metabólicos también se pueden liberar compuestos alcalinos: amoníaco y carbonato de sodio. Al igual que en el caso anterior, la liberación de sustancias básicas puede cambiar la microflora y favorecer el crecimiento de especies basófilas⁴⁵.

Compuestos quelantes, los microorganismos producen muchos compuestos, como ácidos orgánicos simples y fenoles, que podrán actuar como agentes quelantes de los iones metálicos del sustrato⁴⁶.

Degradación enzimática, las enzimas son moléculas proteicas. Se distinguen dos tipos endoenzimas y exoenzimas. Las endoenzimas se producirán en el interior de la célula y las exoenzimas que se liberarán hacia el sustrato. Una vez en él, realizarán cambios químicos en los nutrientes para permitir que las células puedan asimilarlos, transformando las moléculas complejas (rompiendo sus enlaces macromoleculares) en otras simples hidrosolubles⁴⁷.

Emisión de pigmentos, gran cantidad de bacterias, algas y hongos producen en su desarrollo diferentes pigmentos, que podrán ser solubles o insolubles, cuya composición química dependerá de la especie que lo emita y la composición química del sustrato en el que se desarrolle. Están divididos en endopigmentos y exopigmentos. Los primeros, se encuentran en el interior de la célula y solo saldrán al exterior cuando se rompa la membrana celular, este proceso se conoce como lisis. Los exopigmentos son difundidos por la célula y expandidos por el sustrato. La familia de las *Dematiaceae*, conocidas también como hongos negros, producirá una característica pigmentación oscura procedente de la melanina que se genera en las hifas fúngicas. Algunas bacterias como las *Pseudomonas* también podrán producir melanina⁴⁸.

Biodeterioro estético

Entendemos como definición de deterioro estético a todas aquellas alteraciones que modifiquen el aspecto externo normal y habitual de la obra. Destacamos brevemente que enunciar y determinar deterioros estéticos puede ser un concepto cambiante en función de la persona, época o situación en la que se encuentre la obra.

Sin embargo, hoy en día estas películas de microorganismos, conocidas como biopelículas, reflejan la acumulación superficial de compuestos orgánicos derivados de la actividad biológica⁴⁹.

Además del deterioro estético producido, este tipo de manchas o películas biológicas pueden estar señalando un deterioro físico o químico, que más allá de modificar la superficie estética, pueden estar generando procesos de deterioro irreversibles. Adicionalmente una colonización biológica, que a priori no sea muy nociva, puede favorecer el ataque de otras especies más agresivas.

44 CANEVA, G., NUGARI, M.P. Y SALVADORI, S. Op.Cit., p. 49

45 Íbid p.51

46 Íbid p.50

47 Íbid p.75

48 Íbid p.54

49 ALLSOPP, D., SEAL, K. Y GAYLARDE, C. Op.Cit, p.4

3.1. BIODETERIORO DE MATERIAL INORGÁNICO

El material inorgánico es colonizado predominantemente por organismos autótrofos. Sin embargo, no se debe descartar la presencia de organismos heterótrofos, ya que, los sustratos inorgánicos pueden contener abundante materia orgánica en función de su condición. Si el objeto está expuesto al aire, un gran número de sustancias orgánicas podrán llegar a él, incluso los propios agentes causantes del biodeterioro. Además, la deposición de excrementos o el alto contenido de partículas agrícolas, como fertilizantes, pueden favorecer la aparición de organismos heterótrofos⁵⁰.

La colonización microbiana estará determinada también por diferentes factores, como la composición mineral del material, la estructura interna, la porosidad y permeabilidad ⁵¹. A esto, debemos añadir la gran cantidad de productos usados para la restauración que en muchos casos pueden ser una fuente de nutrición para estos organismos.

Las condiciones medioambientales serán decisivas para la colonización de la pintura mural, sus morteros y estructuras. La reproducción celular solo ocurrirá cuando estas condiciones sean apropiadas⁵².

Bacterias en material inorgánico

Las bacterias sobre este material suelen causar daños como costras negras, pulverulencias o exfoliaciones. Las bacterias sulfooxidantes, podrán actuar utilizando compuestos del azufre que producirán iones sulfato (SO_4^{2-}), que en contacto con los iones calcio (Ca^{2+}) darán paso a la formación biológica del yeso. Las bacterias nitrificantes sobre piedra calcárea generarán nitrato de calcio como producto de degradación, procedente de la transformación de ácido nitroso en ácido nítrico. Además podrán producir cambios de color en pigmentos a base de plomo ennegreciéndolos, debido a la reacción del ácido sulfhídrico, producido por las bacterias, con este tipo de pigmentos.

Los actinomicetos sobre frescos o piedra deteriorada, en condiciones de elevada humedad y contacto con la tierra, forman pátinas blanquecinas o blanco grisáceas que a menudo se confunden con eflorescencias salinas⁵³.

Hongos en material inorgánico

Los hongos aparecen sobre este tipo de material en condiciones de humedad relativa y temperatura elevadas. Además de los deterioros ya citados, como la producción de manchas negras producidas por la familia de las *Dematiaceae*, como la *Alternaria spp.* y la pérdida de cohesión de los sustratos y los desprendimientos por la penetración de los micelios, los hongos producen una gran cantidad de ácidos orgánicos.

Especies como *Aspergillus niger* o *Penicillium spp.* producen abundantes cantidades de ácido oxálico y ácido cítrico, estos corroerán los minerales, en especial sobre el mármol y la calcita, formando oxalatos de calcio.

50 CANEVA, G., NUGARI, M.P. Y SALVADORI, S. Op.Cit, p.115

51 PALLA, F. Y BARRESI, G. Op.Cit, p.9

52 GOMOIO, I. et al. (2018). "Microbial Ability to Colonize Mural Painting and Its Substrate" en Acta PHYSICA Polonia.

53 CANEVA, G., NUGARI, M.P. Y SALVADORI, S. Op.Cit, pp.116-122

4. MÉTODOS DE CONTROL

Como se comentaba anteriormente, el mejor método para la erradicación y prevención de crecimientos biológicos es eliminar los factores que favorecen la proliferación de estos. No obstante, no en todos los casos esto resulta viable, por un lado, por los elevados costes, y por otro, por la dificultad de adecuar cierto tipo de inmuebles, como edificios históricos.

Podemos clasificar los diferentes métodos de erradicación biológica en mecánicos, físicos, químicos, biológicos y bioquímicos.

Antes de emplear cualquiera de ellos, se debe llevar a cabo un estudio previo y determinar si existe una necesidad de erradicación. No debemos olvidar, que existen microorganismos incapaces de convivir, por lo que, en algunos casos la erradicación de uno de ellos podrá dar paso a la proliferación de otros, que en alguna ocasión, podrán ser más dañinos que los anteriores. Además, muchos de los tratamientos empleados podrán alterar la superficie infectada. En cualquier caso, antes de realizar cualquier procedimiento se deberá establecer a la necesidad de realizar intervenciones previas y planificar un control a largo plazo, ya sea por métodos preventivos o intervenciones de mantenimiento.

Métodos mecánicos

Estos métodos abarcan la eliminación de crecimientos biológicos mediante instrumentales manuales, bisturíes, cepillos, espátulas, etc. Presentan la ventaja de ser un tratamiento simple bajo manos expertas, además, de no añadir ninguna sustancia que pueda afectar al sustrato sobre el que se trabaja. No obstante, generalmente poseen la desventaja de no ser tratamientos con resultados a largo plazo, ya que, resulta muy difícil eliminar las estructuras micelares sin dañar la superficie o la estructura del objeto⁵⁴. Del mismo modo, al eliminar ciertos tipos de costras biológicas pueden romperse estructuras que tienen pigmentos en su interior, dejando manchas de difícil o nula eliminación⁵⁵.

Este tipo de procesos resultan ser de gran utilidad en combinación con otros tratamientos como los químicos. Además, siempre se debe trabajar con aspiración para evitar la movilización esporas a otros lugares sustrato u otros objetos.

Métodos físicos

Consisten en el uso de radiaciones electromagnéticas y eléctricas, que tengan un efecto biocida o nocivas para los organismos a eliminar, mediante la desnaturalización de las moléculas constituyentes de los organismos rompiendo sus enlaces químicos. También pueden aportar más temperatura o presión a los estratos haciendo que las condiciones del sustrato no sean favorables para su supervivencia. Se emplean radiaciones como los rayos X⁵⁶, rayos gamma (g), rayos UV-C. La radiación ultravioleta muestra actividad germicida entre los 300 y 200nm y su efecto será más elevado cuando los valores de HR sean bajos, por otro lado, su poder de penetración es bajo por lo que no será eficaz sobre objetos dañados en sus estratos más internos. La radiación g, tiene una mayor frecuencia que la UV, y por lo tanto, un mayor poder biocida, esta radiación tendrá mayor poder de penetración⁵⁷.

En alguna ocasión el uso de ultrasonidos también puede tener un efecto biocida sobre objetos

54 CANEVA, G., NUGARI, M.P. Y SALVADORI, S. Op.Cit., p.170

55 VALGAÑÓN,V. (2008)Op.Cit., p.219

56 PALLA, F. Y BARRESI,G.Op.Cit., p.22

57 CANEVA, G., NUGARI, M.P. Y SALVADORI, S.Op.Cit., pp.171-173

arqueológicos, madera mojada y tejidos modernos⁵⁸.

Métodos químicos

Son los tratamientos más empleados, radican en el uso de sustancias químicas sobre el objeto que eliminan los crecimientos biológicos causantes del biodeterioro. Cualquier sustancia química capaz de matar un organismo se conoce como biocida, dentro de estos existen algunas especializaciones según la especie a la que ataquen: bactericidas, fungicidas, alguicidas, insecticidas o herbicidas⁵⁹.

Algunos de los principales compuestos químicos empleados como biocidas se pueden clasificar de la siguiente manera⁶⁰:

Compuestos inorgánicos

Peróxido de hidrógeno, ejerce su acción biocida por contacto, aunque, su acción no permanece durante mucho tiempo, su uso puede provocar blanqueos en los materiales por su capacidad oxidante.

Hipoclorito de sodio, se ha usado también para eliminación de patinas liquénicas y algas sobre piedra. No se debe olvidar que todos los compuestos a base de cloro son muy corrosivos y en ocasiones puede alterar el material sobre el que se aplique.

Amoniaco, la acción que ejerce sobre los crecimientos biológicos se debe más a su alcalinidad que a un efecto biocida. Se debe emplear en bajas concentraciones y con mucha precaución, ya que, puede generar efectos negativos en el sustrato.

Compuestos orgánicos

Alcoholes alifáticos, como etanol e isopropanol, son usados ampliamente como desinfectantes por su rapidez en la destrucción de bacterias y virus, no obstante, no pueden usarse como biocidas dada su alta tasa de evaporación.

Compuestos organometálicos

Son difícilmente biodegradables, y algunos, como los compuestos de mercurio están obsoletos dada su alta toxicidad, aunque, han sido empleados para tratamientos en madera y pinturas.

Los *compuestos de estaño*, tienen una alta capacidad biocida, alguicida y fungicida, se han usado positivamente para el tratamiento e costras liquénicas sobre piedra.

Compuestos de amonio cuaternario

Se necesitan en muy poca concentración de producto, además de ser incoloros e inodoros tienen propiedad detergente. Sin embargo, no son activos a largo plazo y no matan esporas, además, son incompatibles con tensoactivos aniónicos y su poder biocida se reduce en presencia de material orgánico, nitratos, calcio y magnesio.

Compuestos fenólicos y derivados

Los compuestos fenólicos fueron los primeros desinfectantes eficaces. El fenol en sí mismo está desaconsejado por su elevada toxicidad, sin embargo, otros compuestos de este redu-

58 CANEVA, G., NUGARI, M.P. Y SALVADORI, S.Op.Cit,p.174

59 VALGAÑÓN,V. (2008). Biología aplicada a la conservación y restauración, p.220

60 CANEVA, G., NUGARI, M.P. Y SALVADORI, S. Op.Cit.; ALLSOPP, D., SEAL,K. y GAYLARDE,C. Op.Cit.,

cen sus niveles tóxicos al mínimo. Tienen buena capacidad biocida contra bacterias, algas y hongos.

Métodos biológicos

Consiste en el uso de especies antagónicas o parasitas para los crecimientos biológicos.⁶¹ Las especies que necesiten las mismas condiciones ecológicas para vivir, no podrán hacerlo juntas y después de un periodo de convivencia, a menos que una de las especies consiga su propio espacio, una de las comunidades acabará siendo eliminada. Se debe tener en cuenta que la especie utilizada para la eliminación de la causante del biodeterioro no debe ser nociva para la estabilidad del objeto. Una de las especies más empleadas para estos fines, son el género de bacterias *Bacillus spp.*, que ha demostrado tener buenas propiedades antifúngicas contra algunas especies de hongos como *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.*⁶².

Además, también se han utilizado las enzimas como catalizadores de las reacciones bioquímicas que se producen en la célula, aunque, su uso está más enfocado a sistemas de limpieza que a su acción biocida.

61 CANEVA, G., NUGARI, M.P. Y SALVADORI, S. Op.Cit., p.267

62 Íbid p.174

5. NUEVAS ALTERNATIVAS PARA LA ERRADICACIÓN BIOLÓGICA

En los últimos años se han llevado a cabo numerosas investigaciones para el desarrollo de nuevas alternativas al uso de los biocidas convencionales.

Algunos estudios se han centrado en el uso de estos biocidas de manera segura y controlada. Por ejemplo, mediante el empleo de geles de sílice mesoporoso, de estructuras nanométricas, capaces de retener estas sustancias durante mayor tiempo y llevar a cabo una liberación más controlada del producto. De este modo, se aumentan los tiempos de contacto con el sustrato, reduciendo el número de aplicaciones del biocida, aminorando costes, y disminuyendo el impacto de sustancias tóxicas en el ambiente⁶³.

Por otro lado, se han realizado varios ensayos sobre el uso de moléculas sintéticas, como las nanopartículas metálicas, y moléculas naturales⁶⁴.

El empleo de las propiedades antibióticas de nanopartículas metálicas (NPs) de plata, titanio, zinc, cobre, etc., ha sido comprobado dentro de los campos de la medicina y la farmacología positivamente, posteriormente su uso se ha adaptado al mundo de la conservación y restauración⁶⁵. Se ha confirmado el poder antifúngico de este tipo de componentes en diferentes objetos culturales (materiales arqueológicos, pinturas murales, monumentos de naturaleza calcárea, etc) reduciendo notablemente crecimientos fúngicos de especies de *Aspergillus* y *Penicillium* entre otros. Su uso se ha desarrollado en algunos casos mediante el uso de protecciones convencionales, como Paraloid B44, adicionado con nanopartículas metálicas de Zinc, Magnesio y Plata, obteniendo resultado muy óptimos⁶⁶.

Dentro del uso de este tipo de componentes, en 2015 se llevó a cabo la primera investigación para la producción de nanopartículas de manera segura para el medio ambiente, mediante la extracción de nanopartículas metálicas de extractos acuosos vegetales, como las hojas de hinojo, demostrando muy buenas capacidades antifúngicas⁶⁷.

Por otro lado, numerosos estudios se han centrado en el uso de productos naturales. Las plantas, producen naturalmente unas pequeñas moléculas llamadas péptidos antimicrobianos, que se forman en los tejidos de sus células. Estos péptidos están considerados como antibióticos naturales, producidos por plantas y animales como método de defensa. Por ello, varias investigaciones se han centrado en las propiedades antibacterianas y antifúngicas de los extractos vegetales como los aceites esenciales⁶⁸.

63 DRESLER, C. et al. (2017) "Development of controlled release systems of biocides for the conservation of cultural heritage" en International Biodeterioration & Biodegradation.

64 PALLA, F. Y BARRESI, G. Op.Cit., p.53

65 PALLA, F. Y BARRESI, G. Op.Cit., p.53

66 ESSA, A.M.M., KHALLAF, M.K. (2014) *Biological nanosilver particles for the protection of archaeological stones against microbial colonization*. En International Biodeterioration and Biodegradation ; SCARPA, I. et al. MICRO AND NANOMATERIALS FOR THE BIO-CLEANSING OF BIOLOGICAL PATINAS : PROBLEMS ROSA-GARC, GO, Synthesis , Photocatalytic , and Antifungal Properties of MgO , ZnO and Zn / Mg Oxide Nanoparticles for the Protection of Calcareous Stone Heritage.

67 CARRILLO-GONZÁLEZ et al., Inhibition of microorganisms involved in deterioration of an archaeological site by silver nanoparticles produced by a green synthesis method

68 BRODGEN, KA (2005) *Antimicrobial peptides:pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?* en Nature revisión microbiológica

5.1. ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales han sido usados de manera satisfactoria a lo largo de la historia en la medicina tradicional, en las últimas décadas se han comenzado a realizar numerosos estudios científicos acerca de las propiedades antimicrobianas de estas sustancias.

La Organización Internacional de Estandarización, define aceite esencial como producto obtenido mediante destilación al agua o al vapor, mediante procesado mecánico o por destilación seca natural de los materiales.” Se obtienen de diferentes partes de las plantas (tallos, hojas...) y mediante diferentes procesos, por pulverización, destilación, fermentación o mediante el uso de disolventes orgánicos⁶⁹.

Están formados por sustancias volátiles, compuestos orgánicos volátiles (VOCs), por lo que su caracterización química se ha realizado mediante cromatografías (GC y GC/MS), lo que ha permitido obtener información detallada sobre su composición. Según las propiedades de cada aceite la susceptibilidad de los microorganismos variará, además, de depender del tipo de organismo en sí mismo⁷⁰.

En el ámbito de la conservación y restauración se ha comprobado la eficacia de numerosos aceites esenciales como biocidas (Comino negro, Canela, Clavo, Menta, Lavanda, Citronela, Tomillo, Orégano, Ajo, etc) en la mayoría de casos han demostrado tener buenas propiedades antimicrobianas, atribuyendo sus capacidades biocidas a los compuestos activos de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales seleccionados para la presente investigación son Orégano, Tomillo y Clavo, cuyos compuestos activos son el Carvacrol, Timol y Eugenol respectivamente⁷¹. El timol se ha usado ampliamente como biocida en archivos y bibliotecas, sobre todo en forma de vapor, algunos de los resultados obtenidos muestran una elevada actividad antifúngica, aunque, en algunos casos ha producido amarilleamiento debido a la oxidación fotoquímica.

Han demostrado tener buenas capacidades biocidas, comprobando su eficacia sobre aislamientos fúngicos de diferentes objetos culturales además, se han obtenido grandes resultados no solo por su actividad antifúngica, sino también por el comportamiento de estos compuestos frente al fotoenvejecimiento inducido⁷².

Conjuntamente, algunos investigadores han realizado ensayos colorímetros sobre pigmentos seleccionados concluyendo que no se producen cambios notables⁷³. En concreto Sakr, A.A y Ghaly, M.F., estudian las posibles alteraciones del Timol sobre diferentes pigmentos, determinando que no se generan cambios en ninguno de los pigmentos seleccionados⁷⁴.

69 NAZZARO, F. et al. (2019) Essential Oils and Microbial Communication, p.7

70 KALEMBA, D Y KUNICHA, A. (2003) “Antimicrobial and antifungal properties of Essential Oils” en: Current Medicinal Chemistry

71 NAZZARO, F. et al. Op.Cit.,

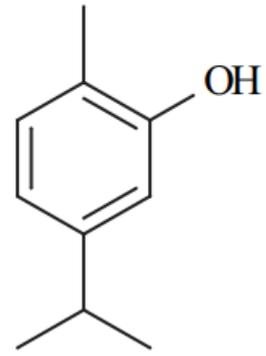
72 VENERANDA et al., Evaluating the exploitability of several essential oils constituents as a novel biological treatment against cultural heritage biocolonization

73 ELSAYED, Y., SHABANA, Y. (2018) The effect of some essential oils on *Aspergillus Niger* and *Alternaria Alternata* infestation in archaeological oil paintings

74 SAKR, A.A., GHALY, M. (2018) Effect of thymol against fungi deteriorating mural paintings at Tell Basta Tombs, Lower Egypt en International Journal of Research studies in Biosciences (IJRSB)



Pl. 254. Origan vulgaire. Origanum vulgare L.
Figura 5 - Origanum Vulgare

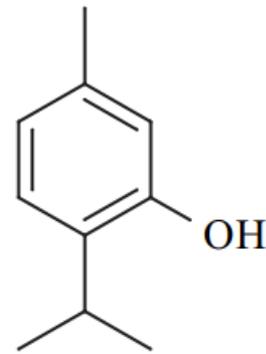


Carvacrol

Figura 6 - Estructura molecular del Carvacrol



Figura 7 - Thymus vulgare

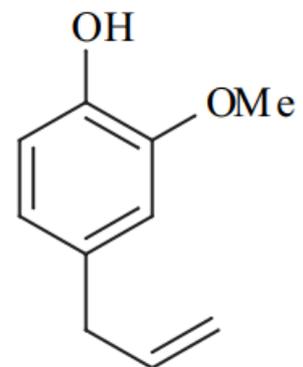


Thymol

Figura 8 - Estructura molecular del Timol



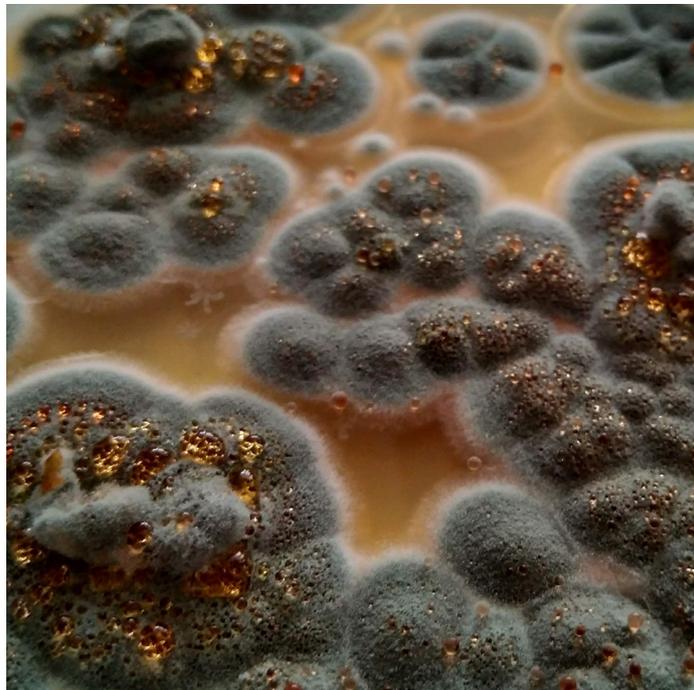
Figura 9 - Clavo



Eugenol

Figura 10 - Estructura molecular del Eugenol

FASE EXPERIMENTAL



6. CONTROL AMBIENTAL

Como se ha comentado anteriormente, las condiciones ambientales representan uno de los factores más importantes para la supervivencia y crecimiento de microorganismos. Tras la obtención de datos en el pasado trabajo final de grado que confirmaban la presencia de hongos y bacterias en las zonas circundantes a las pinturas murales, se realizó un control ambiental, con el fin, de complementar la información obtenida en el registro climático de 2017, poder conocer la situación en la que se encuentran y establecer una relación con la existencia de estos microorganismos.

6.1. REGISTRO CLIMÁTICO

Materiales y métodos

Se instaló un dispositivo de recogida de datos Data Logger LOG32TH en la misma localización de 2017 . El registro de información se realizó entre el 01.04.2018 y 01.11.2018 ⁷⁵

Resultados

La temperatura y humedad relativa media registrada en ambos años señalan valores muy similares. La temperatura máxima obtenida en 2018 no supera los 23°C y la humedad relativa media alcanzada se mantiene aproximadamente sobre el 60%, llegando a alcanzar casi el 70% en valores máximos. Destacamos nuevamente que la temperatura óptima para el crecimiento de hongos oscila entre los 25°C y 35°C para la mayoría de especies, y las condiciones ideales de humedad se establecen entre el 60 % y 70% HR.

En el caso de la temperatura no se llegan a alcanzar los niveles idóneos para el desarrollo de microorganismos, no obstante, no llegan a ser lo suficientemente bajas para impedir la vida de estos. Por otro lado, las condiciones de humedad media obtenidas en el registro muestran unos valores que se acercan mucho a las condiciones óptimas.



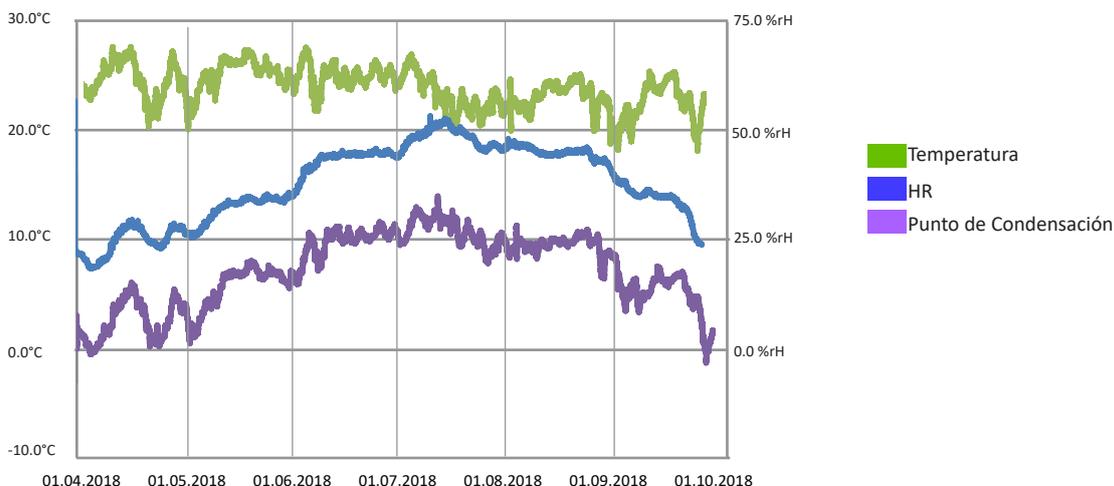
Figura 11 - Lugar de colocación del dispositivo data logger

⁷⁵ Por motivos técnicos no se pudo realizar el registro anual que estaba previsto. En cualquier caso, los datos obtenidos complementan los registros de 2017, ampliando la información obtenida en ese año.

Tabla 1 - Registros máximos, medios y mínimos del datalogger. Años 2017 y 2018

	2017			2018		
	Mín.	Me-dia	Máx.	Mín.	Me-dia	Máx.
Temperatura °C	5.0	11.7	19.7	9.2	17.4	22.9
	Enero		Junio	Mayo		Agosto
Humedad (HR%)	35.2	58.9	69.5	37.5	57.8	68.2
	Abril		Enero	Abril		Junio

Gráfica 1 - Registro data logger de 2018



6.2. HUMEDAD SUPERFICIAL DE LOS MUROS

Materiales y métodos

Se realizó un modesto mapeo de la humedad superficial contenida en los muros empleando el Humidímetro XP200 CTS. Se seleccionaron como zonas de registro franjas de pintura original y revoques calcáreos correspondientes a la intervención realizada en 1980⁷⁶.

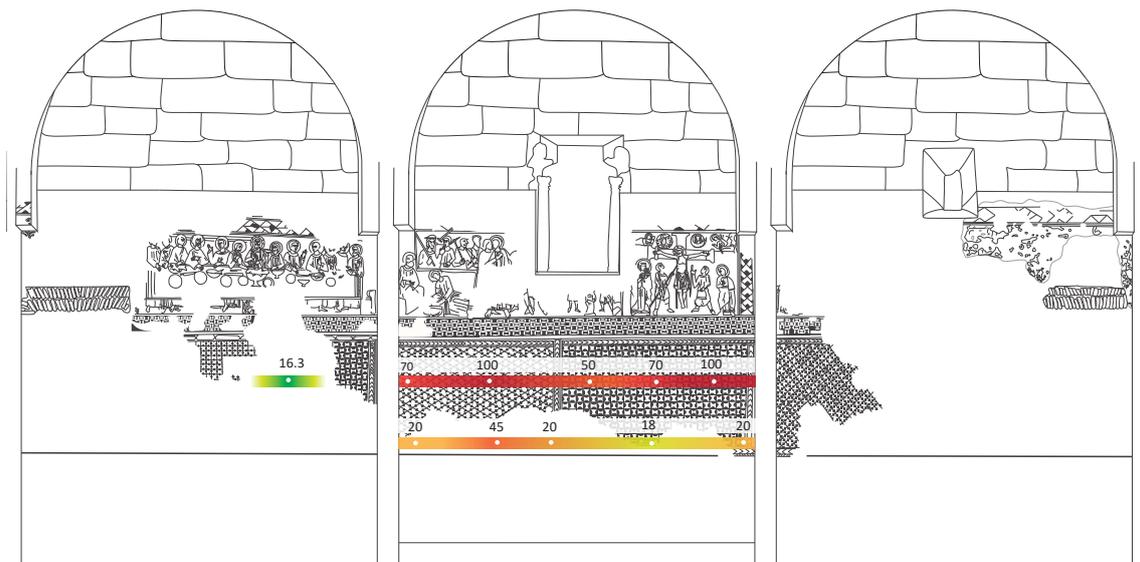
Resultados

Por lo general, la humedad superficial contenida en los muros muestra unos valores considerablemente elevados. Las zonas de pintura original, en comparación a las zonas de revoques, contienen una mayor humedad superficial. Esto se debe a que las zonas de pintura original son mucho más porosas, por lo que, absorben una mayor cantidad de humedad.

Además, estos datos coinciden con los resultados obtenidos en el control del índice de absorción realizado en el año 2017⁷⁷, donde se observaba que las zonas de pintura original absorbían aproximadamente un 200% más que las zonas de repintes.

⁷⁶ RÍO OLIVER, C. del. Op-Cit.p.18

⁷⁷ Íbid p.38



Mapa 1 - Registro de la humedad superficial de los muros 2

6.3. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AIRE

Materiales y métodos

Las mediciones microbiológicas del aire se realizaron mediante un muestreador de aire sobre placas de Agar, con medios SAB y PC, con el equipo PBI Air Sampler SAS Super 100L.

Las muestras se tomaron en 9 puntos diferentes, 3 en el exterior y 6 en el interior del inmueble.

Resultados

En los resultados obtenidos observamos un mayor número de concentración de hongos en el interior del inmueble que en el exterior. De todas las muestras tomadas y posteriormente cultivadas destacamos la presencia de hongos negros, en su mayoría *Cladosporium sp.*, estos son los que se encuentran en mayor cantidad tanto en el interior como en el exterior de la ermita. Además se encontraron hongos del género *Penicillium sp.* y un hongo del género *Mucoral*.

Los resultados para las placas PC no son aceptables debido a que han crecido muchos hongos, por lo tanto, el número de bacterias real queda enmascarado.

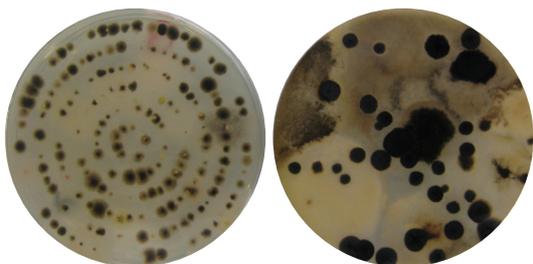


Figura 12 - Placas PC y SAB, muestra número 2 Exterior

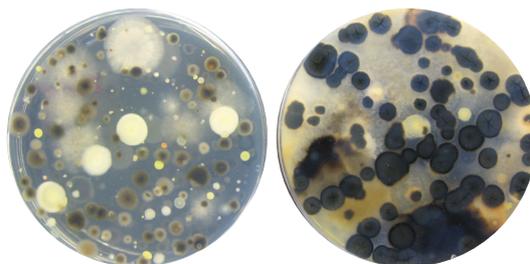
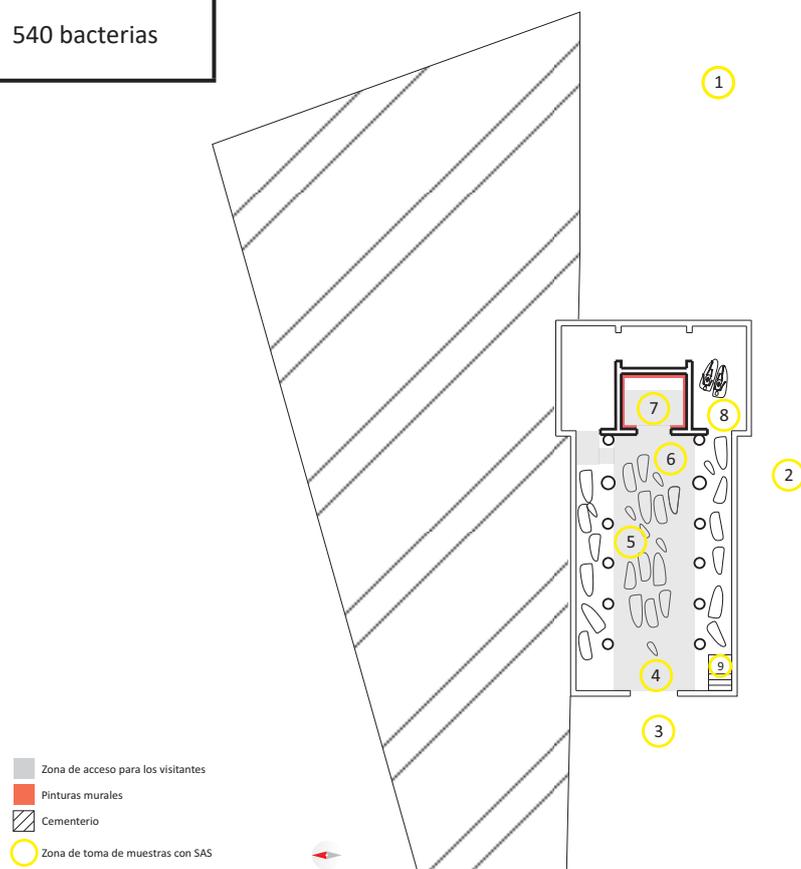


Figura 13 - Placas PC y SAB, muestra número 7 Interior

Tabla 2 - Control de la contaminación microbiológica del aire.

	Zona 100L	Placas SAB Agar	Placas PC Agar
		Hongos (UFC/ m ³)	Bacterias (UFC/m ³)
1	Exterior (<i>aparcamiento</i>)	350	No contable
2	Exterior (<i>banco de piedra</i>)	270 (170 Hongos negros)	No contable
3	Exterior (<i>puerta</i>)	540 (450 Cladosporium)	No contable
4	Interior (<i>puerta</i>)	480 (350 Cladosporium)	(100 Bacterias)
5	Interior (<i>mitad de la nave</i>)	650 (500 Cladosporium)	No contable
6	Interior (<i>altar</i>)	700 (600 Cladosporium)	930 bacterias
7	Interior (<i>Zona pinturas</i>)	450 (390 Cladosporium)	350 bacterias
8	Interior (<i>Sacristías, zona tumbas</i>)	540 (410 Cladosporium)	60 bacterias
9	Interior (<i>segundo piso</i>)	680 (500 Cladosporium)	540 bacterias



Mapa 2 - Mapa de toma de muestras de aire

7. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL CONJUNTO MURAL

7.1. DETECCIÓN DE ATP

El ATP –trifosfato de adenosina es una molécula presente en todas las células, es capaz de proporcionar energía para generar una reacción que produzca luz, este fenómeno se conoce como bioluminiscencia.

Esta reacción se produce por medio de la luciferasa, enzima, que actúa como catalizador de la reacción de la luciferina (proteína) con el oxígeno⁷⁸. En presencia de ATP se producirá luz. A través de esta bioluminiscencia se podrá cuantificar en unidades relativas de luz (URL) si existen células vivas o no, a partir de 1.000 URL se considera positiva. Cuanto mayor sea el URL mayor será el número de ATP, por lo tanto habrá más presencia biológica.

Materiales y métodos

La muestra para analizar se recoge con hisopo y se introduce en un tubo que contiene los reactivos (luciferina-luciferasa) y posteriormente se contabilizan las URL con un luminómetro. Para este ensayo se empleó el Luminómetro Clean-Trace™ 3M®, la prueba se realizó en siete puntos diferentes de las pinturas murales .

Resultados

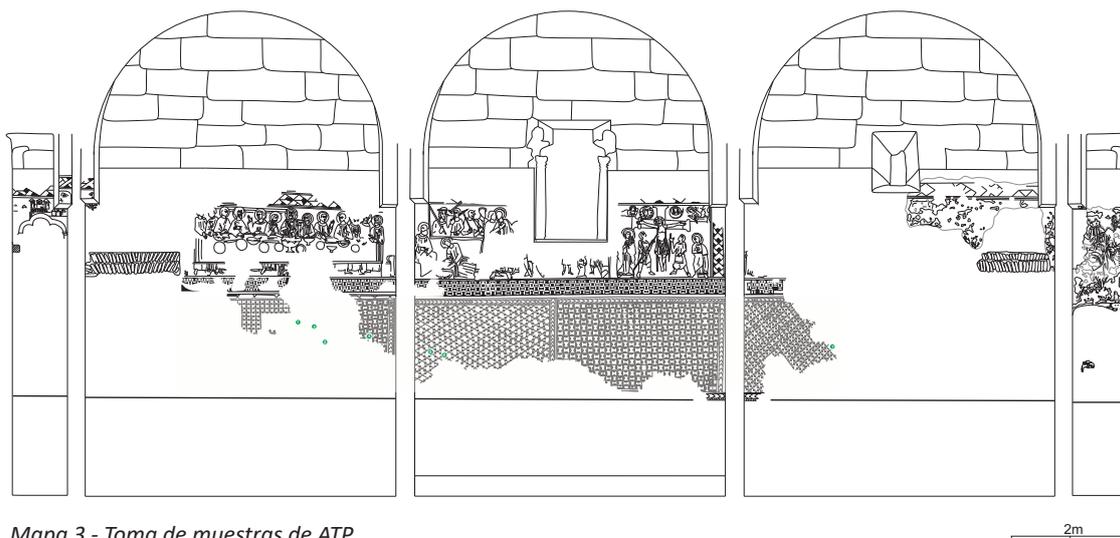
Las muestras número 1, 4 y 5 confirmaron la presencia de células vivas, mientras que en la zona 2 y 3 no se encontraron. Las muestras 4 y 5 indican unos niveles muy elevados de URL, por lo que, la presencia de microorganismos vivos en esas zonas debe ser elevada, además, de incrementar de manera notable los valores de URL respecto a las demás muestras.

Mediante el muestreo realizado, observamos que las muestras tomadas de velo blanquecino sobre pintura original son las zonas con mayor número de células vivas, por lo que, se decidió tomar muestras de estas partículas blancas para un análisis más exhaustivo.

Tabla 3 - Detección de ATP

Muestra	Zona	URL
1	Mancha en revoque calcáreo	27.095 URL
2	Mancha en revoque calcáreo	123 URL
3	Mancha en revoque calcáreo	163 URL
4	Velo blanquecino sobre pintura roja	197.001 URL
5	Velo blanquecino sobre pintura blanca	124.153 URL
6	Reintegración cromática	2.365 URL
7	Mancha en revoque calcáreo	38 URL

78 EED, H.R., et al.(2016) *Bioluminescence-Sensing Assay for Microbial Growth Recognition*

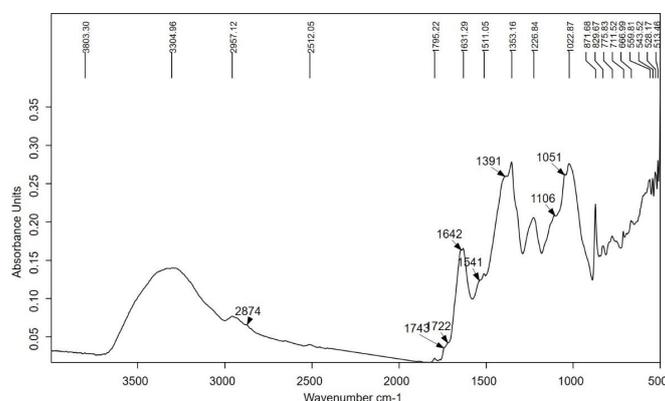


Mapa 3 - Toma de muestras de ATP

7.2. ANÁLISIS DE VELO BLANQUECINO

Materiales y métodos

Se tomaron dos muestras de la sustancia a analizar, mediante Strappo, con celo, y extracción del polvo con bisturí y deposición en un tubo de eppendorf. Se realizó un análisis molecular cualitativo de los compuestos de esta sustancia mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) con el equipo 1HPLW88.



Gráfica 2- Espectro infrarrojo obtenido de la muestra de polvo blanquecino

Resultados

En el espectro obtenido se identificaron⁷⁹ bandas características de **nitratos** (nitrato de magnesio $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, nitrato cálcico $(Ca(NO_3)_2)$ y no se descarta también de potasio (KNO_3) (bandas a 1642, 1391, 1353, 829, 666 cm^{-1}), calcita $(CaCO_3)$ (bandas a 1391, 871 y 711 cm^{-1}), óxidos de hierro asociados a pigmentos de tipo tierra (bandas a 600-500 cm^{-1}), así como materia orgánica relativa a una **resina sintética de naturaleza vinílica**, tipo PVA (bandas a 2957, 2874, 1722, 1228, 1118 y 1023 cm^{-1}). Destacar la presencia significativa de **oxalatos de calcio y carboxilatos de calcio** relativos a productos de degradación de materia orgánica (1631, 1541, 1320, 775 cm^{-1}).

⁷⁹ El análisis por espectroscopia FTIR y la interpretación del espectro obtenido se realizó en el Instituto de Restauración del Patrimonio (IRP) de la Universidad Politécnica de València por la Doctora Laura Osete Cortina

La presencia de nitratos además de poder responder a la migración de sales presentes en el sustrato, que podrían estar presentes debido a la degradación de la materia orgánica por la proximidad con un cementerio⁸⁰ que llegan al muro por medio de la ascensión capilar del agua. Podría deberse a la presencia de bacterias nitrificantes, que generan nitrato cálcico como producto de degradación. En cuanto a los oxalatos de calcio, además de su producción por la degradación de la materia podrían tener su origen en los productos de corrosión que forman hongos como el *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. sobre materiales de naturaleza cálcica.

Por último, señalar que la presencia de PVA corresponde a una de las dos intervenciones realizadas sobre el conjunto mural, en la que fue aplicado a modo de protección⁸¹.



Figura 14 - Zócalo del conjunto mural con velo blanquecino



Figura 15 - Detalle en perspectiva del velo blanquecino

80 DOMÉNECH CARBÓ, M.T. y YUSÁ MARCO, D.J., *Aspectos físico-químicos de la pintura mural y su limpieza* p.41

81 La información correspondiente a estas intervenciones figura en el trabajo final de grado realizado por la autora de esta investigación, *Estudio del Estado de Conserv*

7.3. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN DE HONGOS Y DENOMINACIÓN DE BACTERIAS

Se realizó un muestreo en la superficie mural sobre zonas previamente seleccionadas, empleando como puntos de control los lugares de muestreo escogidos en la pasada investigación de grado (A^1, B^1, C^1, D^1 para Hongos y a^1, b^1, c^1, d^1 para Bacterias), y ampliando el rango a las zonas con pintura (E, F, G, H, I, J para Hongos y e, f, g, h, i, j , para Bacterias) (Mapa 4).



Figura 16 - Toma de muestras mediante hisopo en la zona de manchas de origen biológico



Figura 17 - Detalle de manchas en los revoques calcáreos

Materiales y métodos

El proceso de aislamiento se llevó a cabo mediante métodos de contacto con placas Rodac, con medio de cultivo Plate Count Agar (PCA) Scharlau para el aislamiento de bacterias y medio Sabouraud Dextrose Agar (SAB) (Scharlau) para Hongos. Los medios se prepararon según las indicaciones del fabricante⁸².

También se recogieron cuatro muestras mediante hisopo posteriormente descargado y cultivado en placas Petri con medio PC.

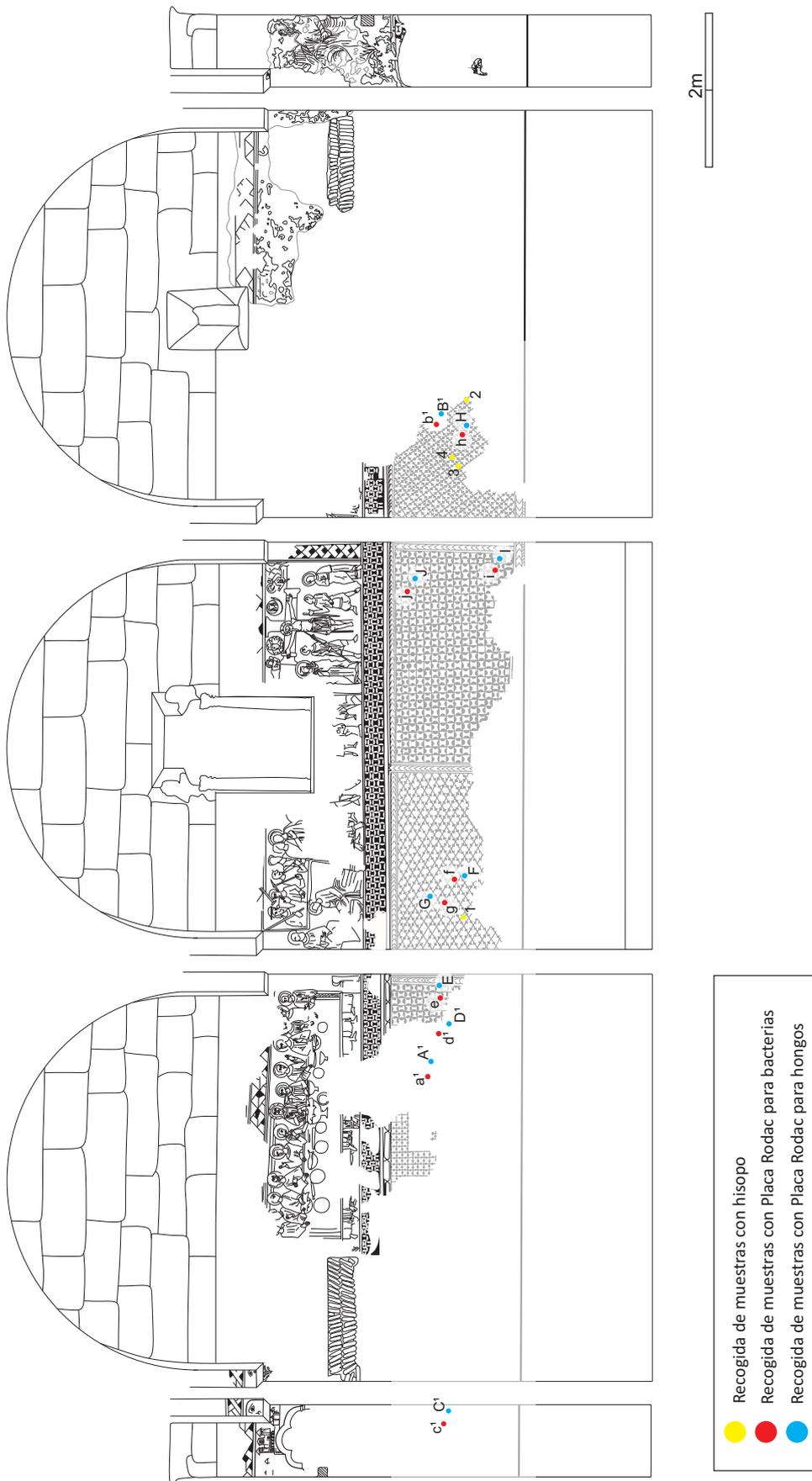
El procedimiento consiste en la aplicación del medio de cultivo directamente sobre la superficie a muestrear, de este modo, los microorganismos quedarán adheridos al medio. Todas las placas se incubaron en estufas termostataadas a 28°C durante 4 días.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizó un estudio de propiedades macroscópicas sobre los crecimientos obtenidos en placas Rodac y posteriormente se aislaron las colonias de bacterias y hongos para su identificación morfológica por separado. Estos aislamientos se realizan mediante picadura con asa estéril sobre placas Petri con medios de cultivo PCA y SAB, la identificación se realizó mediante microscopía óptica (MO), microscopio Olympus BX41 (objetivos 4x, 10x y 40x; a 40, 100 y 400 aumentos respectivamente).

Identificación de Hongos mediante MO

Para la observación de hongos en el microscopio se realiza una preparación con Agua esterilizada y Tween 80 en la que se dispersaran las esporas del hongo a identificar. La adición de un tensioactivo a la preparación es necesaria ya que las esporas son muy hidrófobas, de este modo facilitamos su dispersión en el medio para facilitar su observación e identificación al microscopio. También se realizaron preparaciones con azul de algodón lactofenol, añadiendo una gota de este al agua con tween.

⁸² Ver Anexo p.105 para ver los datos técnicos de las preparaciones de los medio de cultivo según el fabricante.



Situación del muestreo realizado sobre las pinturas, dónde A¹, a¹; B¹, b¹; C¹, c¹; D¹, d¹ (realizadas con placas Rodac para bacterias y hongos) han sido efectuadas como control biológico en los mismos lugares que el pasado 13 de Junio de 2017.

E, e ; F¹, j¹ han sido tomadas sobre zonas de pintura original y H, h ; I, i ; G, g sobre zonas con repintes procedentes de las restauraciones.

Mapa 4 - Toma de muestras para el aislamiento de hongos y bacterias



Figura 18 - picadura con asa estéril para preparación de portaobjeto para estudio en microscopio óptico



Figura 19 - Placas Petri con preparaciones de azul de algodón lactofenol en portaobjetos.

Estudio de Bacterias mediante MO. Tinción Gram.

La tinción Gram es la técnica empleada en microbiología para la diferenciación y estudio de bacterias por microscopía, según el tipo de tinción las bacterias serán Gram positivas (+) o Gram negativas (-).

El proceso consiste en adherir las bacterias a un portaobjetos con una pequeña cantidad de agua, una vez seco se fijan al portaobjetos mediante calor, cuando la preparación está fría se aplica Violeta de Genciana como colorante por goteo. Después de 1 minuto se elimina con lugol, y se deja un minuto actuando, posteriormente se lava con agua y se decolora con alcohol de 96° durante 30", se lava con agua y se añade Fuchsin básica por goteo. El portaobjetos se vuelve a aclarar con agua y se lleva la muestra al microscopio.

Las bacterias que son Gram – se decoloran con el alcohol, y quedarán teñidas de fuchsin básica, mientras que las Gram + no se decoloraran con el alcohol y quedarán teñidas de Violeta de genciana.

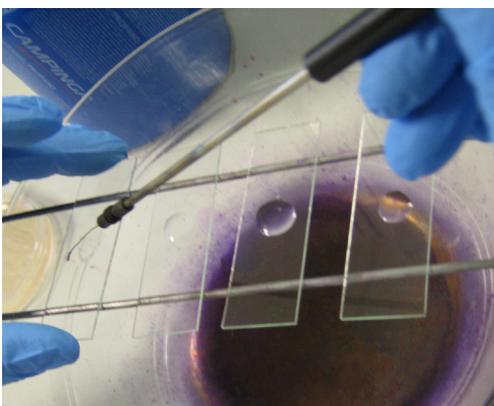


Figura 20 - preparación portaobjetos para determinación de bacterias en microscopio óptico



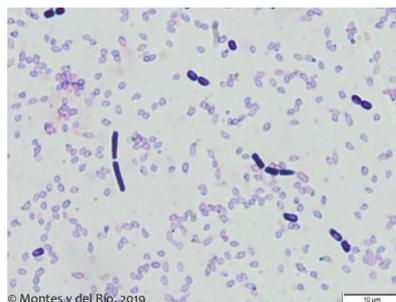
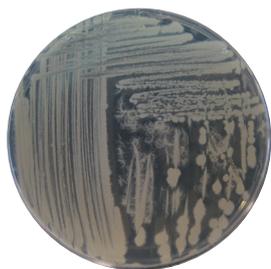
Figura 21 - Lugol, Violeta de genciana y Fuchsin básica

Resultados

Los resultados obtenidos del aislamiento de hongos y bacterias de las pinturas confirman la presencia de microorganismos sobre el conjunto mural. De las muestras realizadas para el aislamiento de bacterias se observan crecimientos en todas las placas, mientras que en las placas para el aislamiento de hongos se observan crecimientos en todas las placas menos en la placa B y C⁸³. De los hongos aislados de las placas de muestreo se identificaron mediante microscopio óptica 6 géneros diferentes, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Alternaria sp.* y *Absidia sp.*

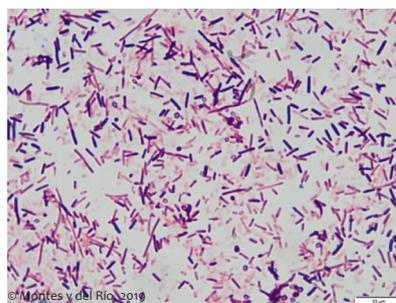
De los identificados dos de ellos, *Cladosporium* y *Alternaria*, pertenecen al grupo de los hongos negros.

De las bacterias aisladas todas fueron determinadas mediante microscopía como bacilos Gram + esporulados (a,c,d,e,f,g,h,i,j) menos una, Gram – (placa b). De las muestras extraídas mediante hisopo, la 2 y 3 fueron identificadas como cocos.



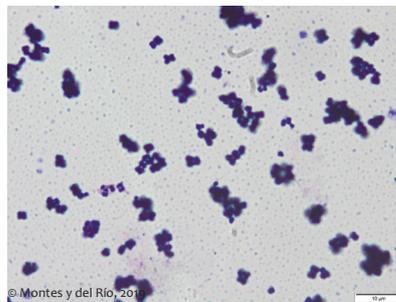
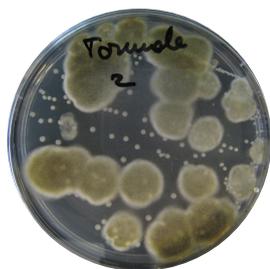
© Montes y del Río, 2019

Figura 22 - Muestra a, bacilo esporulado Gram +



© Montes y del Río, 2019

Figura 23 - Muestra b, Gram -



© Montes y del Río, 2019

Figura 24 - Muestra torunda (hisopo) 2, Cocos.

⁸³ Ver Anexo pp. 68- 84 para ver en detalle todas zonas de muestreo realizadas sobre las pinturas y los aislamientos de hongos y bacterias de cada muestra.

A.Niger



Figura 25 - Aspergillus niger en placa y visto en microscopio óptico

Penicillium



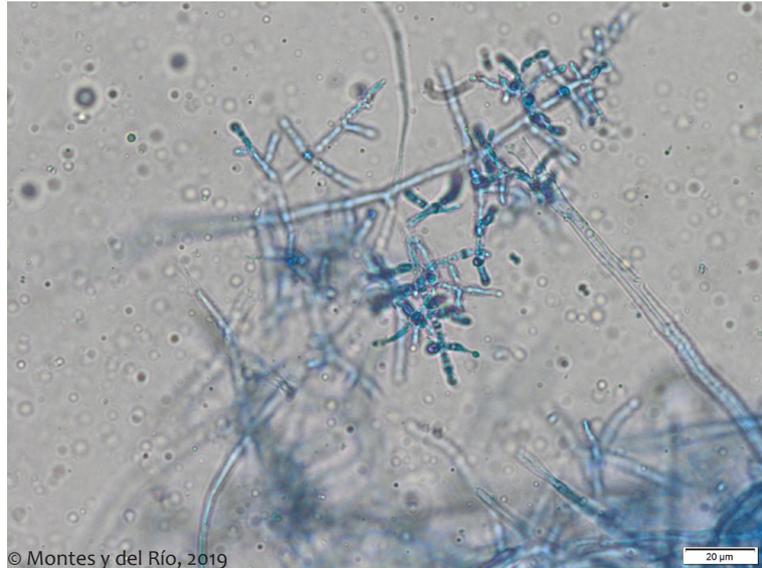
Figura 26 - Penicillium sp. en placa y visto en microscopio óptico

Cladosporium



Figura 27 - Cladosporium sp. en placa y visto en microscopio óptico

Trichoderma



© Montes y del Río, 2019

Figura 28 - Trichoderma sp. en placa y visto en microscopio óptico

Alternaria

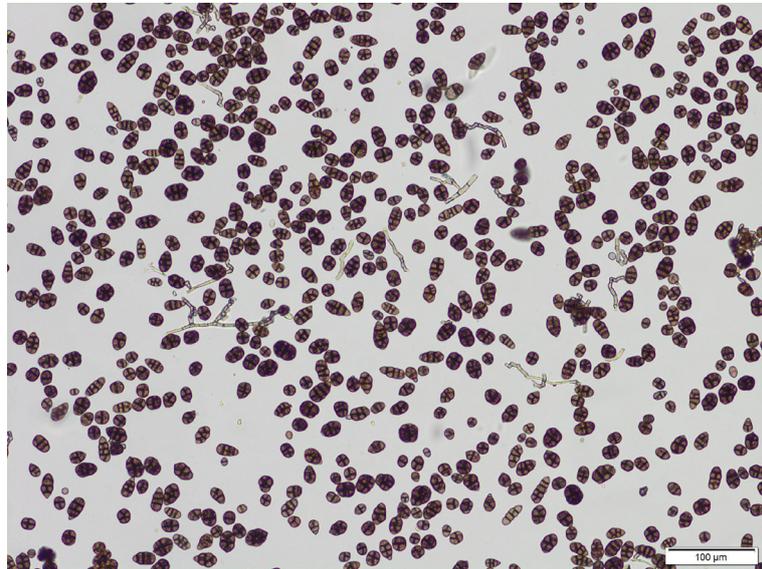
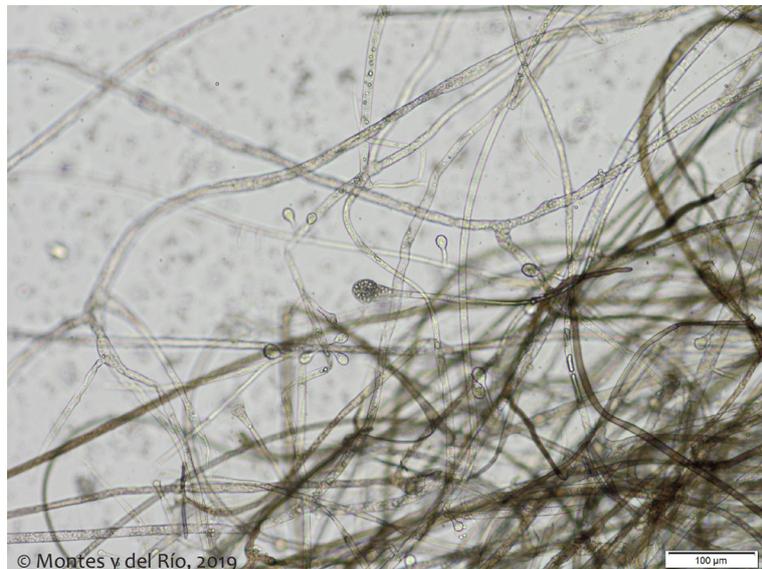


Figura 29 - Alternaria sp. en placa y visto en microscopio óptico

Absidia



© Montes y del Río, 2019

Figura 30 - Absidia sp. en placa y visto en microscopio óptico

8. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE ACEITES ESENCIALES (AEs)

Tras el aislamiento y la identificación de las colonias de hongos se realizó un ensayo para comprobar la efectividad de los aceites esenciales, comprobando la capacidad de inhibición del crecimiento de los 6 hongos identificados, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Alternaria sp.* y *Absidia sp.*

Materiales y métodos

Los tres aceites esenciales empleados para este estudio, Orégano, Tomillo y Clavo, se adquirieron en *ESSENCIALES mart, SL*⁸⁴.

El ensayo se realizó sobre 30 placas Petri con medio de cultivo (SAB), sobre la placa se aplicó mediante asa estéril una solución fúngica de esporas, del hongo seleccionado, mezcladas en agua esterilizada y Tween 80, sobre cada placa se aplicaron 10 μL de la solución.

Para cada uno de los 6 Hongos se utilizó una placa con cada uno los tres aceites esenciales a diferentes concentraciones 1 μL , 5 μL , 10 μL y 20 μL , siguiendo los protocolos de la bibliografía estudiada, se empleó como control positivo a las mismas concentraciones Cloruro de Benzalconio (neo[®]Desogen). Además de una placa por hongo para el control negativo sin ninguno de los tres biocidas para comprobar que los hongos sí crecían en esas condiciones y sobre ese medio.

El aceite se aplicó sobre los medios de dos maneras diferentes, aplicando el aceite con pipeta sobre discos de papel estériles o realizando un agujero con sacabocados estéril en la superficie de agar y depositando el aceite en el interior. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Las placas se incubaron a 28°C en estufas termostataadas y realizaron controles a las 48h, 72h, 5 días y 12 días.

La efectividad de los biocidas se comprobó mediante el análisis cualitativo de los crecimientos en las placas y mediante la medida de los diámetros de inhibición del crecimiento, estos se midieron realizando la media de dos diagonales.

Resultados

Los tres aceites esenciales mostraron buenas capacidades antifúngicas⁸⁵, en función del hongo utilizado los resultados varían en gran medida. A las 24 horas se comenzaron a observar crecimientos en casi todas las placas tratadas con AE de Clavo y cloruro de benzalconio, menos en las que fueron inoculadas con *Cladosporium sp.* y *Alternaria sp.* Por lo general a las 48 horas, el aceite esencial de clavo no presenta ninguna eficacia en las concentraciones de 1 μL y 5 μL sobre el *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.* y *Absidia sp.*

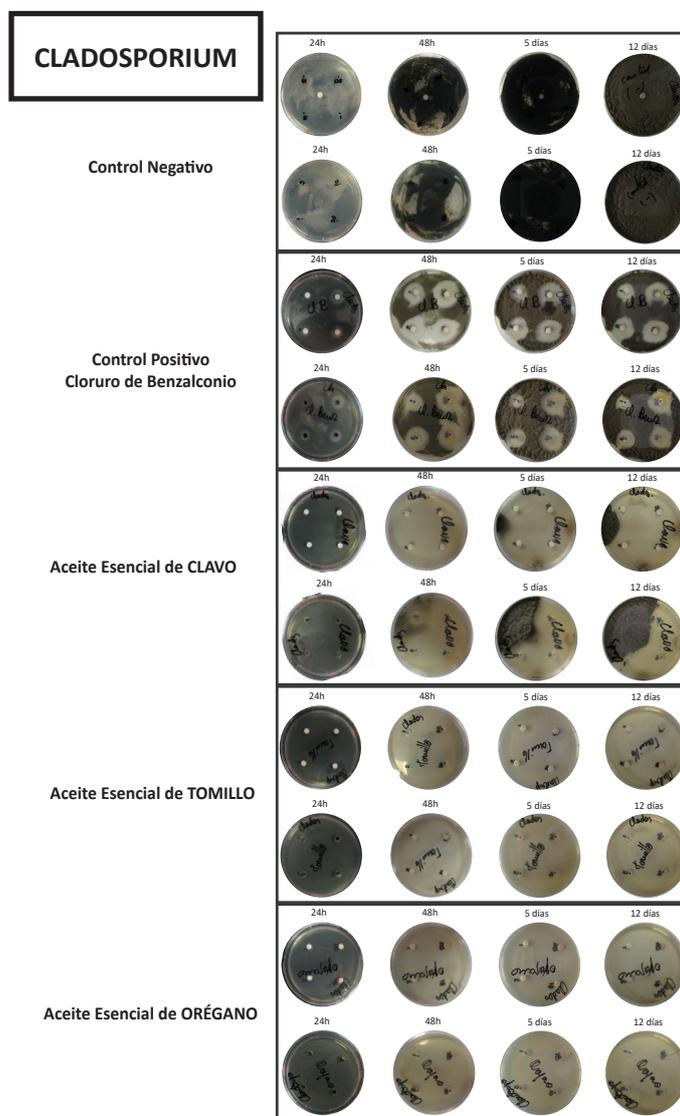
Podemos observar crecimiento en todas las placas tratadas con Cloruro de benzalconio en todas las cantidades, a excepción de los hongos negros, en los que el crecimiento comienza a ser notable a las 48 h.

⁸⁴ Fichas técnicas de los aceites esenciales disponibles en: ESSENCIALES.com, Barcelona.

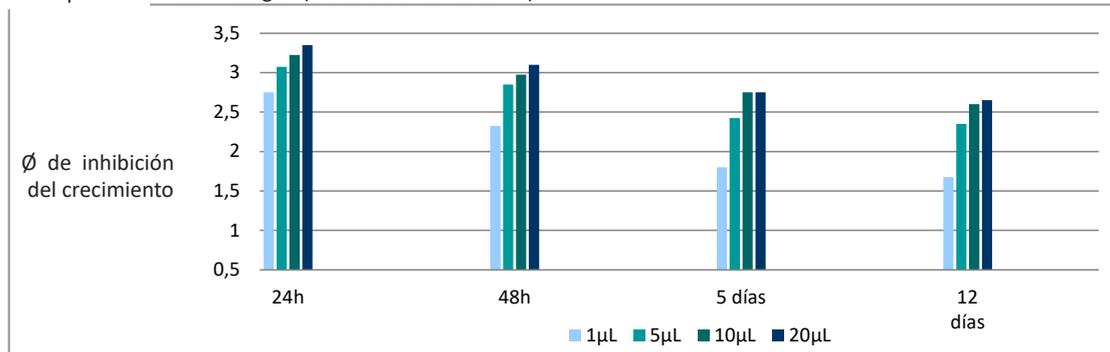
⁸⁵ Ver Anexo pp. 84- 100 para ver en detalle todos los resultados obtenidos, a las 48h, 72h, 5 días y 12 días y las gráficas correspondientes del diámetro de inhibición del crecimiento.

Tras 12 días no se ha producido ningún crecimiento en las placas tratadas con los aceites de Orégano y Tomillo. Mientras que el aceite de Clavo y el cloruro de benzalconio han perdido casi toda su efectividad en todas las proporciones sobre las placas inoculadas con *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* y *Trichoderma sp.*

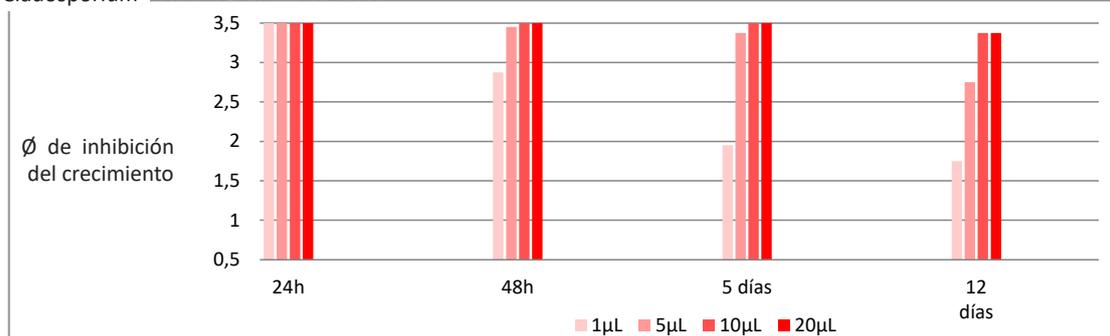
De los hongos estudiados en este ensayo el *Aspergillus niger* y el *Trichoderma sp.* es los que en general presentar mayor resistencia a ser inhibidos por los biocidas. Mientras que los hongos negros, *Cladosporium sp.* y *Alternaria sp.* son los que muestran un mayor nivel de inhibición.



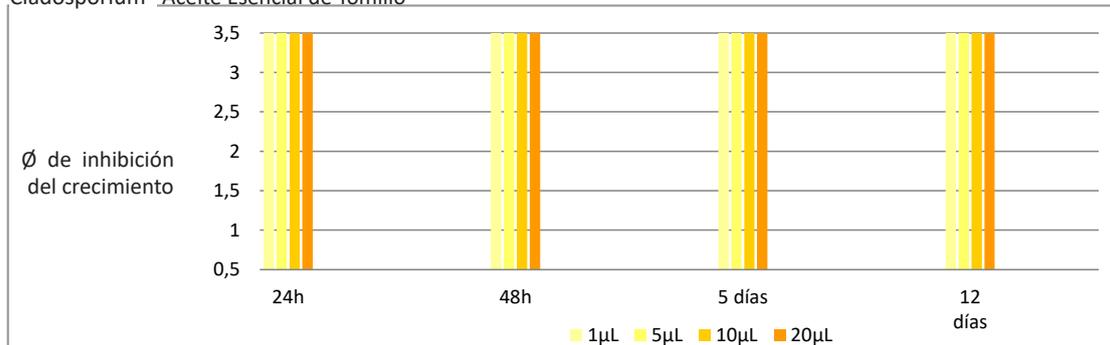
Cladosporium - neo®Desogen (Cloruro de Benzalconio)



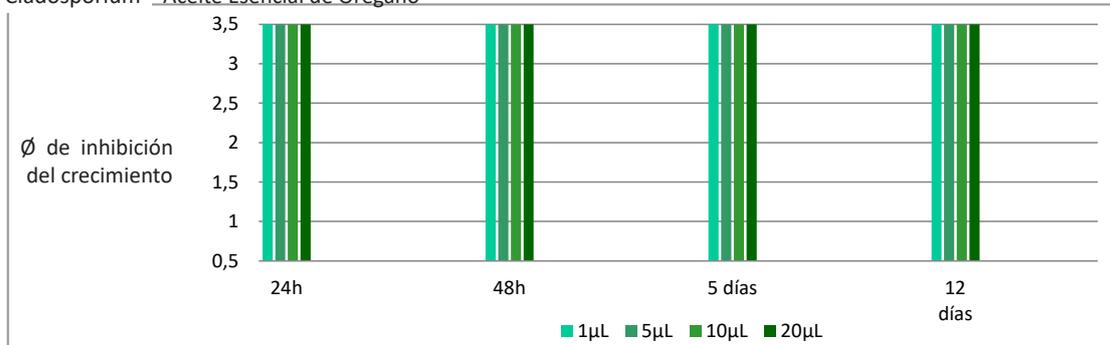
Cladosporium - Aceite Esencial de Clavo



Cladosporium - Aceite Esencial de Tomillo



Cladosporium - Aceite Esencial de Orégano



8.1. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS AEs DE ORÉ- GANO Y TOMILLO

Una vez realizado el ensayo de la actividad antifúngica de los aceites se decidió comprobar la efectividad de los aceites de Orégano y Tomillo en las diferentes concentraciones por separado. Puesto que al ser aceites más efectivos la ausencia de crecimiento podía deberse a la zona con mayor cantidad de aceite. Este estudio se realizó sobre 3 Hongos, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* y *Cladosporium sp.*

La efectividad de los biocidas se comprobó mediante el análisis cualitativo de los crecimientos en las placas y mediante la medida de los diámetros de inhibición del crecimiento.

Materiales y métodos

Esta fase se realizó de la misma manera que la anterior, para cada hongo se emplearon cuatro placas por aceite además del control negativo. En cada placa se realizó el ensayo por duplicado, aplicando la misma concentración de aceite en las dos cavidades.

Resultados

En el caso de los dos aceites a las 48 horas podemos observar un crecimiento notable en las placas inoculadas con *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.*, ensayadas con 1 μ L. A los 5 días, los aceites en estas placas han perdido su poder de inhibición.

En el caso del *Cladosporium sp.*, no se observa ningún tipo de crecimiento en las placas tratadas con aceite de Orégano, mientras que las tratadas con aceite de Tomillo han perdido su poder inhibidor a 1 μ L a los 5 días. A los 12 días se observa crecimiento del hongo en los extremos de la placa a 5 μ L, 10 μ L y 20 μ L.

En el caso del *Penicillium sp.*, a los 12 días solo hay poder de inhibición en las placas tratadas con 10 μ L y 20 μ L, entre estas concentraciones los resultados son muy similares.

El aceite de Tomillo para las placas sembradas con *Aspergillus niger* solo muestra efectividad a 20 μ L. En caso del aceite de Orégano a los 12 días las placas con 10 μ L y 20 μ L apenas muestran crecimiento, únicamente en los extremos de la placa⁸⁶.

Esto demuestra que tanto el aceite de orégano como el de tomillo tienen buenas capacidades antifúngicas, no obstante, se confirma que a 1 μ L y 5 μ L la efectividad no es tan elevada.

⁸⁶ Ver Anexo pp. 95-100. Actividad del Orégano y Tomillo para más información. En este anexo se encuentran las gráficas del diámetro de inhibición y todas las fotografías realizadas a las 48 horas, 5 días y 12 días.

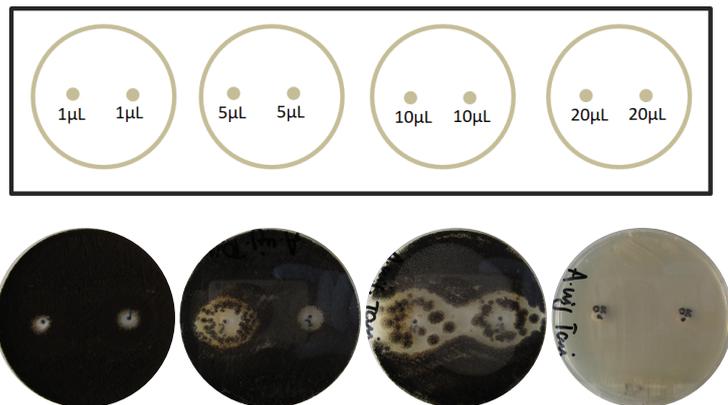


Figura 31 - *Aspergillus niger* con aceite de Tomillo a 1 μ L, 5 μ L, 10 μ L y 20 μ L.

8.2. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS AEs

Una vez comprobada la eficacia de los aceites sobre crecimientos fúngicos se decidió comprobar su actividad sobre las bacterias aisladas del mismo conjunto mural. Este ensayo se realizó sobre todos los aislamientos bacterianos (a,b,c,d,e,f,g,h,i,j).

Materiales y métodos

Se preparó una solución con esporas de todas las bacterias aisladas, y se aplicó con torunda sobre placas Petri con medios de cultivo PC.

Se testaron los cuatro biocidas, aceite esencial de Tomillo, de Orégano, de Clavo y Cloruro de benzalconio (BAC) como control positivo. Se inocularon para cada biocida y bacteria una placa utilizando dos concentraciones de los biocidas, 1 μ L y 3 μ L. Además se realizó un control negativo por bacteria. Todas las placas fueron incubadas a 28°C durante 48h.

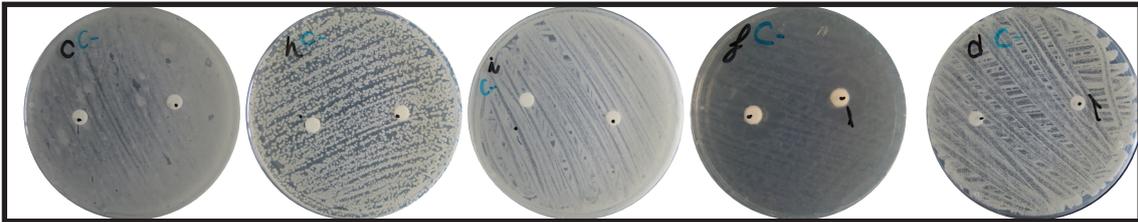
Resultados

De los resultados obtenidos, extraemos que en general todas las bacterias han sido más sensibles a los aceites esenciales de Orégano y Tomillo. Las bacterias en las que el nivel de inhibición ha sido mayor, donde no han crecido bacterias, con estos aceites son las Gram – con el aceite de tomillo y la f, bacilo esporulado Gram + con ambos aceites. Mediante el análisis visual, podemos observar que en el resto de placas el nivel de inhibición ha sido ligeramente mayor con el Tomillo a una concentración de 3 μ L.

Por otro lado, en algunas placas como la h y la i, ambos bacilos esporulados Gram +, tratadas con aceite esencial de clavo no se ha producido ningún nivel de inhibición, y las bacterias han crecido por toda la placa.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS AEs

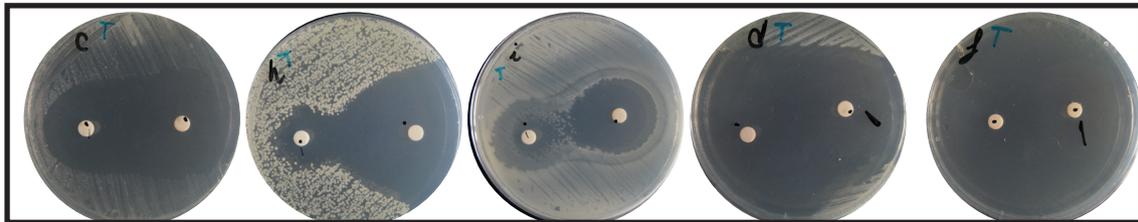
Control Negativo



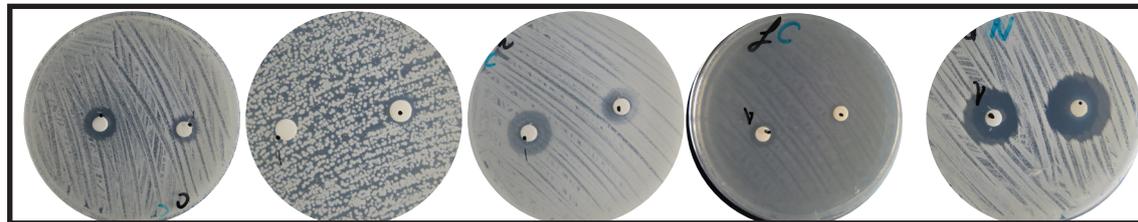
Aceite Esencial de Orégano



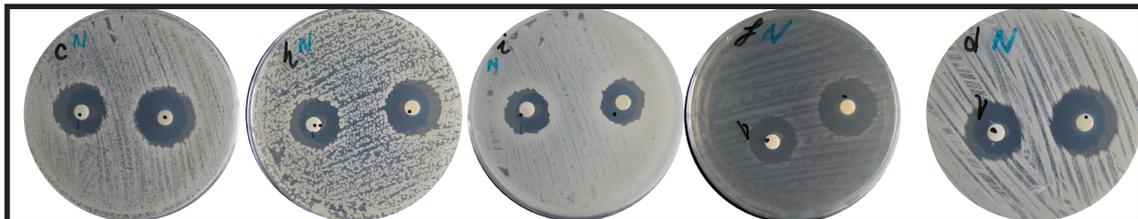
Aceite Esencial de Tomillo



Aceite Esencial de Clavo



Cloruro de Benzalconio



9. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

Una vez comprobada la eficacia fúngica de los tres aceites esenciales sobre los hongos seleccionados, se procedió a escoger diferentes concentraciones de los aceites según las referencias bibliográficas, con el fin de determinar a qué concentraciones comienzan a ser efectivos los biocidas. La finalidad de esta parte de la investigación es encontrar una concentración óptima de los aceites testados hipotetizando su posible uso sobre una obra mural.

Materiales y métodos

El estudio se realizó sobre placas Petri con medios de cultivo SAB. Se utilizaron 5 emulsiones biocidas usando los aceites a un 100%, 50%, 10%, 5% y 1% en una solución estéril de Agua con Tween20 al 0.5%, según el protocolo de Elsayed y Shabana.

Se aplicaron 200µL de cada solución biocida sobre las placas Petri y posteriormente se sembraron las placas con los 6 hongos. En cada placa se sembraron 3 circunferencias de 5mm del mismo hongo, de este modo se realiza el ensayo por triplicado. Para cada Hongo se probaron los 4 biocidas en las 5 concentraciones más el control negativo.

Las probetas se incubaron durante 7 días a 28°C en estufas termostataadas.

Los resultados se obtuvieron mediante el estudio cualitativo del nivel de crecimiento de los hongos en función del tipo de desarrollo de cada género fúngico, para ello los controles negativos se emplearon a modo de referencia.

Resultados

El aceite esencial de orégano y de tomillo muestran capacidades antifúngicas a una concentración del 10% en la mayoría de hongos, el aceite de clavo refleja unos resultados muy similares, no obstante el *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.* comienzan crecer a estos niveles de concentración.

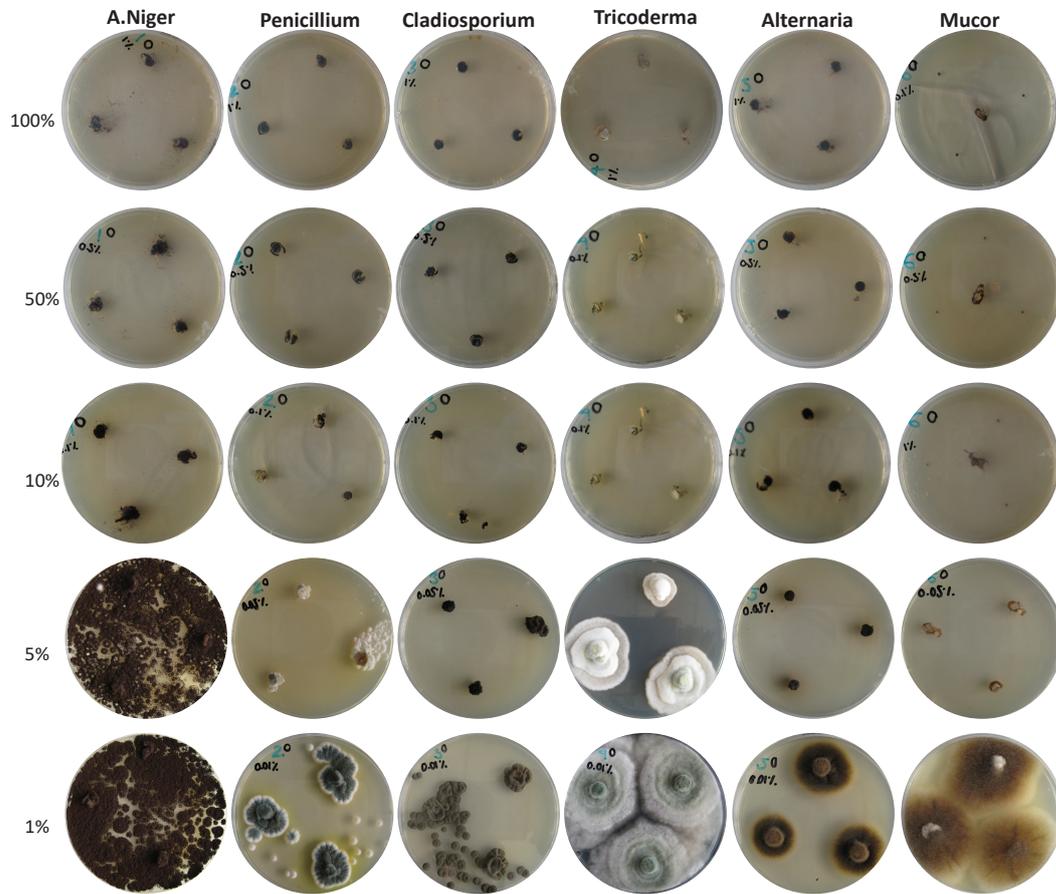
Los tres aceites empleados son efectivos al 100% y al 50% a los 7 días de haber sido incubados. Por otro lado el neo Desogen pierde efectividad en este periodo de tiempo, y se pueden observar crecimientos en las placas de *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* y *Cladosporium sp.*, los otros tres hongos comenzaban a crecer a una concentración de un 10%.

En general la concentración óptima de los aceites esenciales estudiados en esta investigación, para la inhibición de crecimiento de todos los hongos aislados de las pinturas murales es un 10%⁸⁷.

87 Ver Anexo Concentraciones inhibitorias pp.100-104 para más información. En este apartado se encuentran las fotografías realizadas a los 7 días de todos los hongos y aceites esenciales.

Ensayo de la concentración mínima inhibitoria del Aceite de Orégano

Aceite esencial de Orégano



Control Negativo



		ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO																	
% AE	A. Niger			Penicillium			Cladosporium			Trichoderma			Alternaria			Ibsidia			
100%	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
50%	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
10%	+	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
5%	+++	++	++	---	---	---	---	---	---	++	++	+	---	---	---	---	---	---	
1%	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	
C-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	

10. TEST DE EFICACIA ANTIFÚNGICA DE AEs EN PROBETAS

Una vez comprobada la eficacia de los aceites a diferentes concentraciones se comprobó la actividad biocida de estos mismos sobre probetas, con la finalidad, de comprobar la viabilidad de uso de estos biocidas en el campo de la restauración.

Materiales y métodos

Se utilizaron tres probetas de ladrillo preparadas con un mortero de cal⁸⁸ y de dimensiones 10`5 cm x 10`5 cm, el grosor del mortero era aproximadamente de 10mm. Se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min. Se cultivaron tres hongos, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* y *Cladosporium sp.*, sobre distintas probetas. Para favorecer el crecimiento de los hongos se añadieron 10 ml de caldo de cultivo, preparado según instrucciones del fabricante, diluido al 50% en Agua esterilizada con Tween 20 al 0.5% .Posteriormente se añadió sobre la probeta una solución fúngica preparada mediante la disolución de esporas en agua esterilizada con Tween 80.

Con el fin de recrear unas condiciones óptimas para la proliferación de microorganismos las probetas se colocaron sobre una cama de algodón humedecido con 100ml de agua esterilizada para mantener una humedad ideal en el proceso de incubación. Las probetas estuvieron durante 7 días en estufas termostataadas a 28C.

Tras el periodo de incubación, de las tres probetas solo la sembrada con esporas de *Penicillium* creció homogéneamente. Por ello y con el fin de poder probar los tres aceites esenciales y el cloruro de benzalconio como control positivo en una misma probeta el resto del ensayo se realizó únicamente sobre esta probeta.

Se dividió la probeta en 4 cuadrantes y se realizaron mediciones del ATP en cada zona. Después se realizó una limpieza mediante cepillado en seco sobre la superficie, con el fin de simular la primera fase de un tratamiento sobre una obra real, posteriormente se aplicó en cada cuadrante la emulsión biocida al 5% . Después de la limpieza se realizaron de nuevo medidas de ATP, posteriormente la probeta se puso a incubar en las mismas condiciones.

A los 3 días de incubación se tomaron nuevas medidas de ATP para comprobar si había presencia de células vivas. Todas las medidas de ATP se realizaron siguiendo el patrón lineal de la.



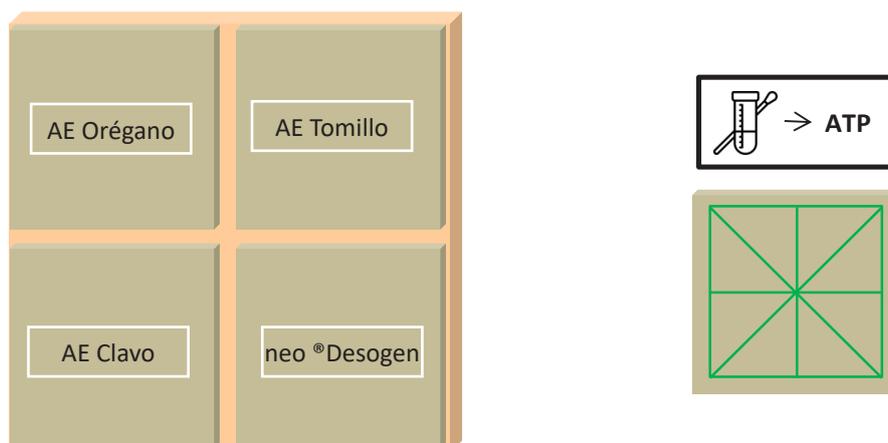
Figura 33 - Probeta antes de ser sembrada



Figura 34 - Probeta después de incubación



Figura 35 - Probeta después de realizar la limpieza.



Mapa 5 - Esquema de la división de la probeta y modo de toma de muestras de ATP

Resultados

Tras la primera medida de ATP confirmamos la presencia de un gran número de células vivas en los cuatro cuadrantes, recordamos que a partir de 1000 URL se considera positiva la presencia de vida. La zona número 3 es en la que se confirmó la existencia de un mayor número de células, mientras que la número dos fue en que se encontró un menor número. En cualquier caso, las cifras extraídas en las cuatro zonas son muy similares.

Una vez realizado el proceso de limpieza se pudo observar un descenso considerable de URL en todas las zonas, siendo el número 4 tratada con neo®Desogen en la que se obtuvo la cifra más baja.

Tras tres días de incubación en condiciones óptimas los datos obtenidos en la medición de ATP en las zonas limpiadas con las emulsiones de los aceites esenciales se registró una presencia muy baja de células vivas. La cifra más alta se encontró en la zona número 3, tratada con la emulsión de clavo.

Los mejores resultados se obtuvieron en los cuadrantes 1 y 2, siendo unidades por debajo de 100^o URL.

Tabla 4 - Detección ATP en probeta

	Antes de la limpieza 16:40 h-16:45 h	Después de la limpieza 17:15 h-17:21 h	3 días de Incubación
Orégano	33.420 URL	5.849 URL	979 URL
Tomillo	22.449 URL	5.554 URL	992 URL
Clavo	40.856 URL	4.235 URL	5.576 URL
neo®Desogen	37.504 URL	2.388 URL	1.162 URL

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Por un lado, los resultados obtenidos en el control medioambiental realizado en el entorno de las pinturas murales muestran una gran cantidad de hongos presentes en el aire, en concreto se registraron datos más elevados en el interior de inmueble. De los hongos aislados en el aire, la mayoría son hongos negros del género *Cladosporium* sp. Las condiciones climáticas del interior de la ermita muestran ser muy cercanas a los valores óptimos para el crecimiento de microorganismos, en cualquier caso, este entorno puede ser favorable para la vida de algunos hongos y bacterias. Sin embargo, los resultados obtenidos son los pertenecientes a un único muestreo, siendo por lo tanto un estudio puntual de la contaminación microbiológica del aire tanto en el exterior como en el interior de la ermita.

Por otra parte, en el control realizado sobre el conjunto mural se muestra que las zonas de pintura original contienen un mayor número de células vivas, siendo los lugares en los que más hongos y bacterias se aislaron. Estos lugares del conjunto mural coinciden en ser los lugares en los que más humedad superficial hay, siendo de este modo el lugar en el que los microorganismos podrían encontrar una hábitat más óptimo para su desarrollo. Además, el polvo blanquecino encontrado en esta superficie y analizado mediante FTIR muestra en sus resultados compuestos que podrían proceder de los productos de degradación de algunos microorganismos.

En los ensayos realizados a lo largo de esta investigación comprobamos que los cuatro biocidas utilizados tienen actividad antifúngica. El aceite esencial de orégano muestra tener la mayor eficacia frente a todos los géneros de hongos, no obstante para las bacterias el aceite más efectivo es el de Tomillo. De las pruebas realizadas para comprobar la eficacia antifúngica de los dos aceites observamos que en el caso de repartir las cuatro cantidades en una misma placa, no se producía ningún tipo de crecimiento, probablemente, en estas placas se haya inhibido el crecimiento además de inactivar o matar las esporas sembradas en las placas. Con 20 micro litros estos dos aceites muestran muy buenas capacidades de inhibición del crecimiento, probablemente, esta cantidad añadida a las otras haya inhibido el total de la placa.

La mayoría de aceites en emulsión muestran buenas capacidades antifúngicas a una concentración de un 10%, no obstante, estos resultados varían en función del género de hongo. *Aspergillus niger* es el hongo más resistente a ser inhibido por todos los biocidas, mientras que el más sensible ha sido el *Cladosporium* sp.. El otro hongo negro aislado, *Alternaria* sp., también mostró bastante sensibilidad, seguido del *Absidia* sp.

Penicillium sp. y *Trichoderma sp.* han mostrado resultados muy similares en cuanto a resistencia a ser inhibidos, siendo también en estos casos el Orégano el más efectivo, aunque, con resultados muy similares con el aceite de Tomillo.

Las capacidades biocidas de los aceites en emulsión al 10% también han demostrado tener buenas capacidades biocidas en la probeta examinada en este estudio. En una primera medición, tras la limpieza realizada con los distintos biocidas el cloruro de benzalconio (neo[®]Desogen) fue el más efectivo, siendo el que menor número de URL tenía. Esto se puede deber a las propiedades de detergencia del neo Desogen, que además de tener propiedades biocidas actuó como jabón sobre la superficie realizando una limpieza a mayor profundidad. No obstante, tras 3 días de incubación, las zonas con menor número de células vivas fueron las tratadas con las emulsiones de Orégano y Tomillo.

CONCLUSIONES

Tras la realización de la presente investigación se ha podido comprobar la eficacia de los aceites esenciales de Orégano, Tomillo y Clavo. Los resultados obtenidos confirman que todos los aceites tienen actividad antifúngica, en concreto, el aceite de orégano es el que muestra mayor efectividad en los hongos aislados en la presente investigación, siendo el *Aspergillus niger* el más resistente y los hongos negros los más sensibles. Como objetivo complementario, también se comprobó la eficacia de los aceites seleccionados sobre las bacterias aisladas, demostrando que en la mayoría de casos los tres aceites tienen poder de inhibición, siendo en este caso el Tomillo el que mostraba más actividad.

En lo referente a las pinturas, la presencia de hongos y bacterias queda confirmada. La mayoría de géneros fúngicos aislados de las pinturas murales también se han encontrado en el aire del interior y exterior de la ermita, a excepción del *Aspergillus niger* que solo ha sido aislado del conjunto mural. Tras el muestreo realizado en esta investigación observamos una mayor presencia de microorganismos en las zonas de pintura original, probablemente porque estas tienen una mayor porosidad y absorben una mayor cantidad de humedad. Esto convierte estas zonas en los lugares con las condiciones más favorables para la presencia y proliferación de microorganismos.

Por otro lado, las únicas zonas en las que podemos observar manchas de origen biológico son las situadas en losrevoques de 1980, por lo que, en futuras líneas de investigación se debería continuar estudiando su composición y naturaleza. Además de seguir estudiando la pátina blanquecina que recubre prácticamente todas las zonas de pintura original, para así, poder determinar si el origen es biológico.

Por último, y teniendo en cuenta todos los factores que envuelven al conjunto el estado de conservación de las pinturas es aceptable, no obstante, determinamos que sería recomendable realizar un seguimiento microbiológico y prestar especial atención a la presencia de hongos negros, debido a los problemas que pueden generar.

Gracias al estudio ambiental realizado, podemos concluir que las condiciones climáticas del interior de la ermita, en los periodos de tiempo registrados, mantienen verdaderos valores de riesgo para la proliferación de microorganismos. El problema principal detectado respecto al ambiente es la humedad, no solo la presente en el aire, que de por sí ya mantiene valores muy elevados entre un 60%-70%, también la humedad presente en los sustratos.

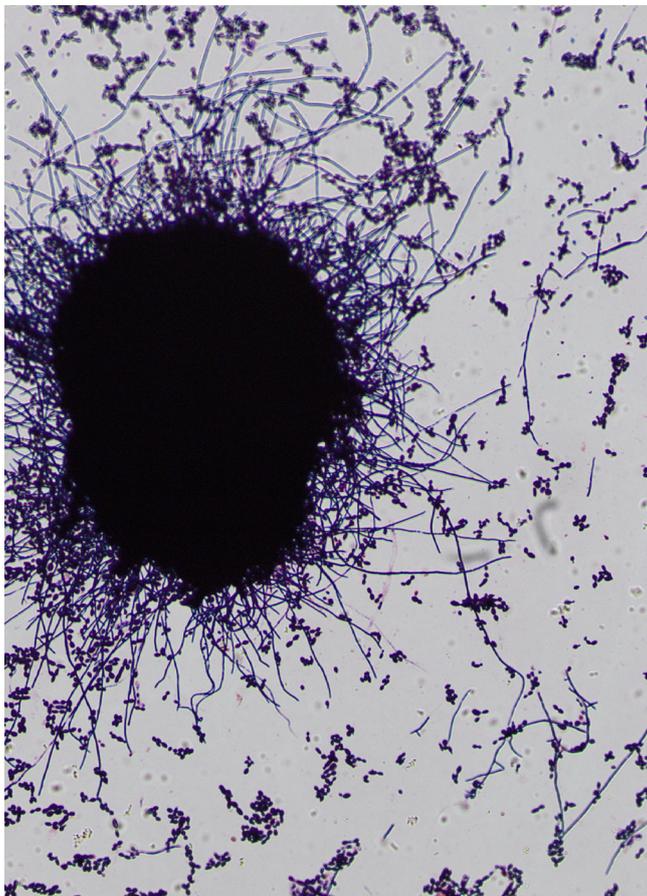
Aplicar un tratamiento biocida bajo estas condiciones supondría llevar un control exhaustivo del procedimiento, ya que, aunque se intente erradicar la presencia de microorganismos las condiciones en las que estos se encuentran continúan siendo favorables para su supervivencia, además, en el caso de este conjunto mural la contaminación microbiológica presente en el aire, en la toma realizada, es bastante elevada y en caso de ser igual durante todo el año los microorganismos seguirían presentes, pudiendo volver a depositarse sobre las pinturas.

En cualquier caso, para poder plantear un tratamiento de erradicación biológica sería necesario realizar más estudios durante periodos de tiempo más prolongados.

Los productos de origen natural, en concreto los aceites esenciales, son una gran alternativa

para reducir la toxicidad de los biocidas convencionales, que por lo general, se utilizan en tratamientos de conservación y restauración del patrimonio.

Para llegar a ser empleados sobre una obra real, de características similares a la estudiada, consideramos que son necesarios más estudios, para poder conocer el comportamiento de estas sustancias a largo plazo con los sustratos con lo que interactúan, poder determinar un método adecuado de aplicación en función de las necesidades de la obra y en conclusión continuar investigando sobre el uso de estas sustancias innovadoras para hacer posible su futura aplicación sobre el patrimonio cultural. De este modo, contribuir al uso de productos seguros para la obra, los restauradores y el medio ambiente.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecerle sinceramente a mis tutores todo su apoyo y tiempo. A Josele, por todo lo enseñado a lo largo de estos años, por su paciencia y toda su dedicación. A Rosa por acogerme en su laboratorio, por descubrirme el mundo de la microbiología, por responder mis mil preguntas diarias con una sonrisa. A los dos, por todas las horas invertidas, por enseñarme a ser mejor en mi profesión, por las risas.

A mi pequeña familia de familia de Valencia por estos años por todo el apoyo, por tirar los unos de los otros y crecer juntos. Por todo lo bueno que vamos a conseguir. A cuatro personas fantásticas, a tí amiga, por todo. Os voy a echar mucho de menos.

A mis padres por absolutamente todo, a vosotros sí que sí por vuestra paciencia, por creer siempre en mí, gracias. A mi familia por el apoyo desde la distancia.

A tí, por enseñarme siempre el lado bueno de las cosas. A ellas, por estar siempre ahí.

A la Asociación de Santa María de Arcos, por abrirme las puertas durante casi 3 años. Por el amor que le tenéis a vuestro Patrimonio.

A mi tierra por tener tantos tesoros escondidos.

A Tricio y a tí abuela.

A todas las personas que lleguéis a esta página, gracias por haber gastado un poquito de vuestro tiempo en leer este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

AIRA, M.J. et al. (2007) *Aeromycological study in the Cathedral of Santiago de Compostela (Spain) en: International Biodeterioration & Biodegradation 60*

ALDOSARI, M.A. et al. (2019) *Using ZnO nanoparticles in fungal inhibition and self-protection of exposed marble columns in historic sites. .*

BRODGEN, KA (2005) *Antimicrobial peptides:pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? en Nature revisión microbiológica.*

CANEVA, G., NUGARI, M.P. Y SALVADORI, S. (2000). *La biología en la restauración. Nerea, S.A.*

CARRILLO-GONZÁLEZ, R., MARTÍNEZ-GÓMEZ, M.A., GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M. del C.A. y MENDOZA HERNÁNDEZ, J.C., 2015. *Inhibition of microorganisms involved in deterioration of an archaeological site by silver nanoparticles produced by a green synthesis method. Science of the Total Environmen. vol. 565, pp. 872-881. ISSN 18791026*

DRESLER, C. et al. (2017) *“Development of controlled release systems of biocides for the conservation of cultural heritage” en International Biodeterioration & Biodegradation.*

DOMÉNECH CARBÓ, M.T. y YUSÁ MARCO, D.J., *Aspectos físico-químicos de la pintura mural y su limpieza [en línea]. S.l.: Editorial de la UPV. ISBN 8497059417.*

ESSA, A.M.M., KHALLAF, M.K. (2014) *Biological nanosilver particles for the protection of archaeological stones against microbial colonization. En International Biodeterioration and Biodegradation*

ELSAIED, Y., SHABANA, Y. (2018) *The effect of some essential oils on Aspergillus Niger and Alternaria Alternata infestation in archeological oil paintings.*

EED, H.R., et al.(2016) *Bioluminescence-Sensing Assay for Microbial Growth Recognitio. Journal of Sensors Volume 2016, Article ID 1492467, 5*

FENG, W. y ZHENG, X., 2007. *Essential oils to control Alternaria alternata in vitro and in vivo. , vol. 18, pp. 1126-1130.*

INSTITUTO DEL PATRIMONIO HISTÓRICO ESPAÑOL., 2008. *La ciencia y el arte : ciencias experimentales y conservación del patrimonio histórico.S.l.: Ministerio de Cultura, Dirección General de Bellas Artes y Bienes Culturales, Subdirección General del Instituto del Patrimonio Histórico Español.*

JOURNAL, E. y STUDIES, R., 2012. *Original article OCCURRENCE OF FUNGI ON SOME DETERIORATED ANCIENT EGYPTIAN MATERIALS AND THEIR CONTROLLING BY ECOFRIENDLY PRODUCTS 2 . Materials and Methods Three essential materials were Australia [8]. 3 . Tecto ® Flowable SC chosen and used as follow . , vol. 2, no. 2, pp. 91-101.*

FIDANZA, M.R., CANEVA, G. review. *En Journal of Cultural Heritage [en línea]*. 2019. DOI: 10.1016/j.culher.2019.01.005

GOMOIO, I. et al. (2018). "Microbial Ability to Colonize Mural Painting and Its Substrate" en *Acta PHYSICA Polonia*.

ION, R., BUNGHEZ, R., AVRAMESCU, S. (2014) *Comparative study of antifungal effect of natural extracts and essential oils of Ocimum basilicum on selected artefacts* COMPARATIVE STUDY OF ANTIFUNGAL EFFECT OF NATURAL EXTRACTS AND ESSENTIAL OILS.

KALEMBA, D y KUNICKA, A. (2003) *Antibacterial and Antifungal properties of Essential Oils*. En: *Current Medicinal Chemistry*, 10.

LA, S.A.R.M.F., MALAGODI, R.M., ROSSI, C.O. y CRISCI, A.M.P.G.M., 2010. *ZnO and ZnTiO₃ nanoparticles for antimicrobial stone coating*. , pp. 829-834. DOI 10.1007/s00339-010-5658-4.

LEE, YU. *LA TÉCNICA DE LA POLICROMÍA EN LOS ARTESONADOS DE TEMPLOS BUDISTAS EN TAIWÁN, Caracterización Científica Y Estudio De La Aplicabilidad De Consolidantes Biocompatibles Para Su Conservación*. Tesis Doctoral dirigida por: Dra. María Teresa Doménech Carbó; Dra. Susana Martín Rey; Dra. Dolores Julia, Yusá Marco. Universidad Politècnica de València.

MIRONESCU, M., 2010. *Activity of Some Essential Oils Against*. *Acta Universitatis Cibiniensis Series: E: FOOD TECHNOLOGY*, vol. XIV, no. 2.

NAZZARO, F. et al. (2019) *Essential Oils and Microbial Communication*. DOI: <http://dx.doi.org/1055772/intechopen.85638>

PALLA, F. Y BARRESI, G. (2017). *Biotechnology and Conservation of Cultural Heritage*. Suiza: Springer.

RANDAZZO, L., MONTANA, G., ALDUINA, R., QUATRINI, P., TSANTINI, E. y SALEMI, B., 2015. *Flores Tectorii degradation of mortars: An example of synergistic action between soluble salts and biodegradables*. *Journal of Cultural Heritage*. vol. 16, no. 6.

RÍO OLIVER, C. del. (2017). *ESTUDIO DEL ESTADO DE CONSERVACIÓN DE LAS PINTURAS MURALES DEL MAUSOLEO ROMANO DE LA ERMITA DE SANTA MARIA DE ARCOS (TRICIO, LA RIOJA)*. Disponible en: RiuNet.

SAVKOVIĆ, Ž.D., STUPAR, M., GRBIĆ, M.V.L. y VUKOJEVIĆ, J.B., 2016. *Comparison of anti-Aspergillus activity of Origanum vulgare L. essential oil and commercial biocide based on silver ions and hydrogen peroxide*. *Acta Botanica Croatica*, vol. 75, no. 1, pp. 121-128. ISSN 03650588.

SAKR, A.A., GHALY, M. (2018) *Effect of thymol against fungi deteriorating mural paintings at Tell Basta Tombs, Lower Egypt* en *INTERNATIONAL JOURNAL OF RESEARCH STUDIES IN BIOSCIENCES (IJRSB)*

SANMARTÍN, P. et al (2018) *Melding the Old with the New: Trends in Methods Used to Identify, Monitor, and Control Microorganisms on Cultural Heritage Materials* En: *Environmental Microbiology*

SCARPA, I. et al. *MICRO AND NANOMATERIALS FOR THE BIOCLEANSING OF BIOLOGICAL PATINAS :*

PROBLEMS ROSA-GARC, GO, Synthesis , Photocatalytic , and Antifungal Properties of MgO , ZnO and Zn / Mg Oxide Nanoparticles for the Protection of Calcareous Stone Heritage.

TIMIN, A. y RUMYANTSEV, E., 2015. Novel biocide multifunctional materials based on mesoporous silicas modified by treatment with guanidine polymers or mercaptopropyltrimethoxysilane: synthesis, characterization, and applications. Research on Chemical Intermediates, vol. 41, no. 4.

VENERANDA, M. et al. Evaluating the exploitability of several essential oils constituents as a novel biological treatment against cultural heritage biocolonization. In: Microchemical Journal

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras 1 y 2 - Interior de la ermita en la uqe se encuentran las pinturas.....	11
Figura 3 - Pinturas de la ermita de Santa María de Arcos, Tricio, La Rioja.....	11
Figura 4 - Imagen de <i>Penicillium</i> observada a microscopio óptico (400 aumentos). Detalle con las partes del <i>Penicillium</i> sp.....	17
Figura 5 - <i>Origanum Vulgare</i>	30
MALINALLI. Disponible en: http://malinalli-herbolariamedica.blogspot.com	
Figura 7 - <i>Thymus vulgare</i>	30
MALINALLI. Disponible en: http://malinalli-herbolariamedica.blogspot.com	
Figura 9 - Clavo	30
MALINALLI. Disponible en: http://malinalli-herbolariamedica.blogspot.com	
Figura 6 - Estructura molecular del Carvacrol.....	30
KALEMBA,D y KUNICKA,A. (2003)Antibacterial and Antifungal properties of Essential Oils	
Figura 10 - Estructura molecular del Eugenol.....	30
KALEMBA,D y KUNICKA,A. (2003)Antibacterial and Antifungal properties of Essential Oils	
Figura 8 - Estructura molecular del Timol.....	30
KALEMBA,D y KUNICKA,A. (2003)Antibacterial and Antifungal properties of Essential Oils	
Figura 11 - Lugar de colocación del dispositivo data logger.....	32
Figura 12 - Placas PC y SAB, muestra número 2.....	34
Figura 13 - Placas PC y SAB, muestra número 7.....	34
Figura 14 - Zócalo del conjunto mural con velo blanquecino.....	38
Figura 15 - Detalle en perspectiva del velo blanquecino.....	38
Figura 16 - Toma de muestras mediante hisopo en la zona de manchas de origen biológico.....	39
Figura 17 - Detalle de manchas en los revoques calcácareos.....	39
Figura 18 - picadura con asa esteril para preparación de portaobjeto para estudio en microscopio óptico.....	41
Figura 20 - preparación portaobjetos para determinación de bacterias en microscopio óptico.....	41
Figura 21 - Lugol, Violeta de genciana y Fuchsina básica.....	41
Figura 19 - Placas Petri con preparaciones de azul de algodón lactofenol en portaobjetos.....	41
Figura 22 - Muestra a, bacilo esporulado Gram +.....	42
Figura 23 - Muestra b, Gram -.....	42
Figura 24 - Muestra torunda (hisopo) 2, Cocos.....	42
Figura 25 - <i>Aspergillus niger</i> en placa y visto en microscopio óptico.....	43
Figura 26 - <i>Penicillium</i> sp. en placa y visto en microscopio óptico.....	43
Figura 27 - <i>Cladosporium</i> sp. en placa y visto en microscopio óptico.....	43
Figura 28 - <i>Trichoderma</i> sp. en placa y visto en microscopio óptico.....	44
Figura 29 - <i>Alternaria</i> sp. en placa y visto en microscopio óptico	44
Figura 30 - <i>Absidia</i> sp. en placa y visto en microscopio óptico.....	44
Figura 31 - <i>Aspergillus niger</i> con aceite de Tomillo a 1 μ L, 5 μ L, 10 μ L y 20 μ L.....	50
Figura 32 - Concentración mínima inhibitoria. <i>Aspergillus niger</i> con Tomillo al 1%, 5% y 10%.....	51
Figura 33 - Probeta antes de ser sembrada.....	52
Figura 34 - Probeta después de incubación.....	52
Figura 35 - Probeta después de realizar la limpieza.....	52

Las figuras sin referenciar son de la misma autoría del presente trabajo.

A
Anexos

**MUESTREO
ZONA a,A**

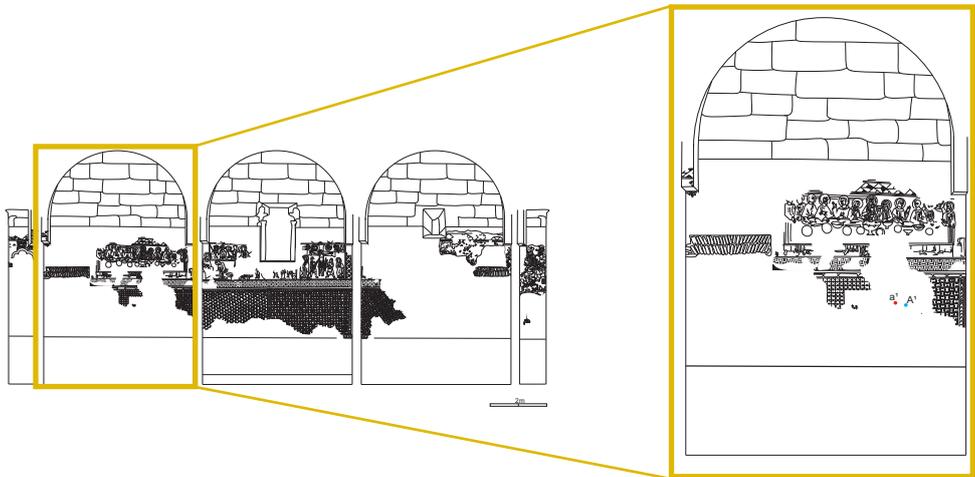
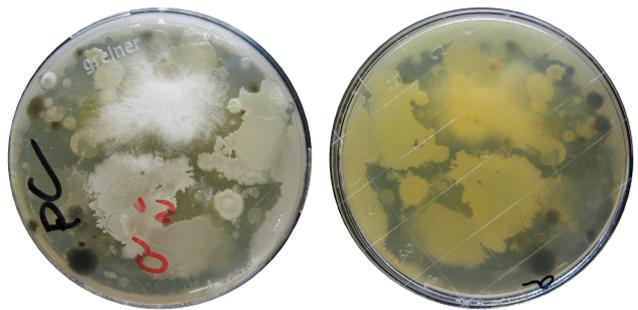
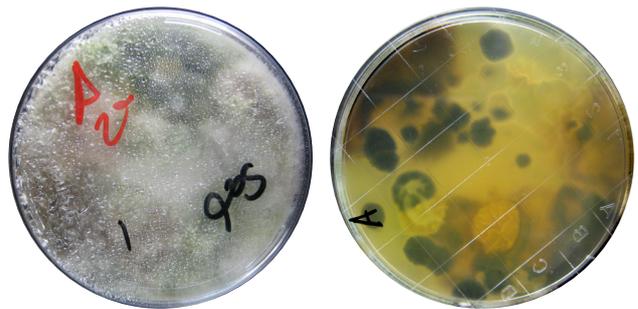


Plate Count Agar (PC) para bacterias → a



Sabouraud Detroxe Agar (SAB) para Hongos → A



Bacterias aisladas de placas PC zona A

Hongos aislados de placas SAB zona A



**MUESTREO
ZONA c,C**

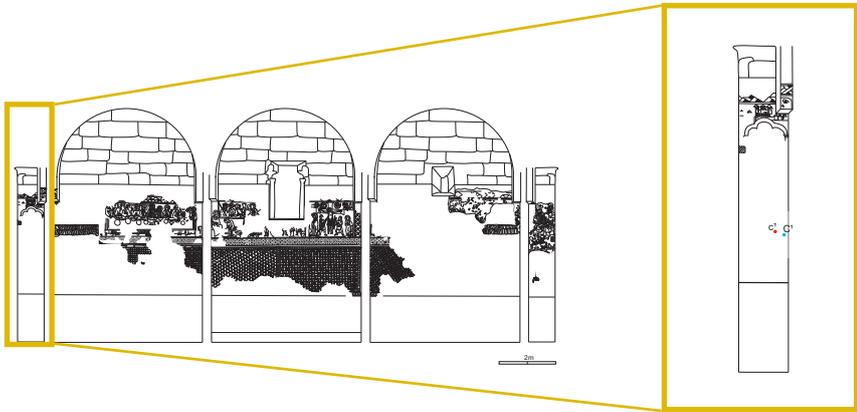
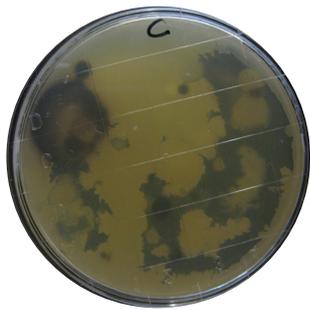
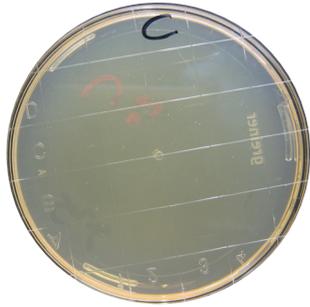


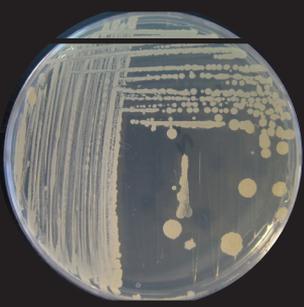
Plate Count Agar (PC) para bacterias → C



Sabouraud Detroxe Agar (SAB) para Hongos → C



Bacterias aisladas de placas PC zona C



**MUESTREO
ZONA b,B**

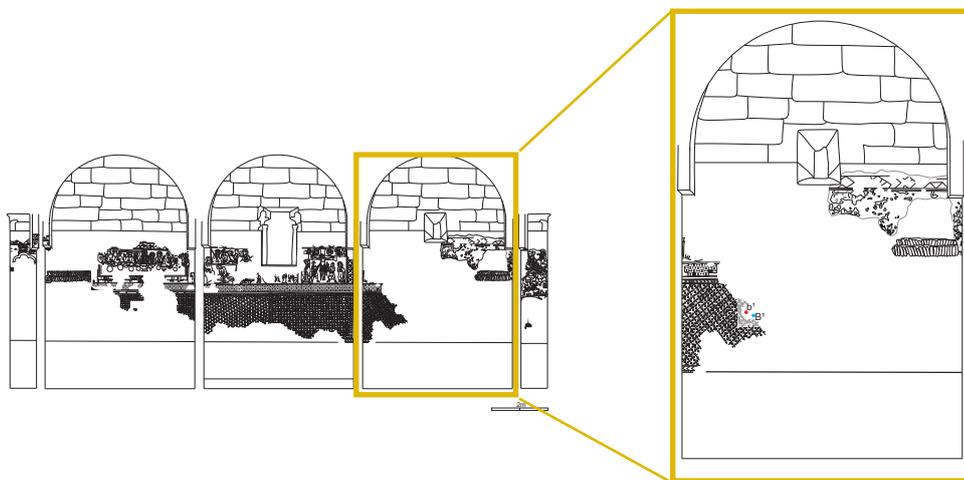
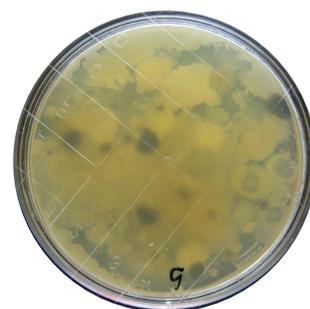


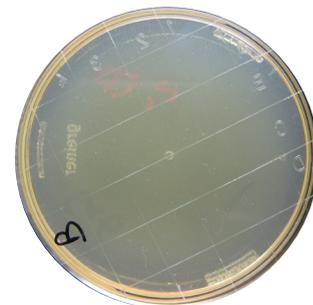
Plate Count Agar (PC) para bacterias

→ **b**

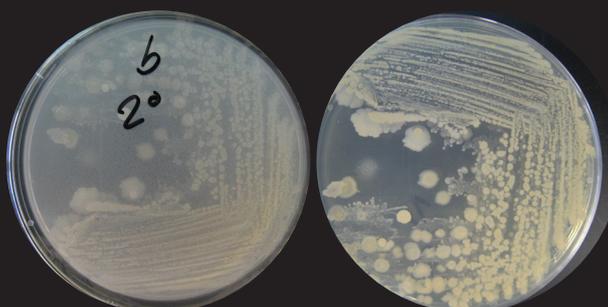


Sabouraud Detroxe Agar (SAB) para Hongos

→ **B**



Bacterias aisladas de placas PC zona b



**MUESTREO
ZONA d,D**

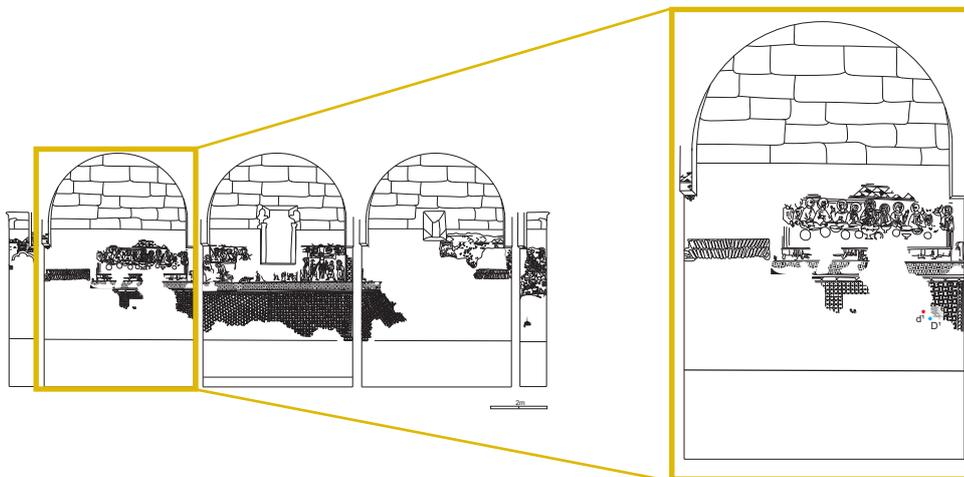
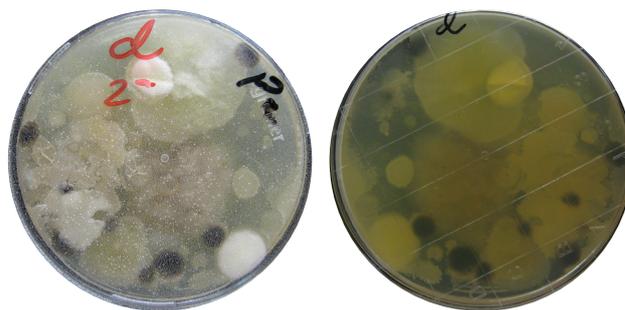
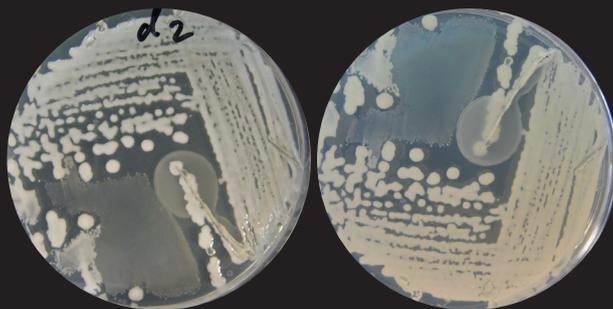


Plate Count Agar (PC) para bacterias

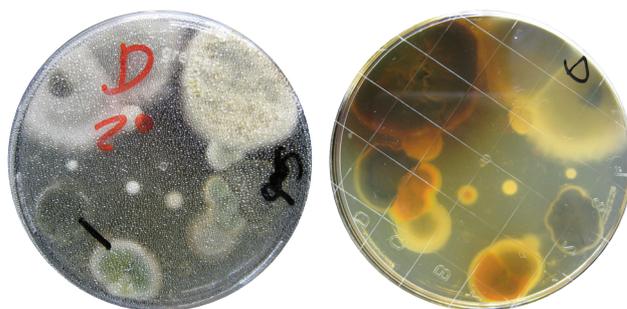
→ d



Bacterias aisladas de placas PC zona d



Sabouraud Dextrose Agar (SAB) para Hongos → D



Hongos aislados de placas SAB zona D



**MUESTREO
ZONA e,E**

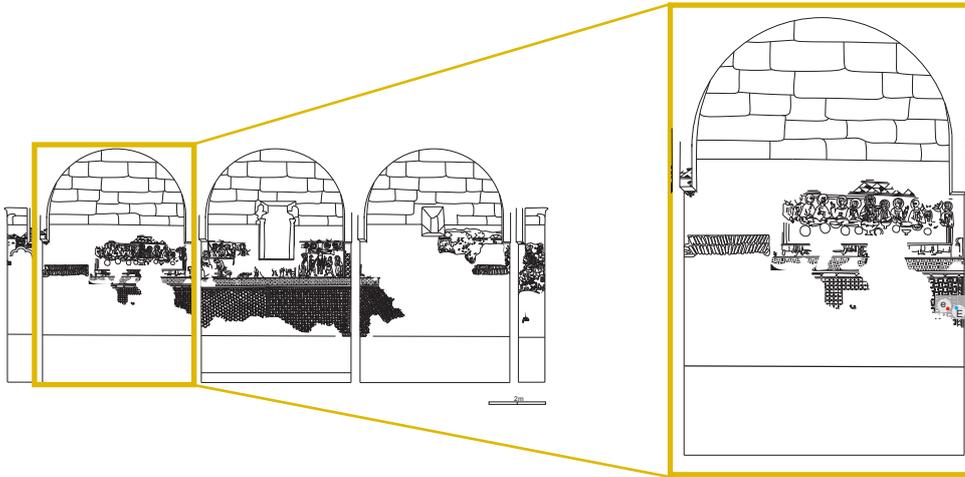


Plate Count Agar (PC) para bacterias → e



Sabouraud Detroxe Agar (SAB) para Hongos → E



Hongos aislados de placas SAB zona E



**MUESTREO
ZONA f,F**

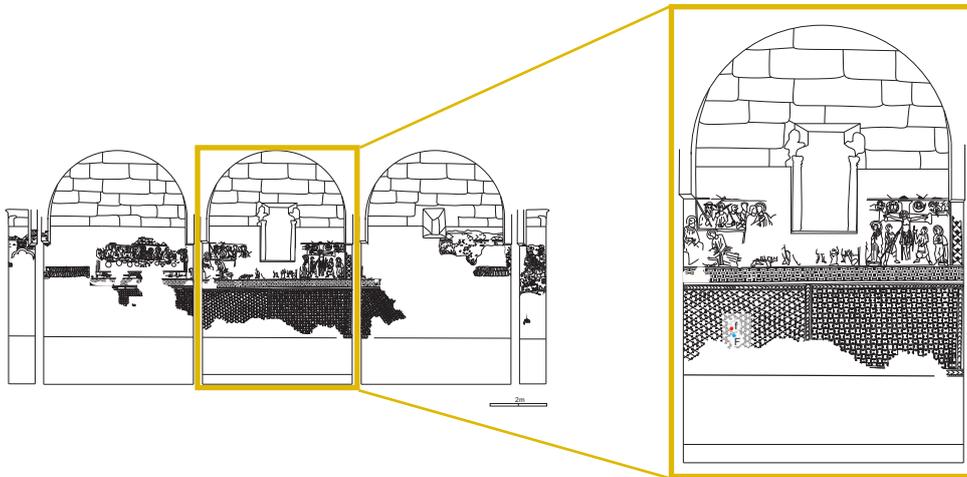


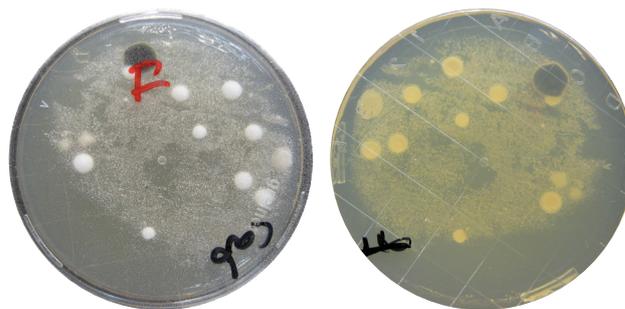
Plate Count Agar (PC) para bacterias → f



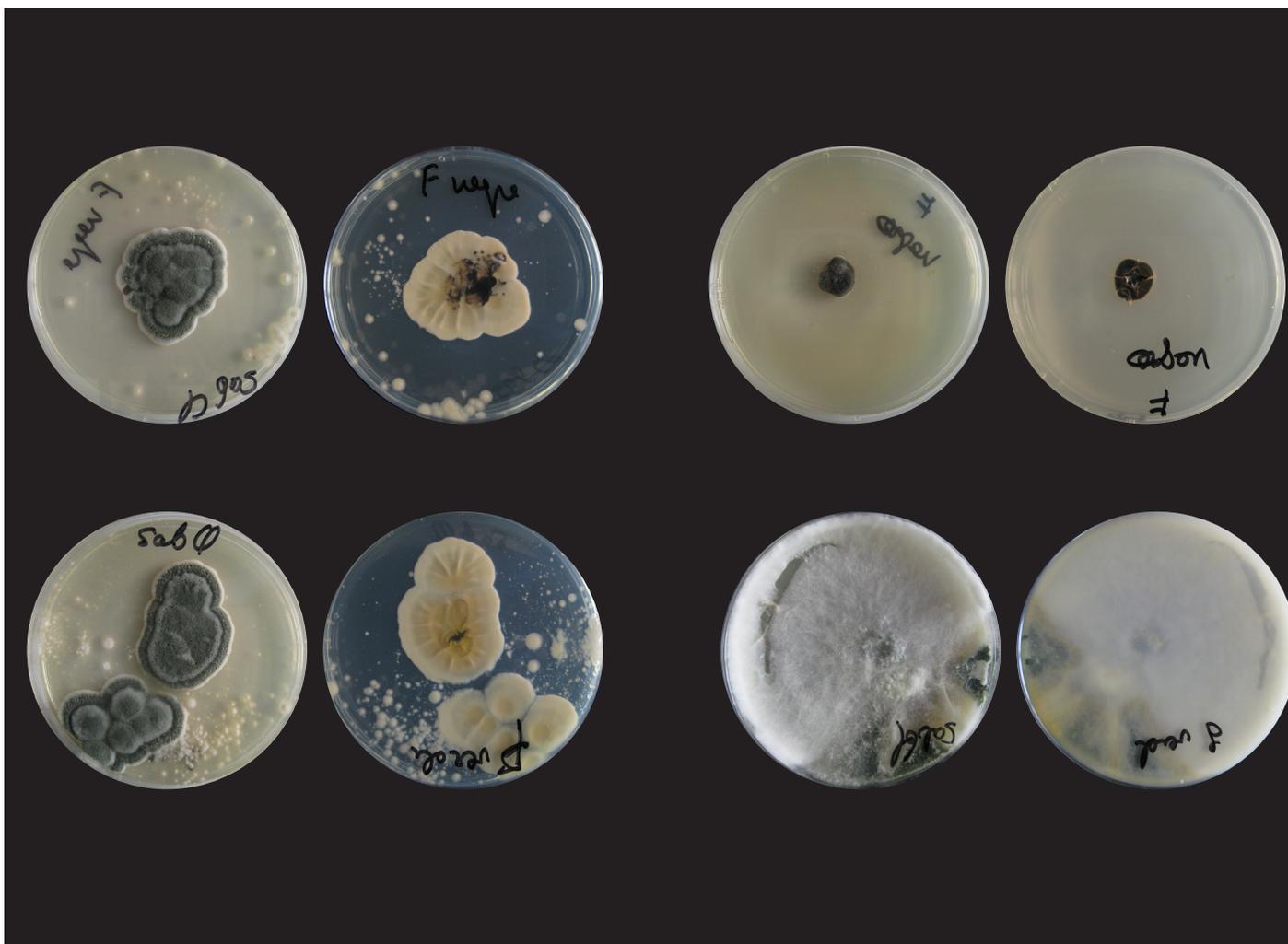
Bacterias aisladas de placas PC zona f



Sabouraud Detroxe Agar (SAB) para Hongos → F



Hongos aislados de placas SAB zona F



**MUESTREO
ZONA g,G**

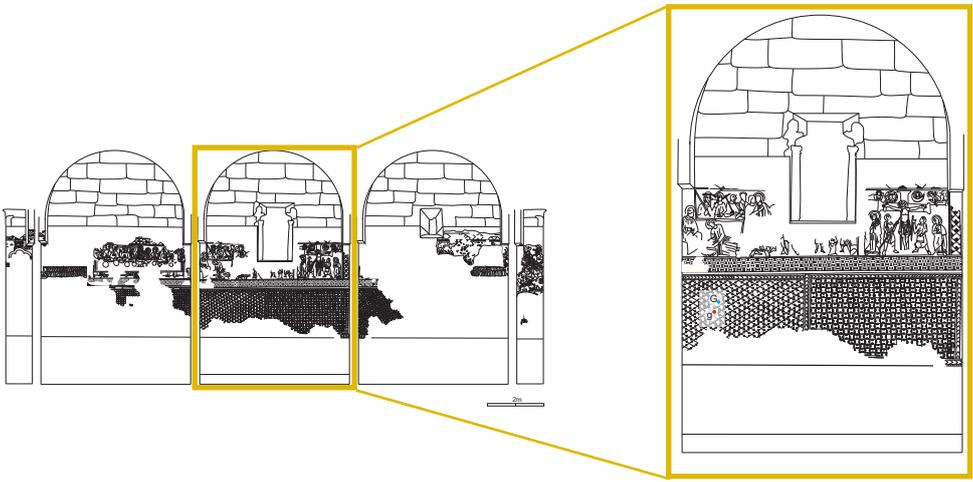
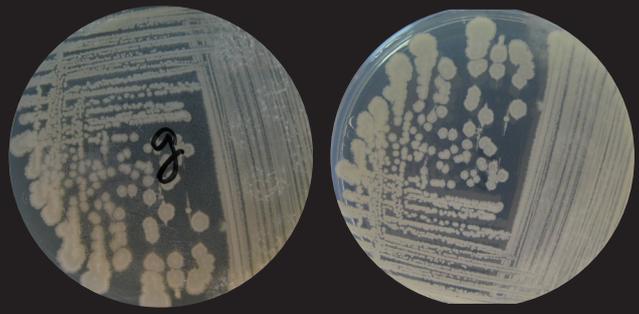
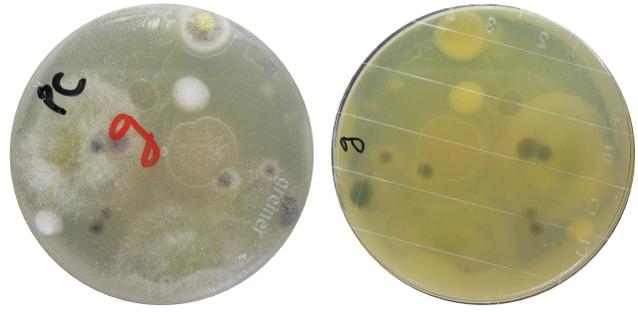
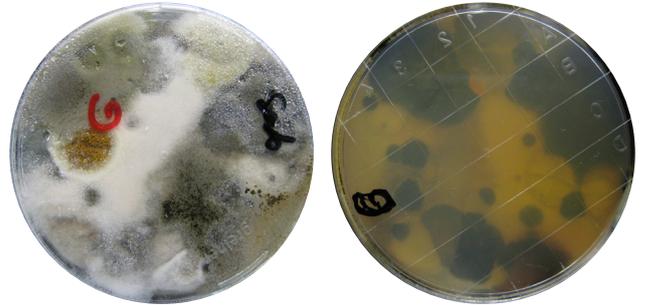


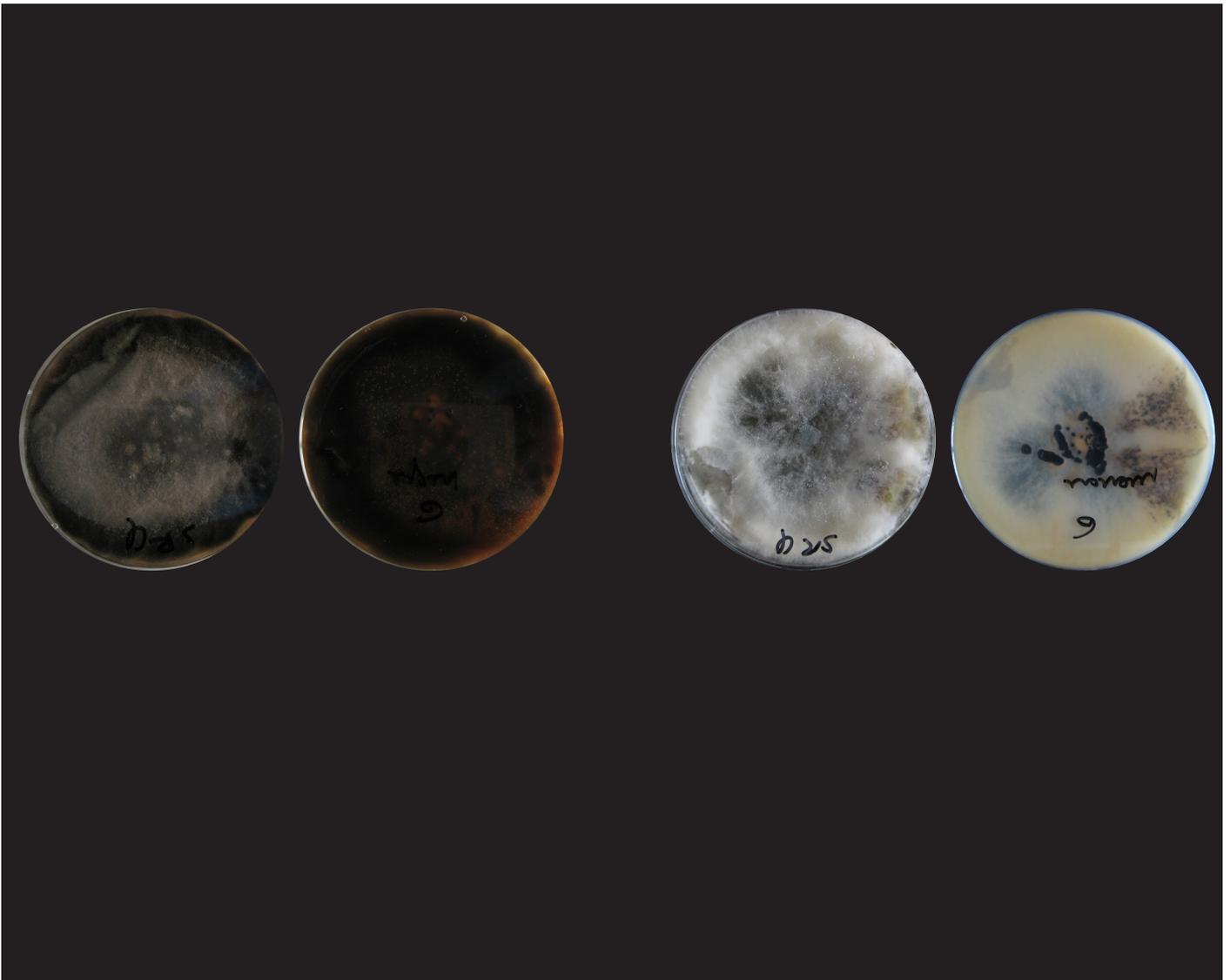
Plate Count Agar (PC) para bacterias → a



Sabouraud Detroxe Agar (SAB) para Hongos → A



Hongos aislados de placas SAB zona E



**MUESTREO
ZONA h,H**

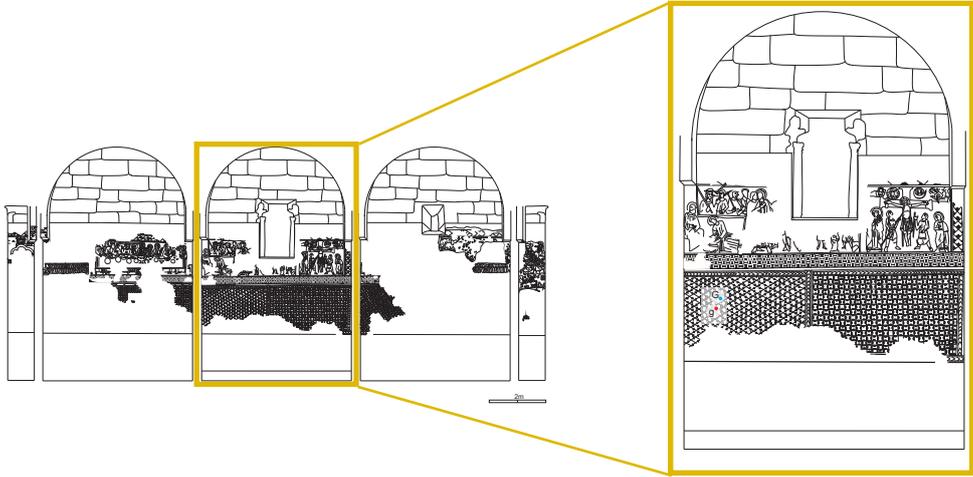
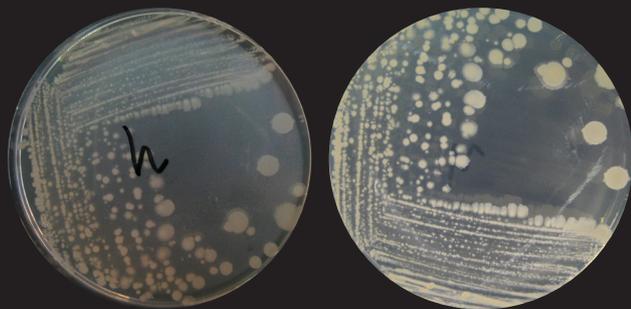
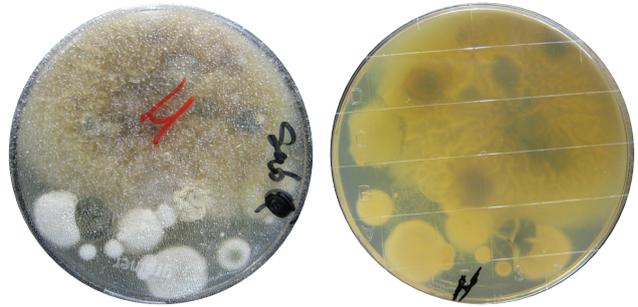


Plate Count Agar (PC) para bacterias

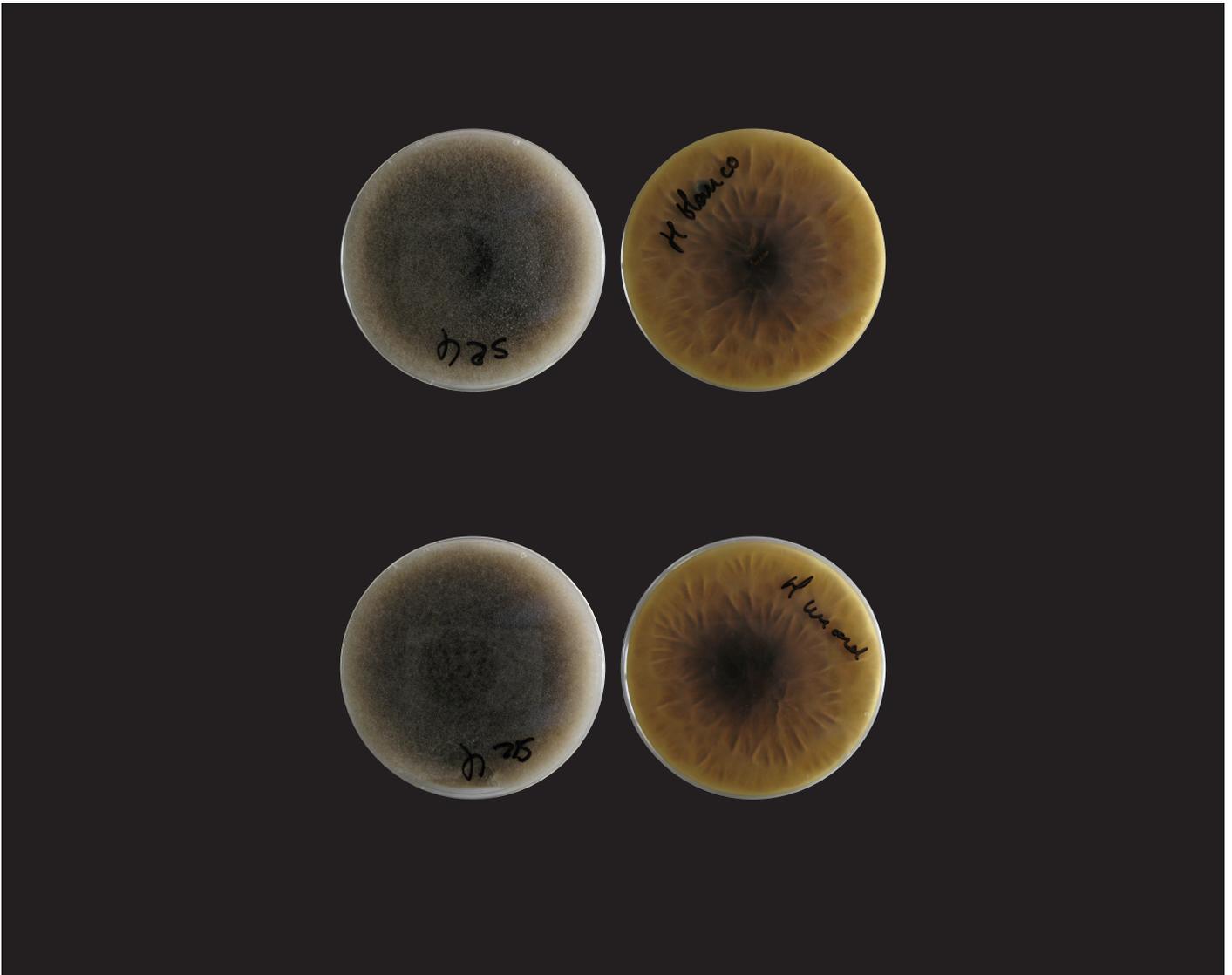
→ a



Sabouraud Detroxe Agar (SAB) para Hongos → E



Hongos aislados de placas SAB zona E



**MUESTREO
ZONA i,I**

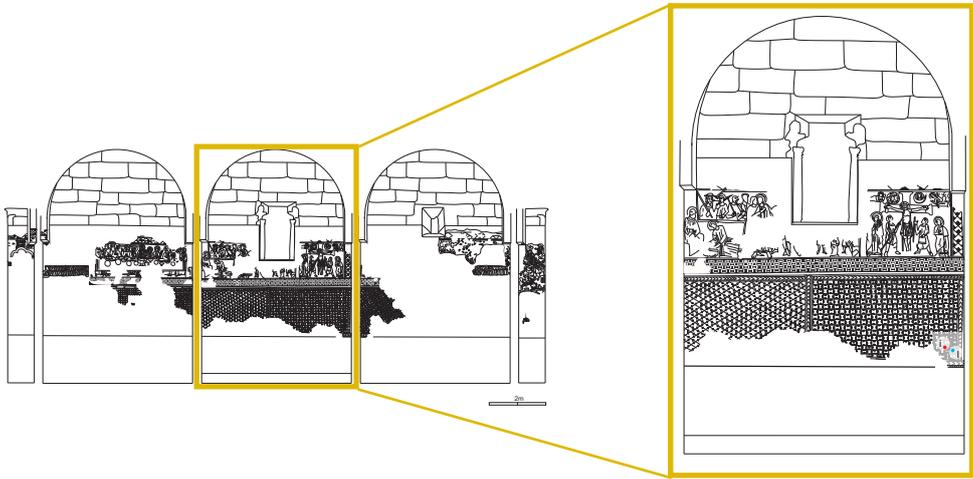
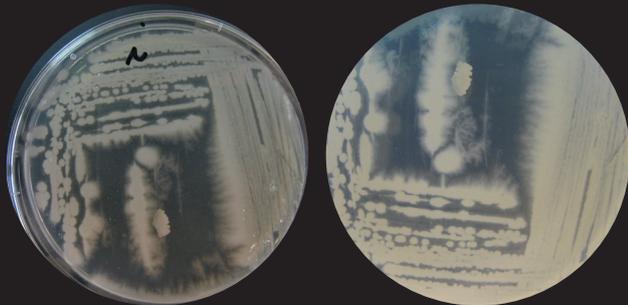
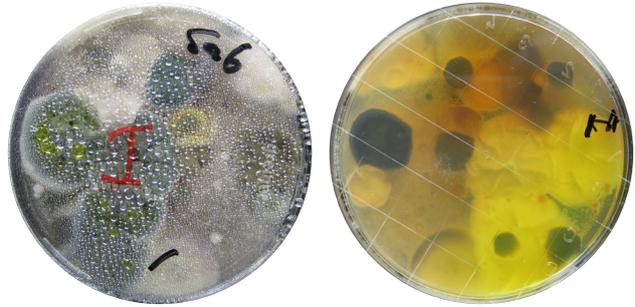


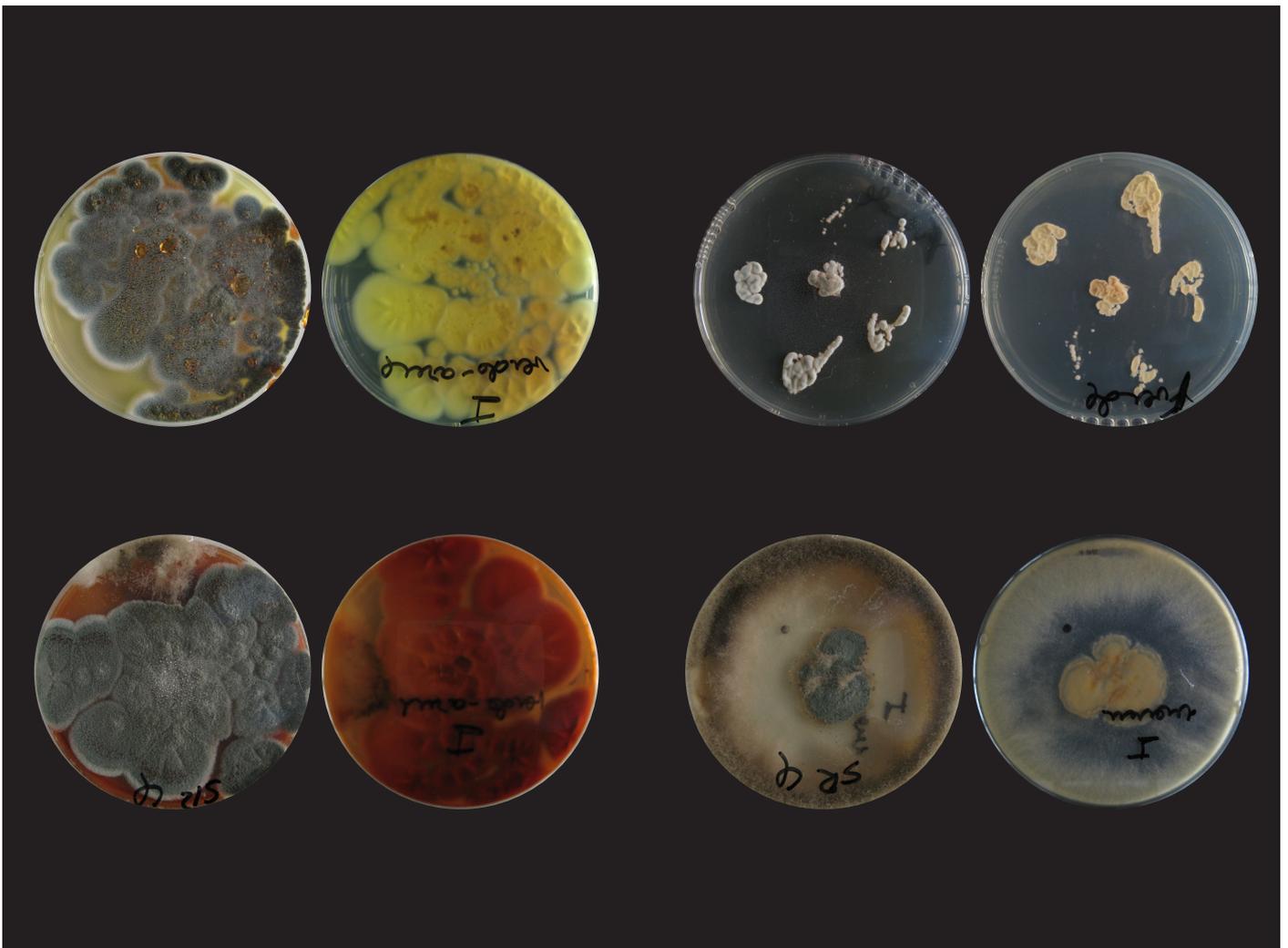
Plate Count Agar (PC) para bacterias → i



Sabouraud Detroxe Agar (SAB) para Hongos → I



Hongos aislados de placas SAB zona E



**MUESTREO
ZONA j,J**

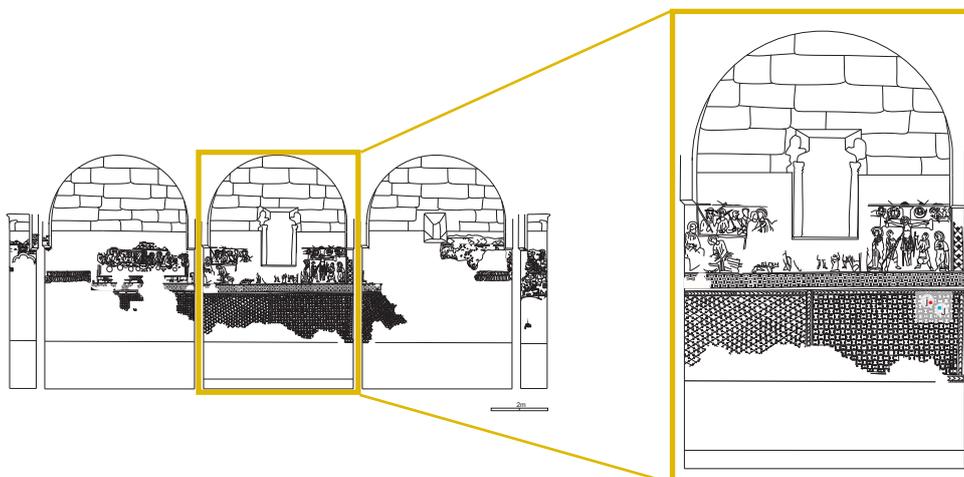
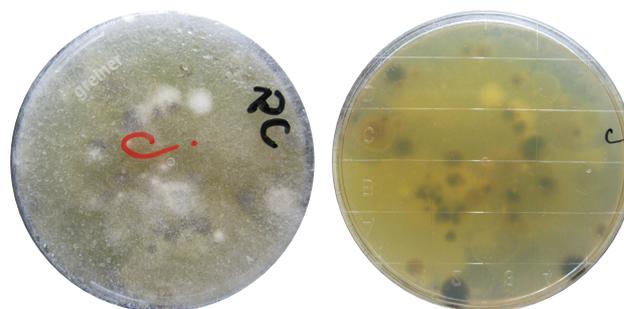
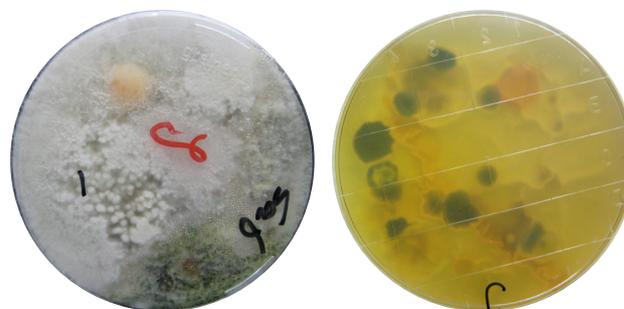


Plate Count Agar (PC) para bacterias → j



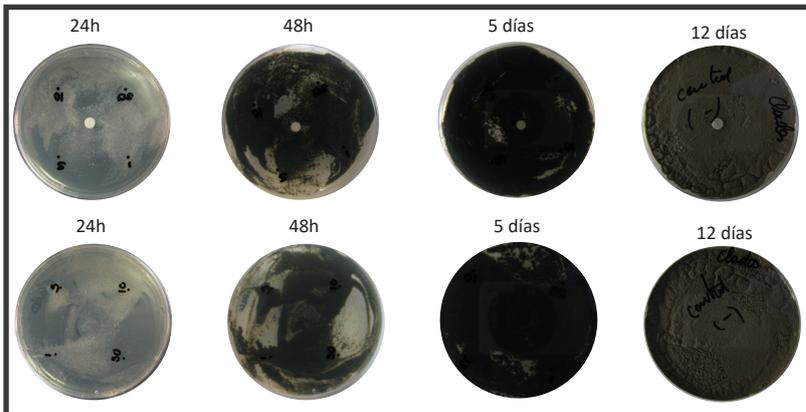
Sabouraud Detroxe Agar (SAB) para Hongos → J



ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

CLADOSPORIUM

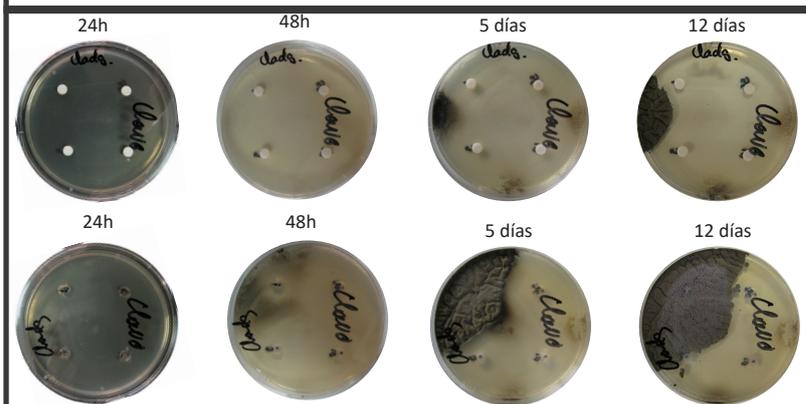
Control Negativo



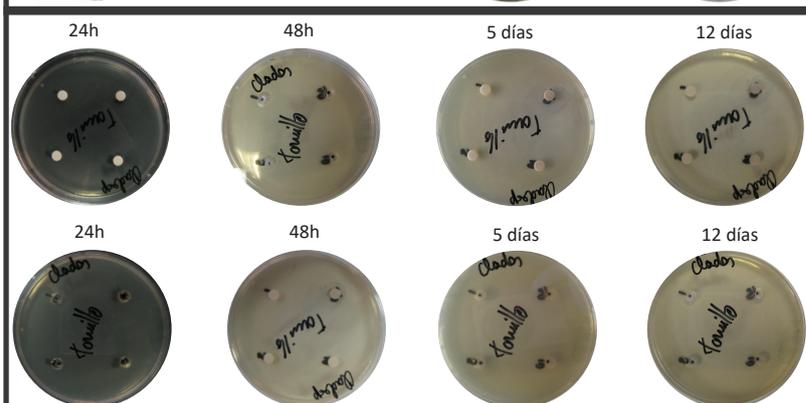
**Control Positivo
Cloruro de Benzalconio**



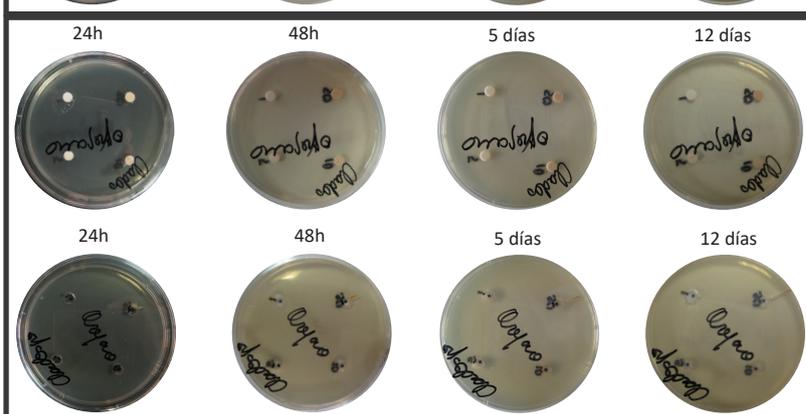
Aceite Esencial de CLAVO



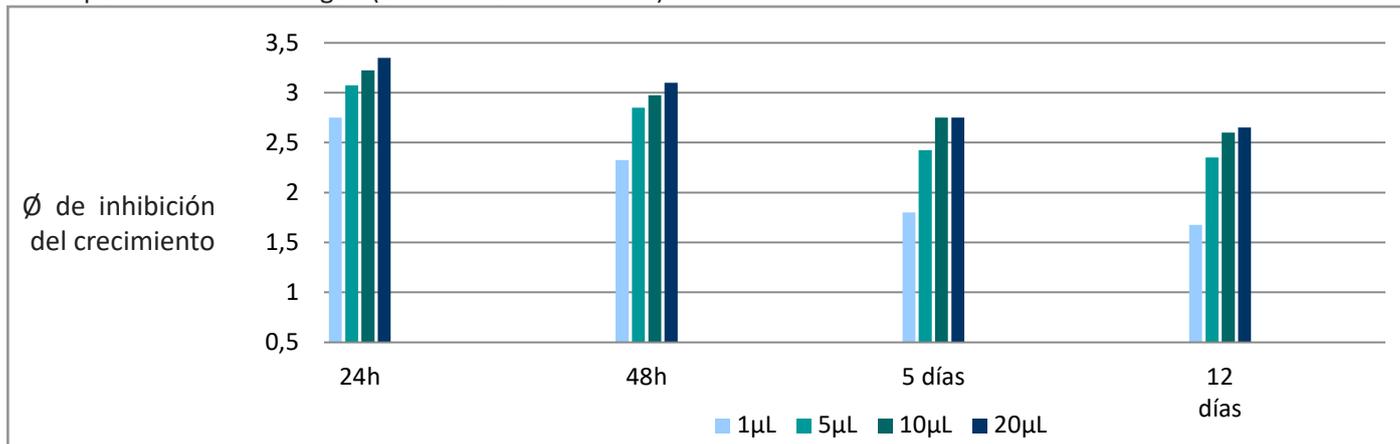
Aceite Esencial de TOMILLO



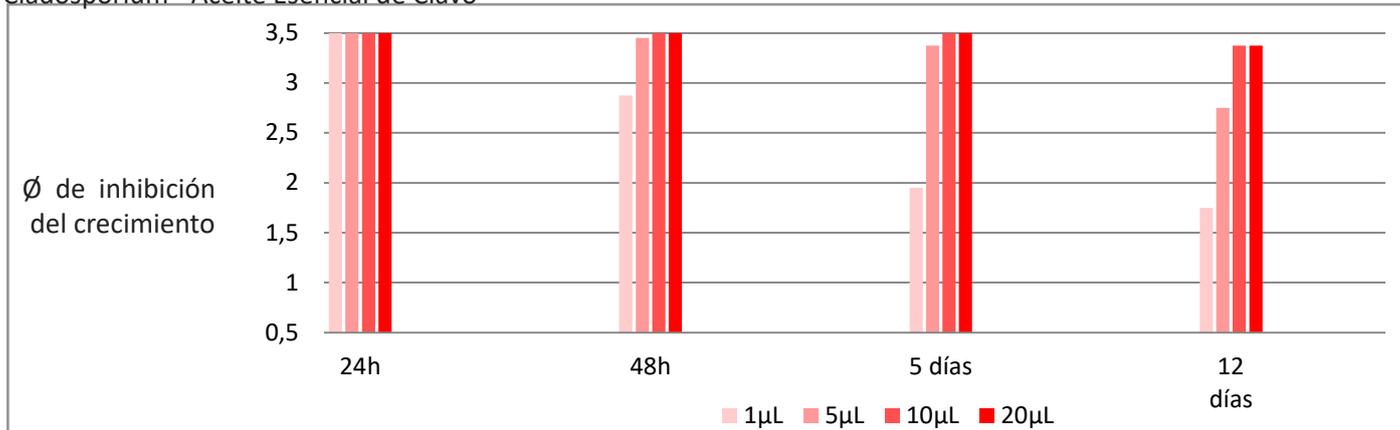
Aceite Esencial de ORÉGANO



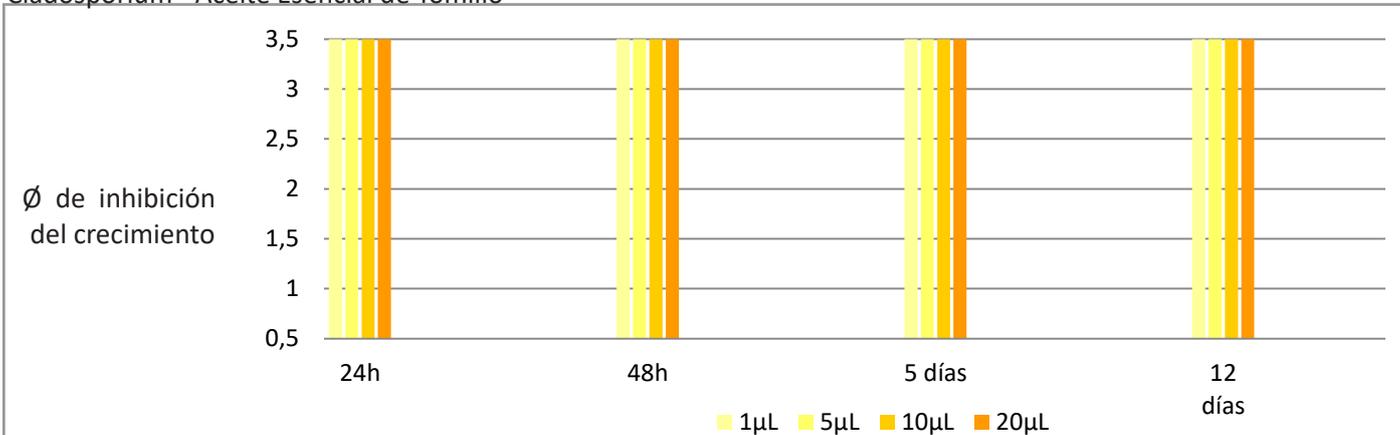
Cladosporium - neo[®]Desogen (Cloruro de Benzalconio)



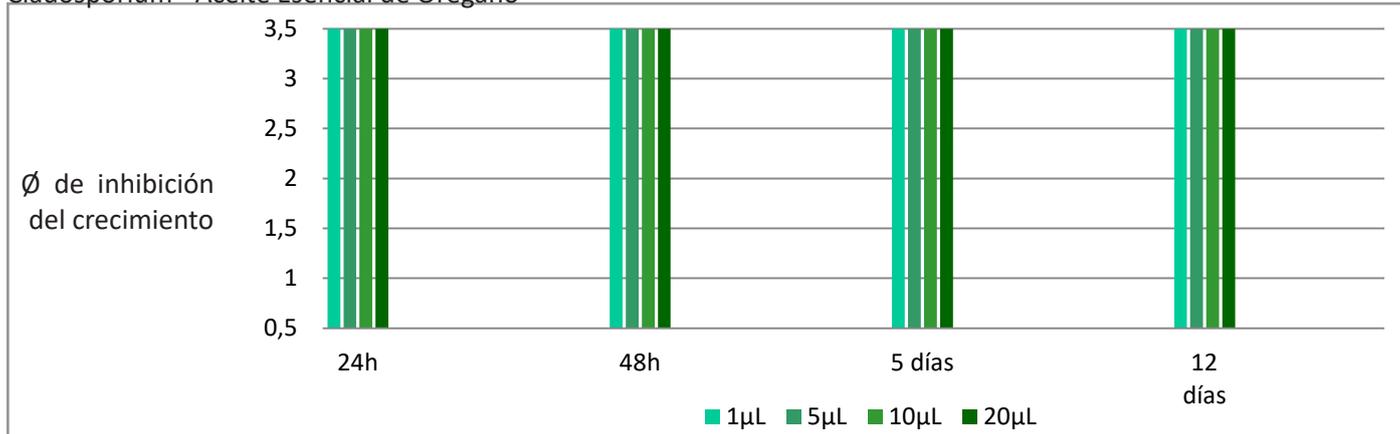
Cladosporium - Aceite Esencial de Clavo



Cladosporium - Aceite Esencial de Tomillo

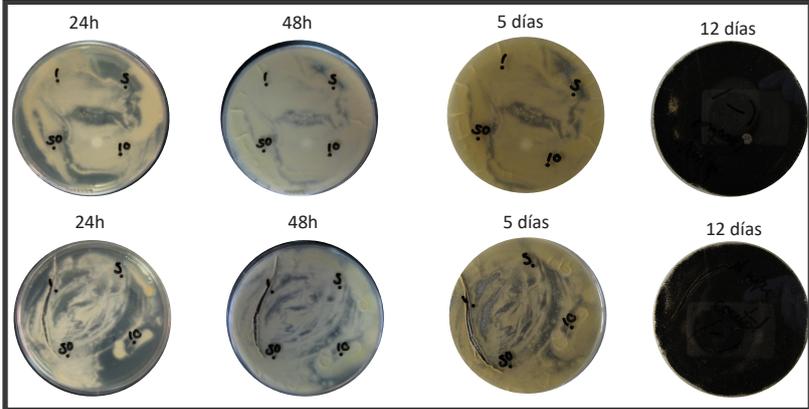


Cladosporium - Aceite Esencial de Orégano

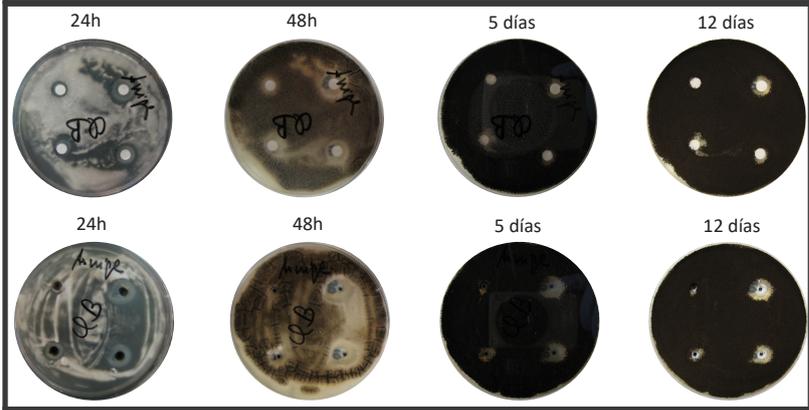


**ASPERGILLUS
NIGER**

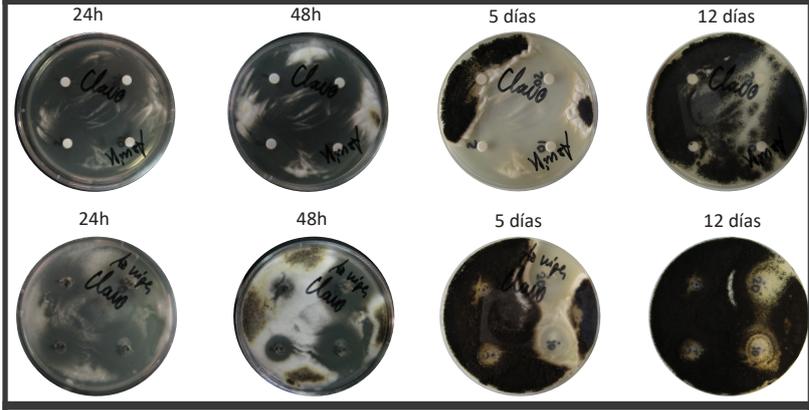
Control Negativo



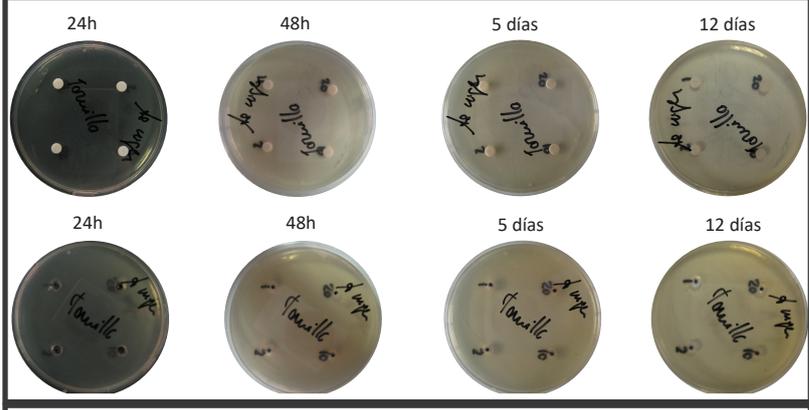
**Control Positivo
Cloruro de Benzalconio**



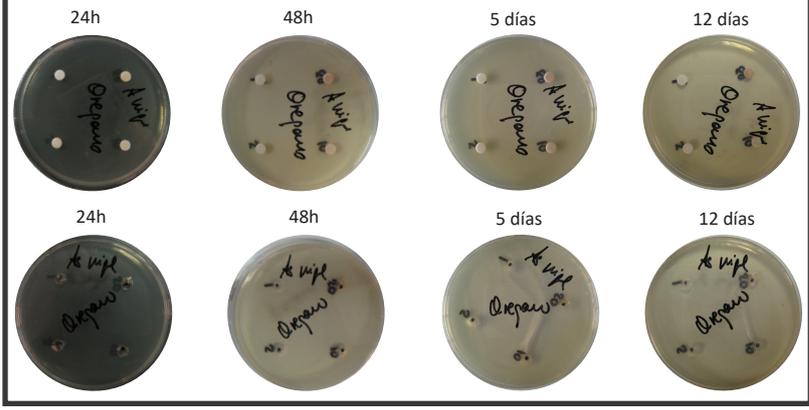
Aceite Esencial de CLAVO



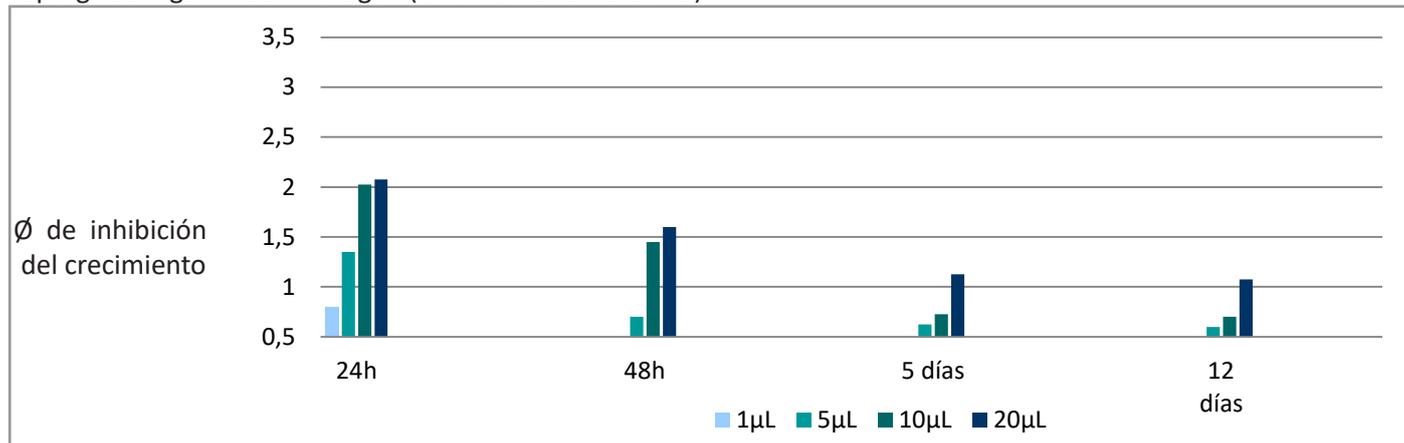
Aceite Esencial de TOMILLO



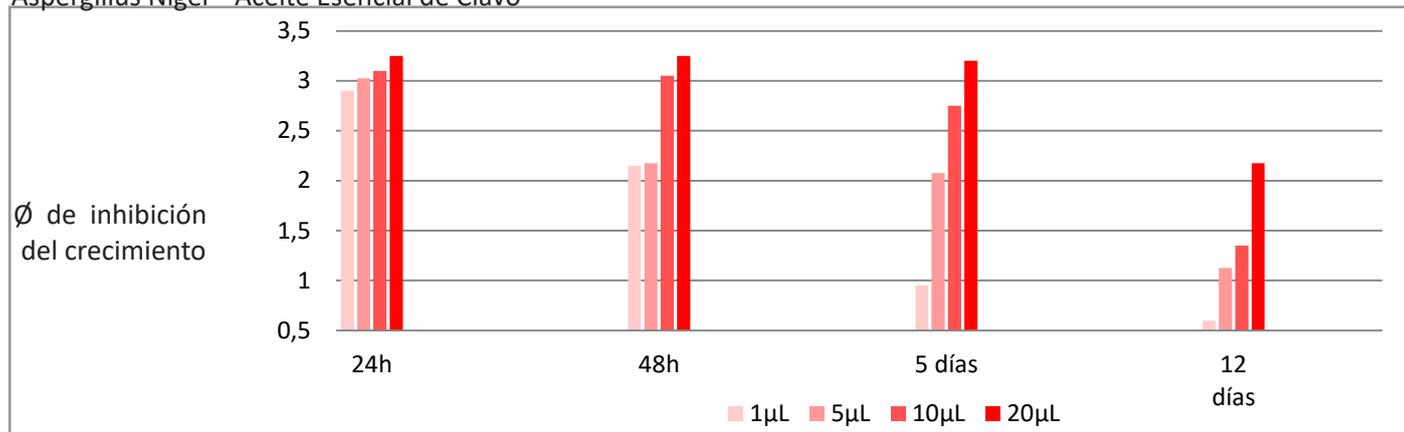
Aceite Esencial de ORÉGANO



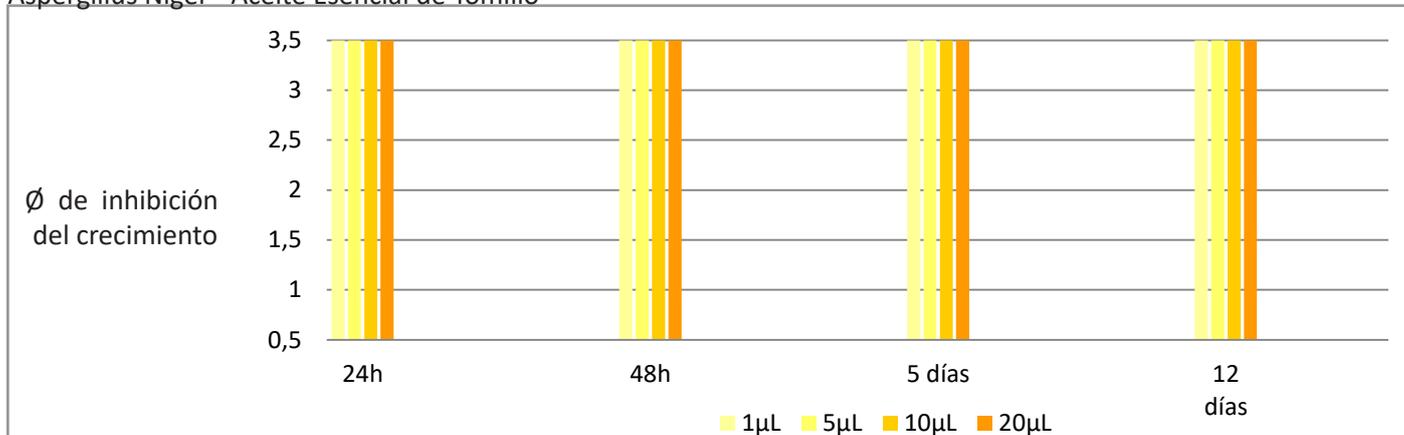
Aspergillus Niger - neo[®]Desogen (Cloruro de Benzalconio)



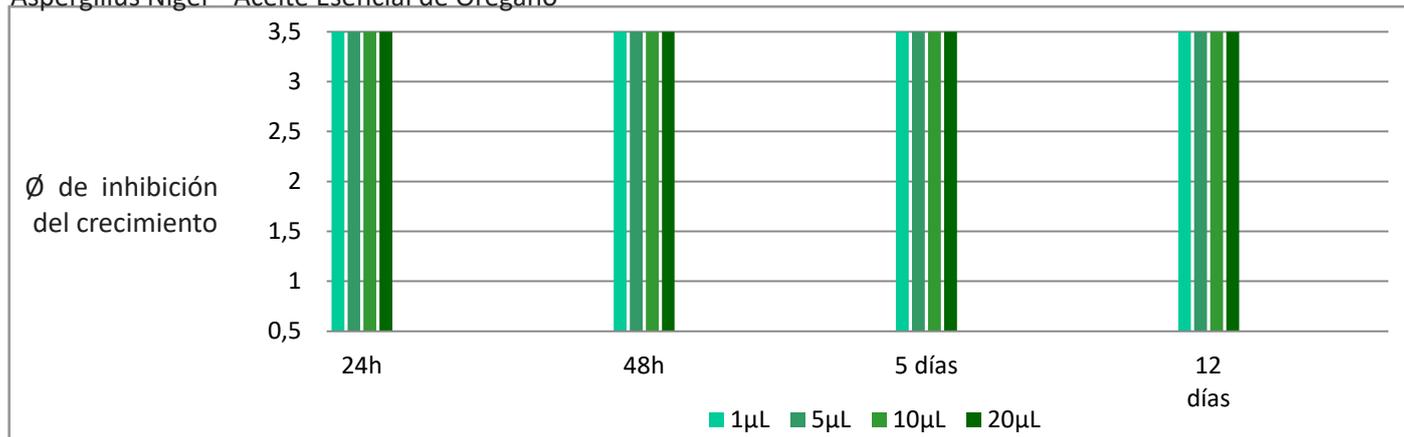
Aspergillus Niger - Aceite Esencial de Clavo



Aspergillus Niger - Aceite Esencial de Tomillo

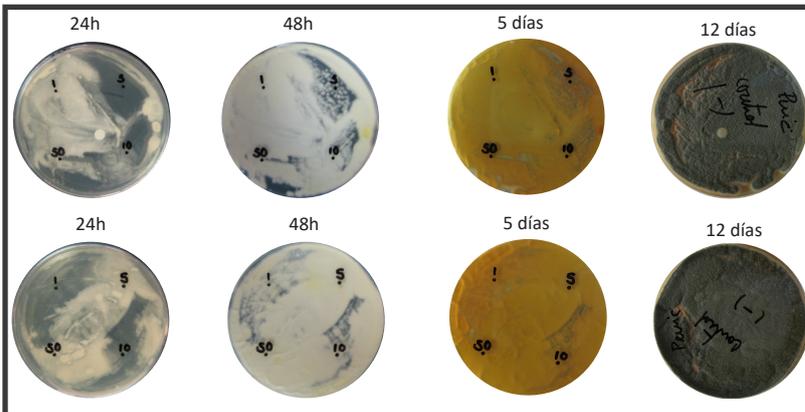


Aspergillus Niger - Aceite Esencial de Orégano



PENICILLIUM

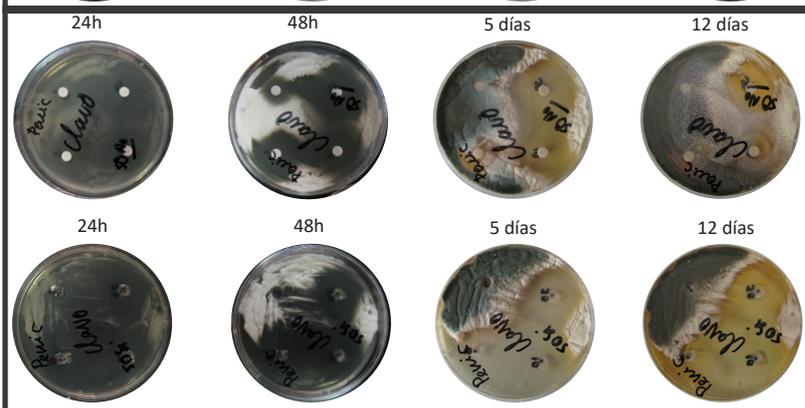
Control Negativo



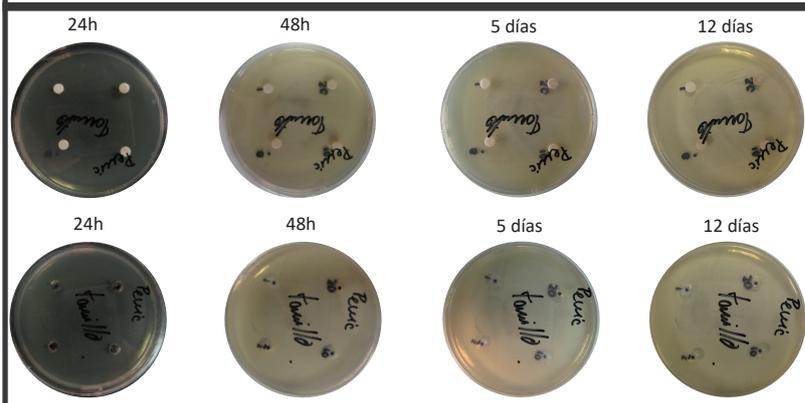
**Control Positivo
Cloruro de Benzalconio**



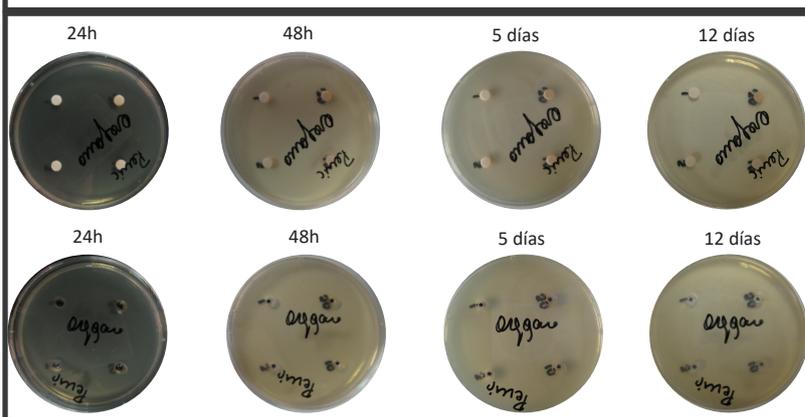
Aceite Esencial de CLAVO



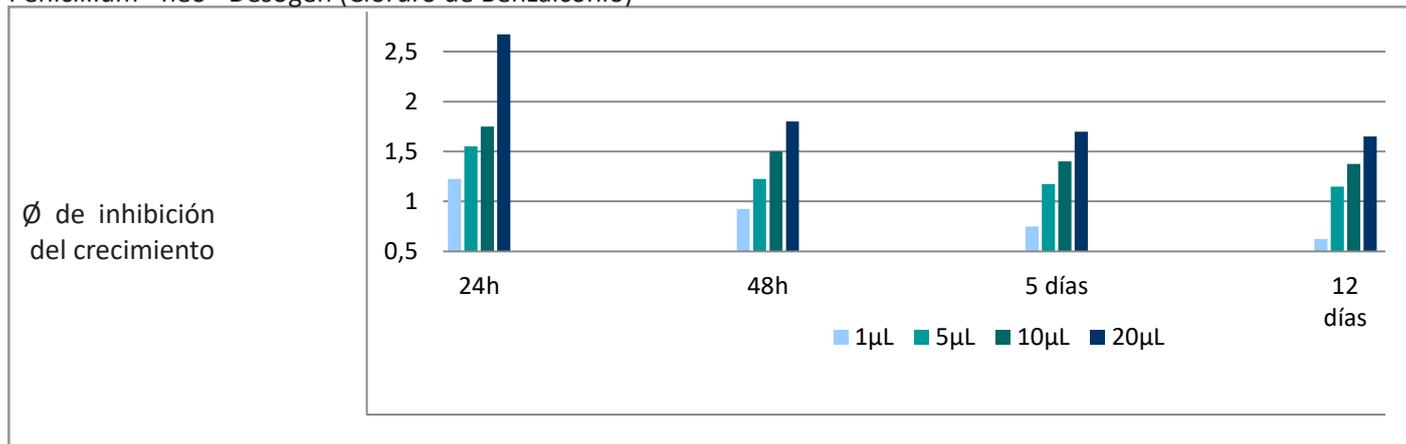
Aceite Esencial de TOMILLO



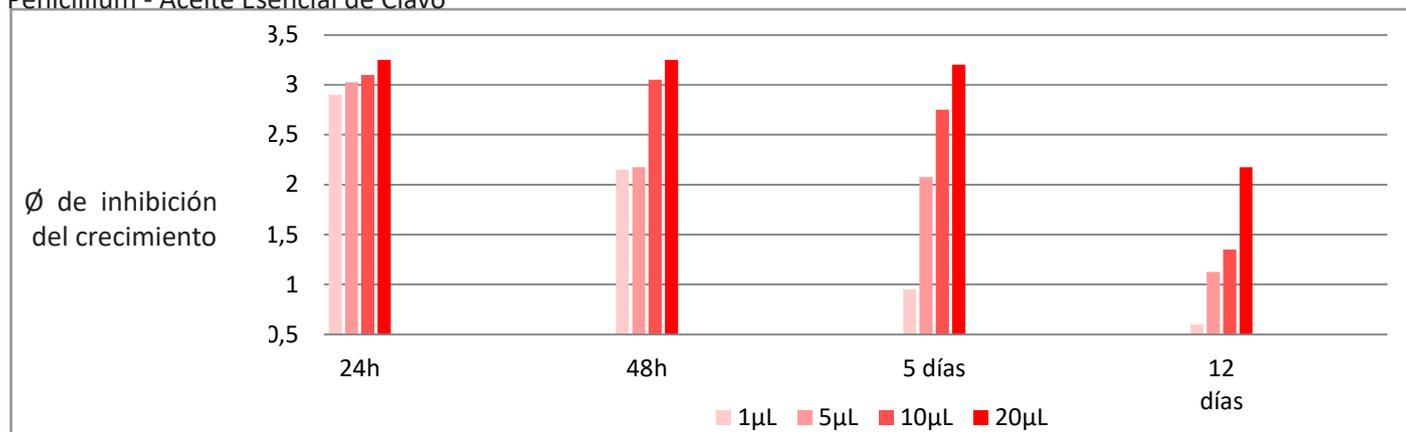
Aceite Esencial de ORÉGANO



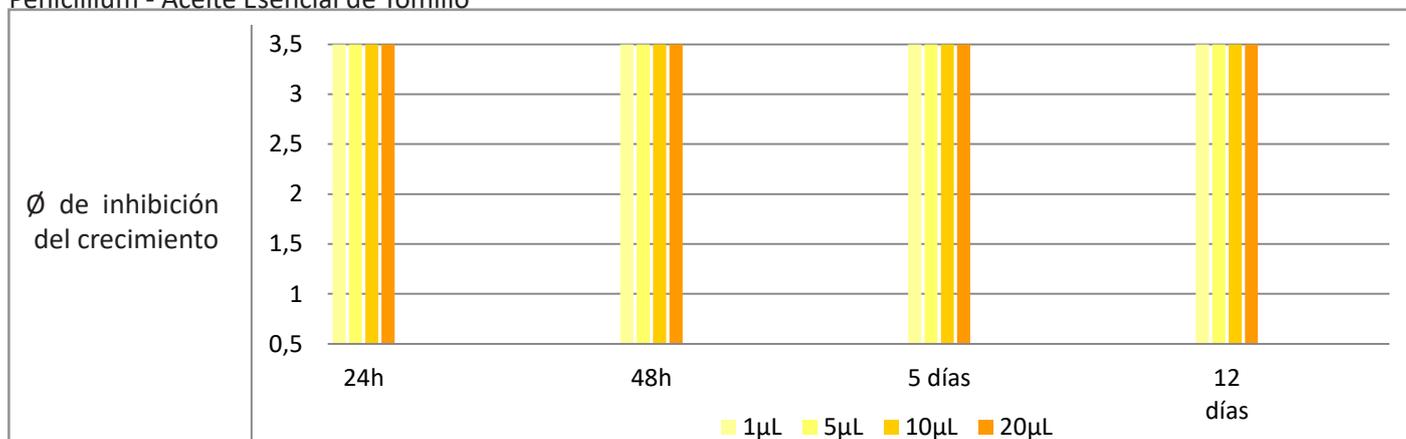
Penicillium - neo® Desogen (Cloruro de Benzalconio)



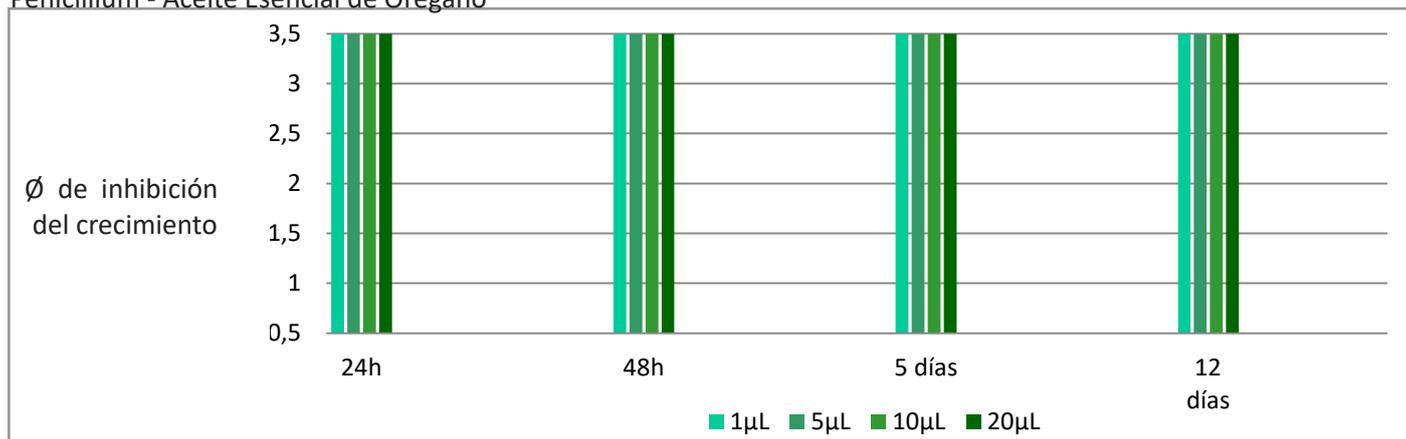
Penicillium - Aceite Esencial de Clavo



Penicillium - Aceite Esencial de Tomillo

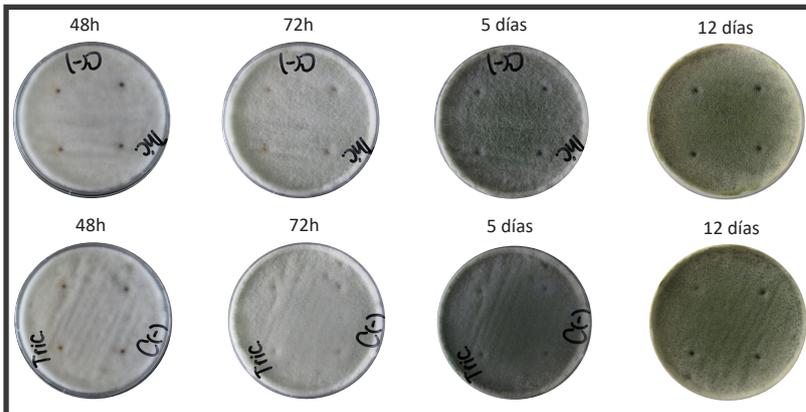


Penicillium - Aceite Esencial de Orégano

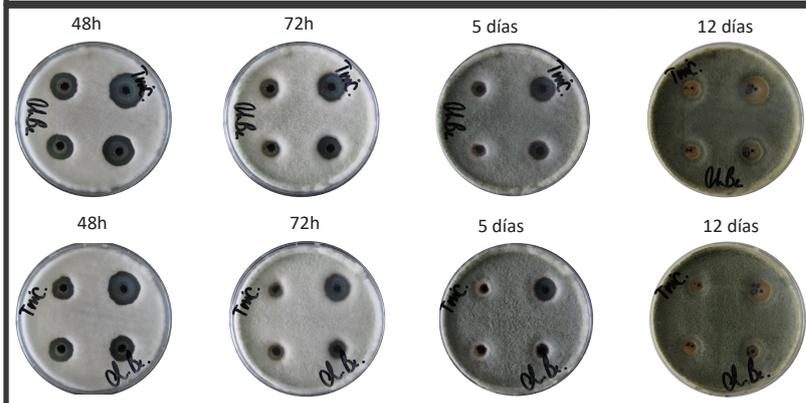


TRICHODERMA

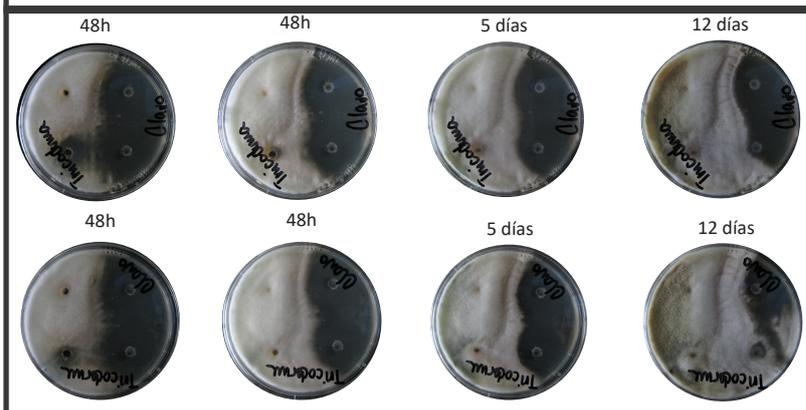
Control Negativo



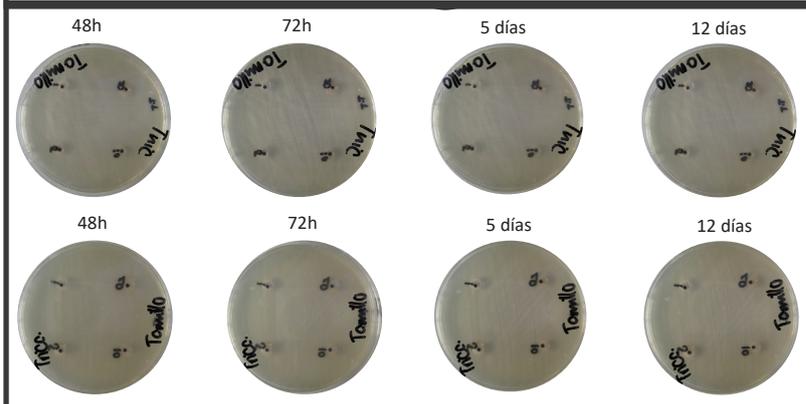
**Control Positivo
Cloruro de Benzalconio**



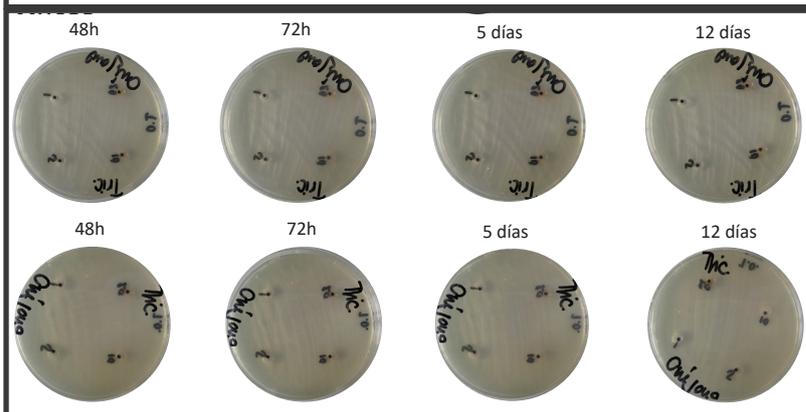
Aceite Esencial de CLAVO



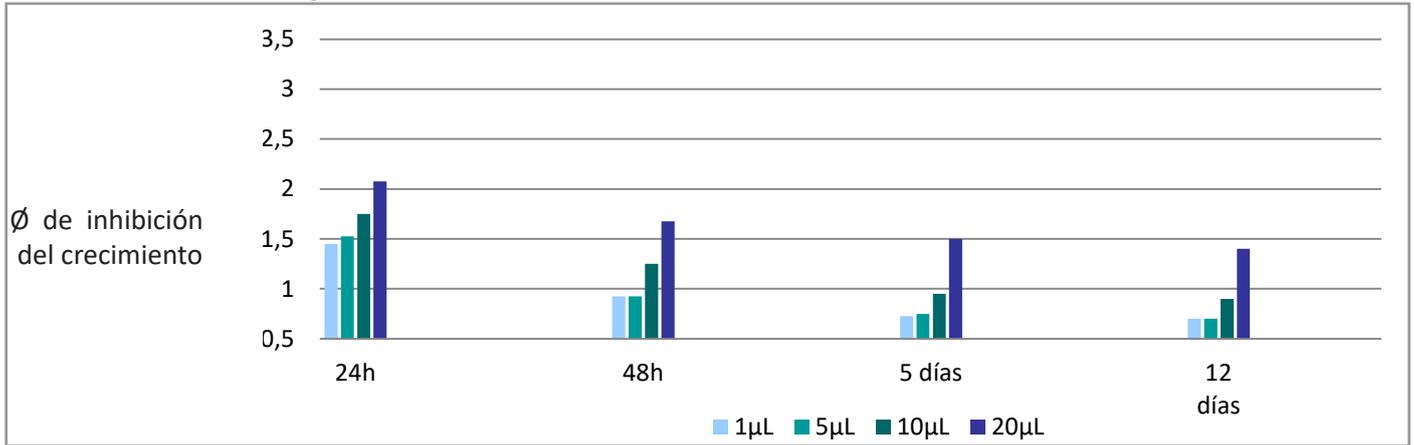
Aceite Esencial de TOMILLO



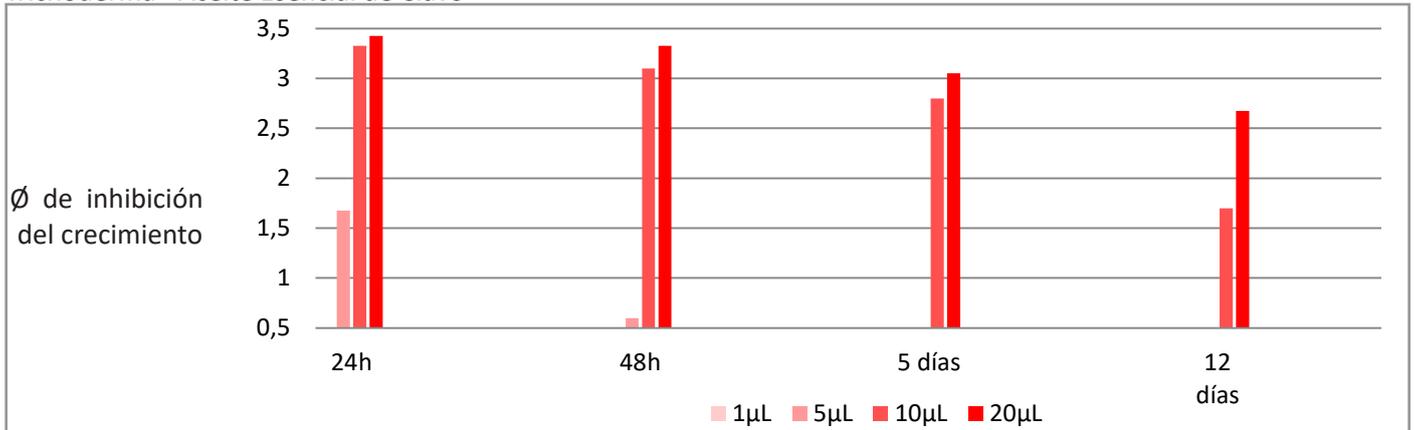
Aceite Esencial de ORÉGANO



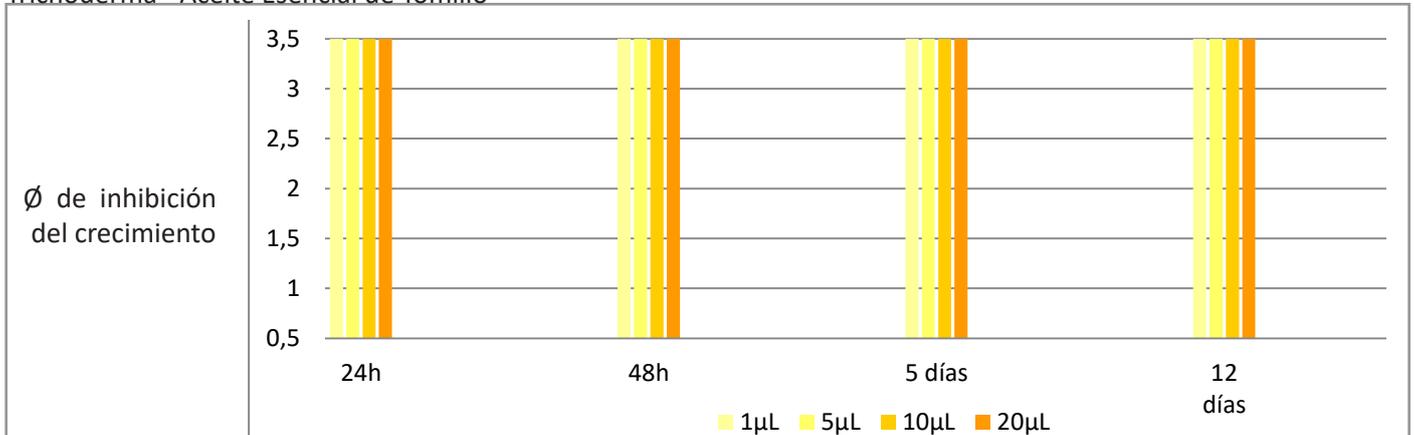
Trichoderma - neo®Desogen (Cloruro de Benzalconio)



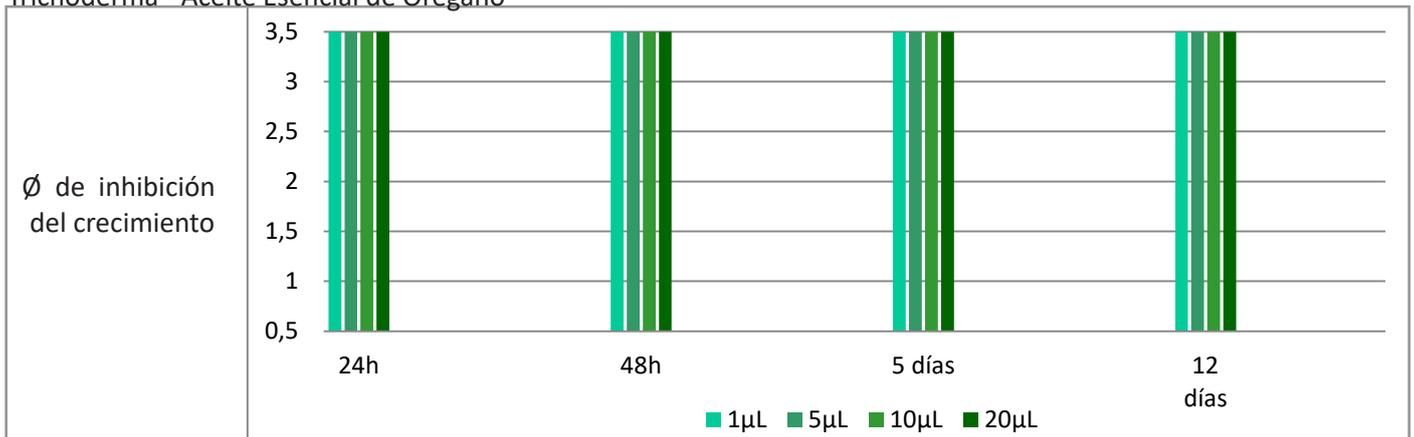
Trichoderma - Aceite Esencial de Clavo



Trichoderma - Aceite Esencial de Tomillo

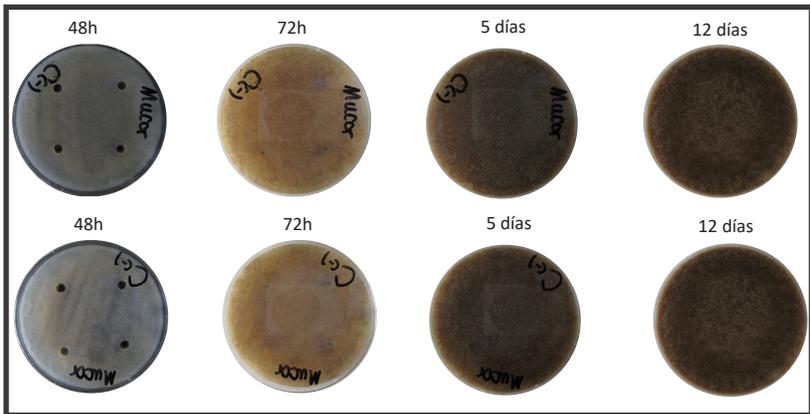


Trichoderma - Aceite Esencial de Orégano

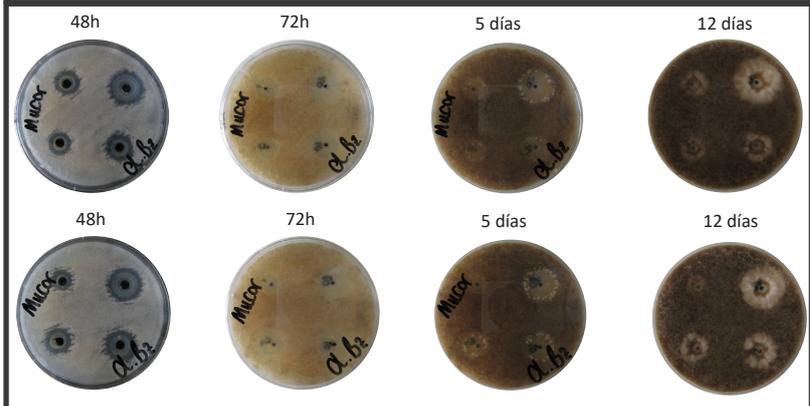


ABSIDIA

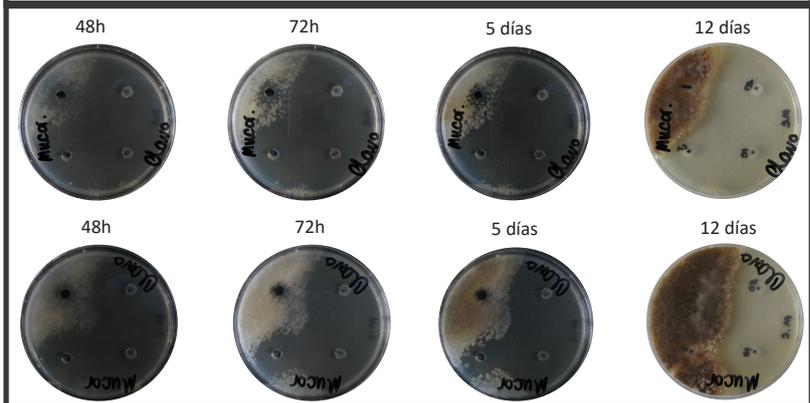
Control Negativo



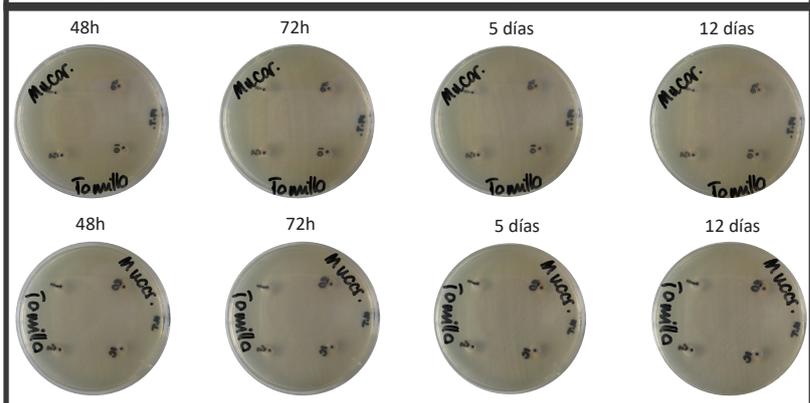
Control Positivo
Cloruro de Benzalconio



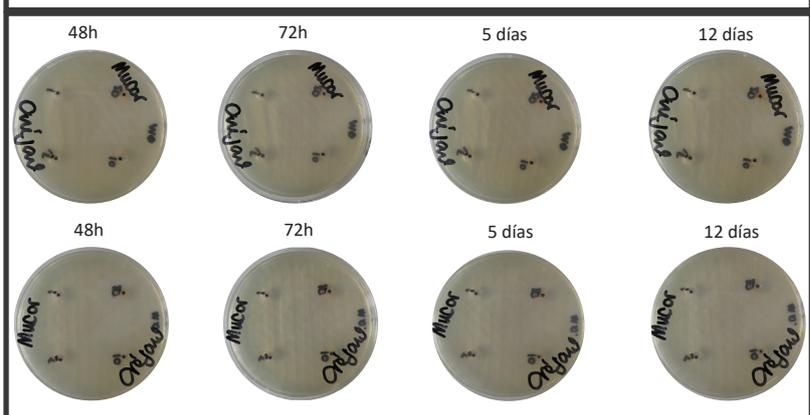
Aceite Esencial de CLAVO



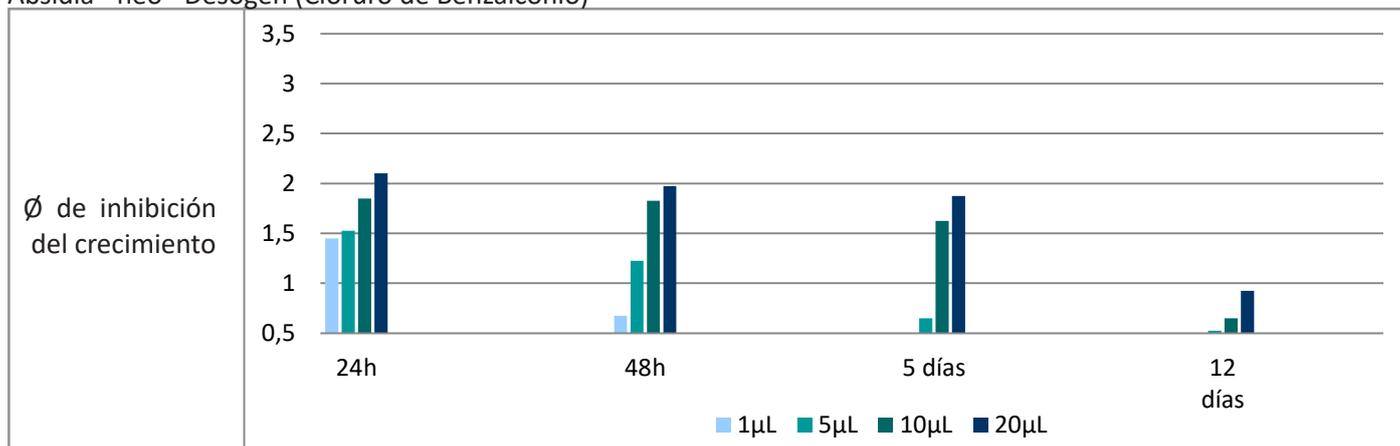
Aceite Esencial de TOMILLO



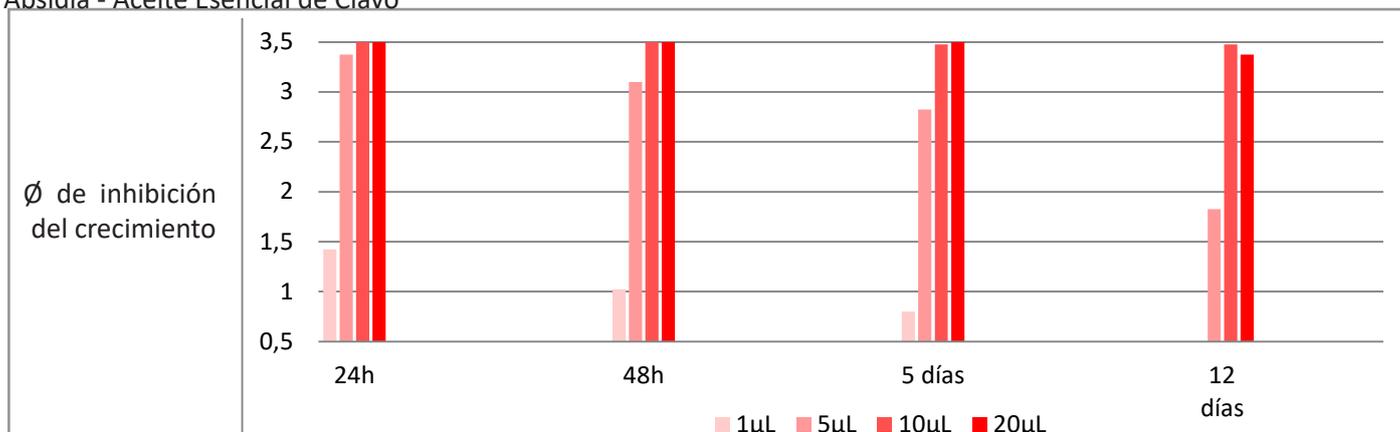
Aceite Esencial de ORÉGANO



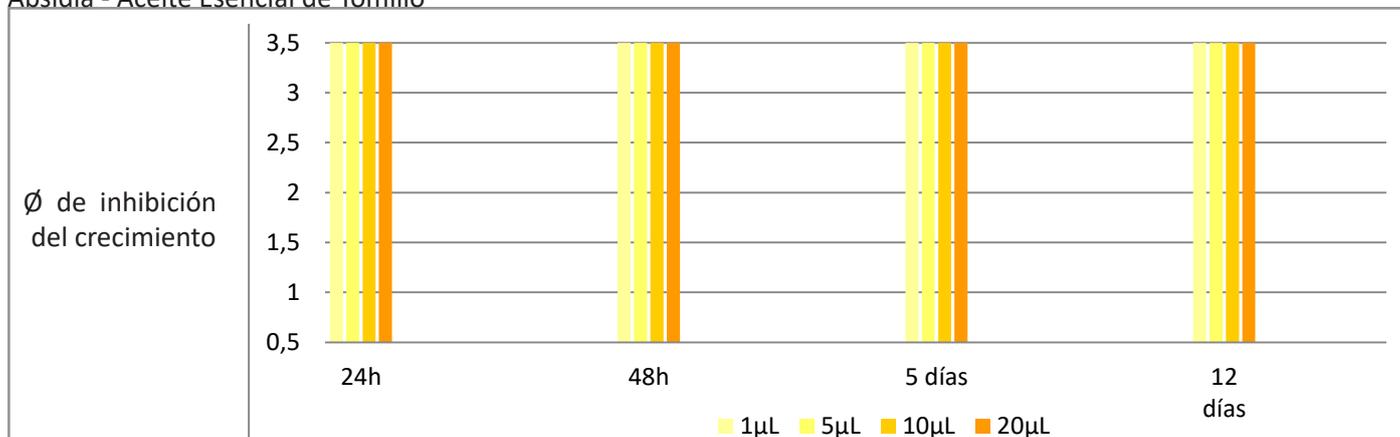
Absidia - neo[®]Desogen (Cloruro de Benzalconio)



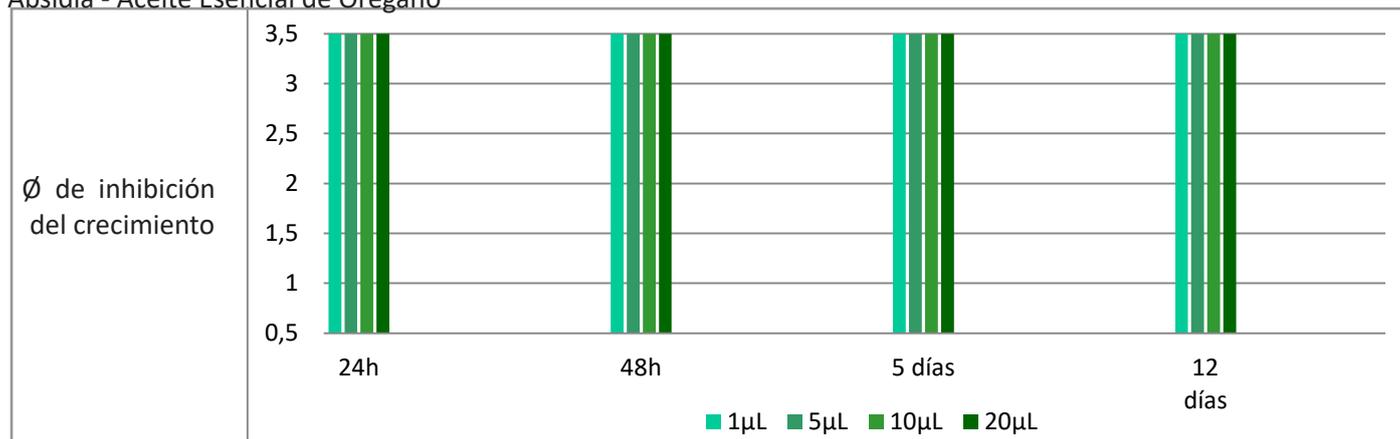
Absidia - Aceite Esencial de Clavo



Absidia - Aceite Esencial de Tomillo

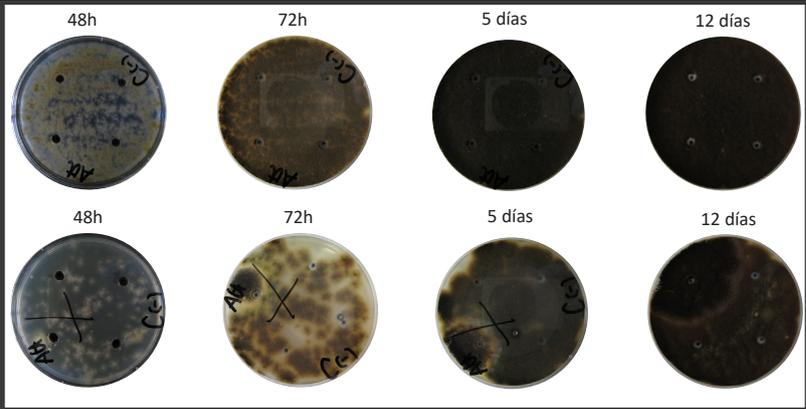


Absidia - Aceite Esencial de Orégano

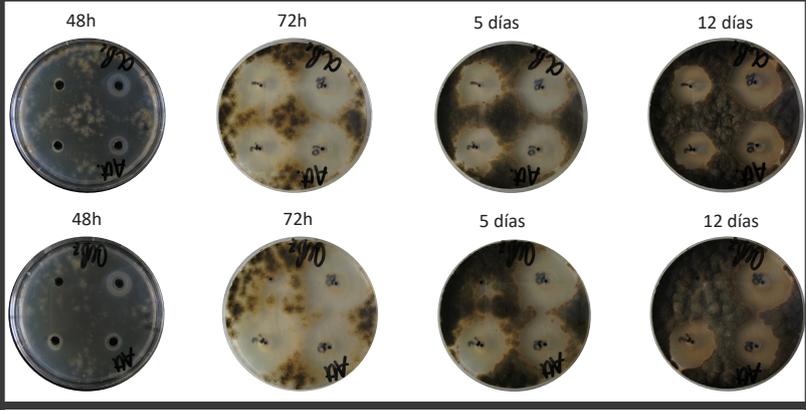


ALTERNARIA

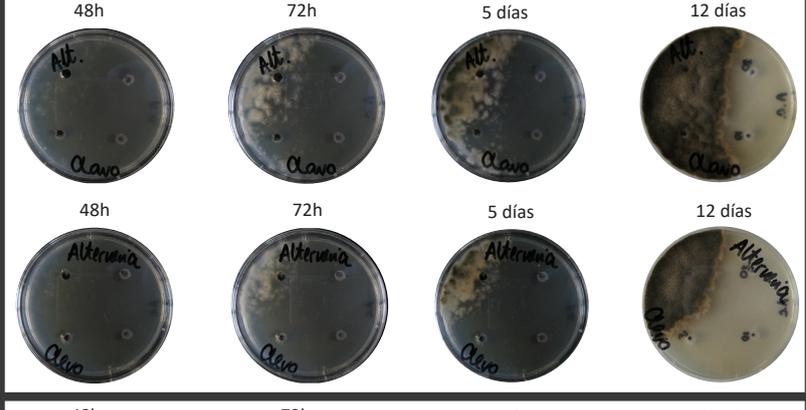
Control Negativo



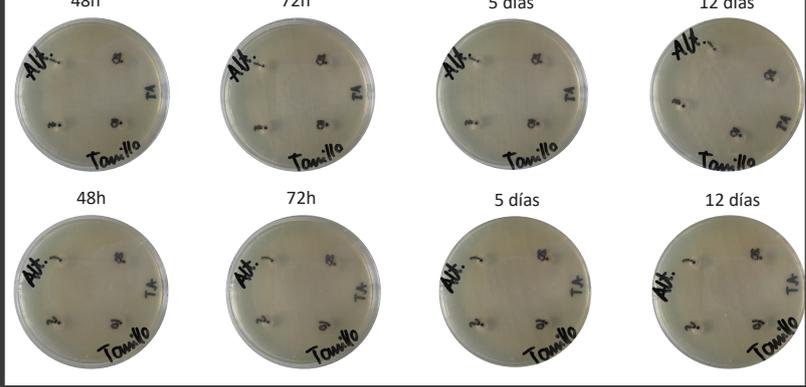
**Control Positivo
Cloruro de Benzalconio**



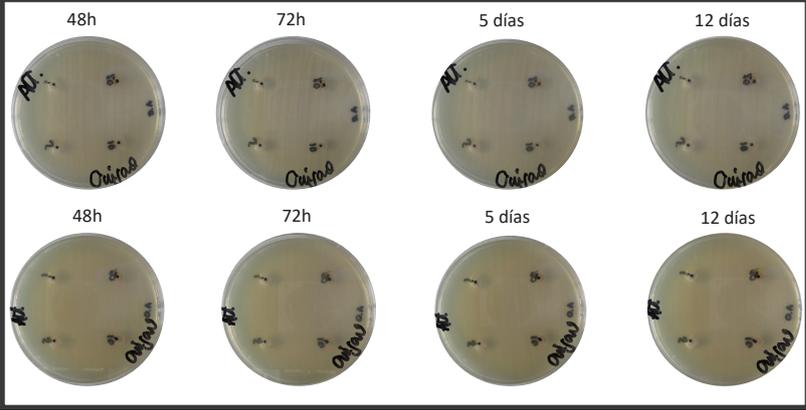
Aceite Esencial de CLAVO



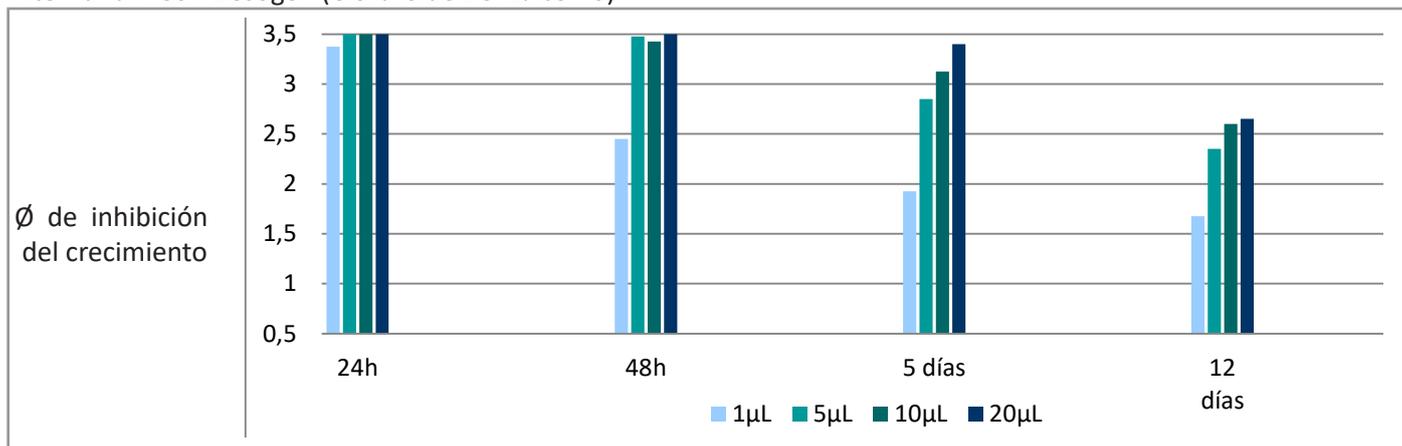
Aceite Esencial de TOMILLO



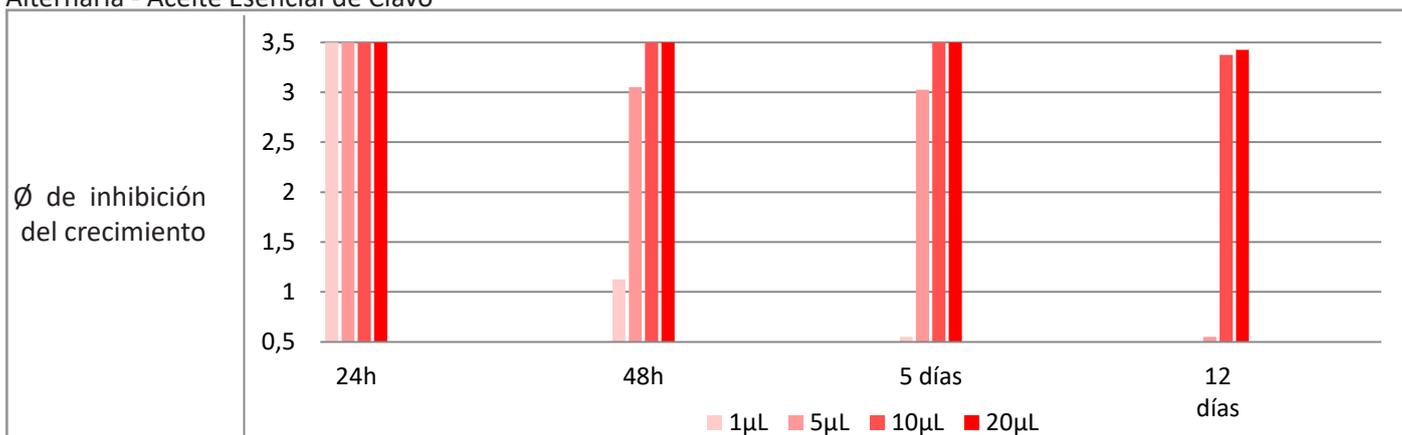
Aceite Esencial de ORÉGANO



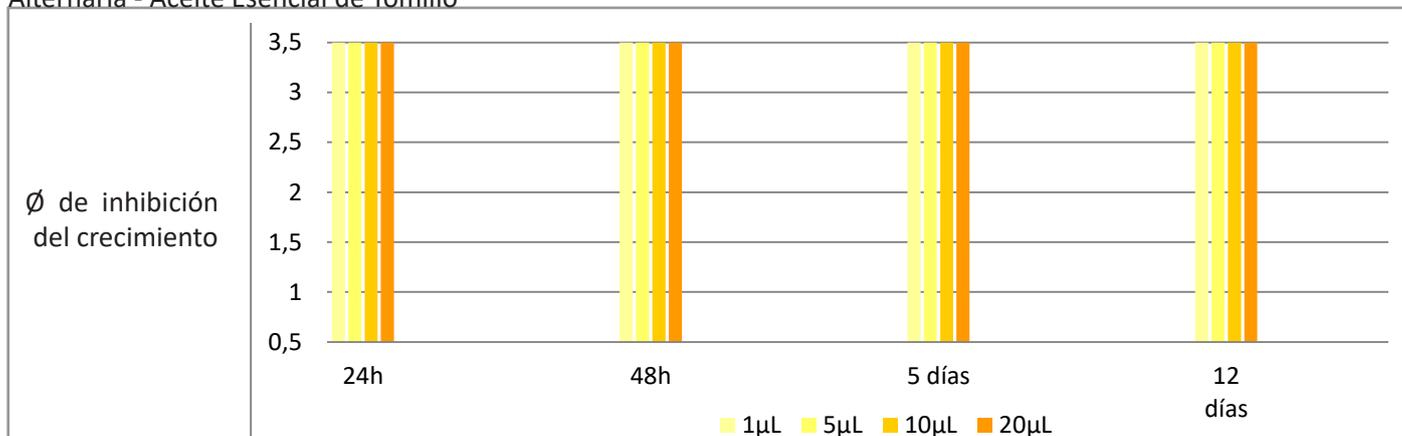
Alternaria- neo[®] Desogen (Cloruro de Benzalconio)



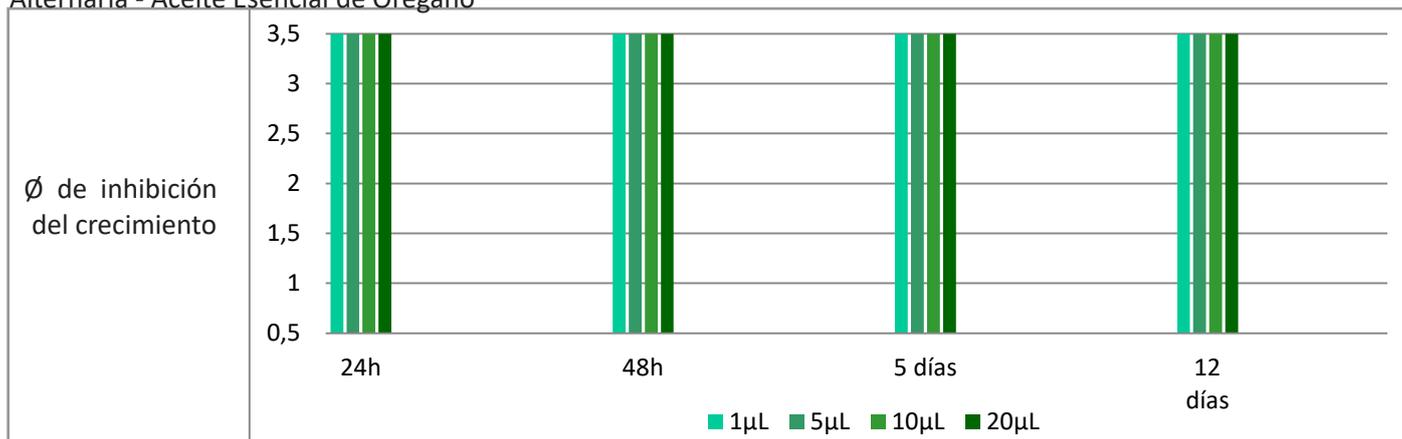
Alternaria - Aceite Esencial de Clavo



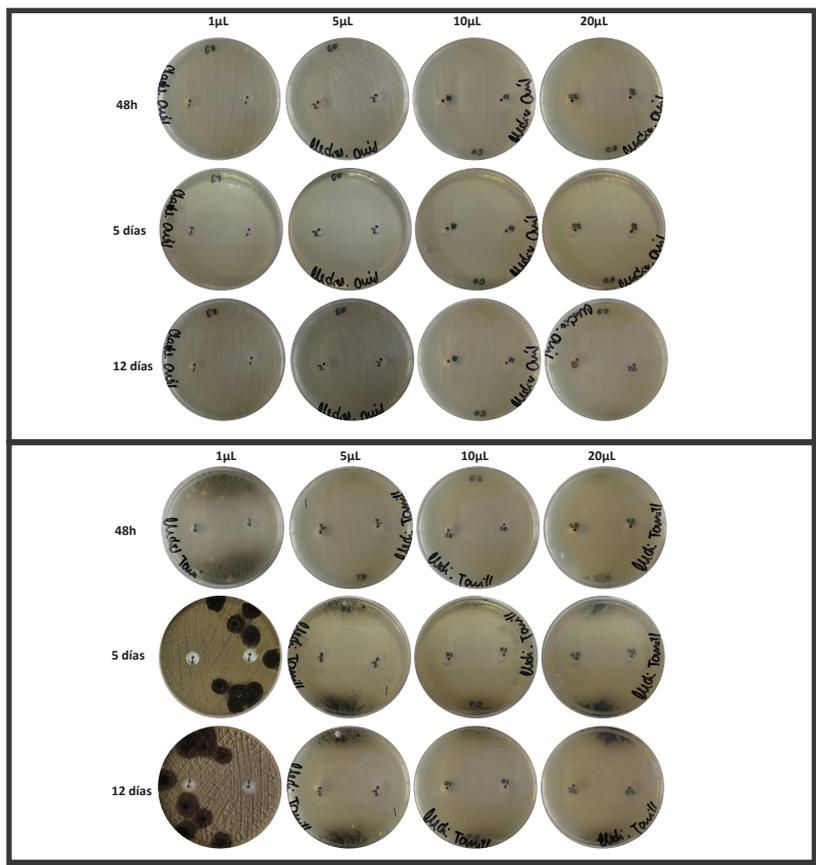
Alternaria - Aceite Esencial de Tomillo



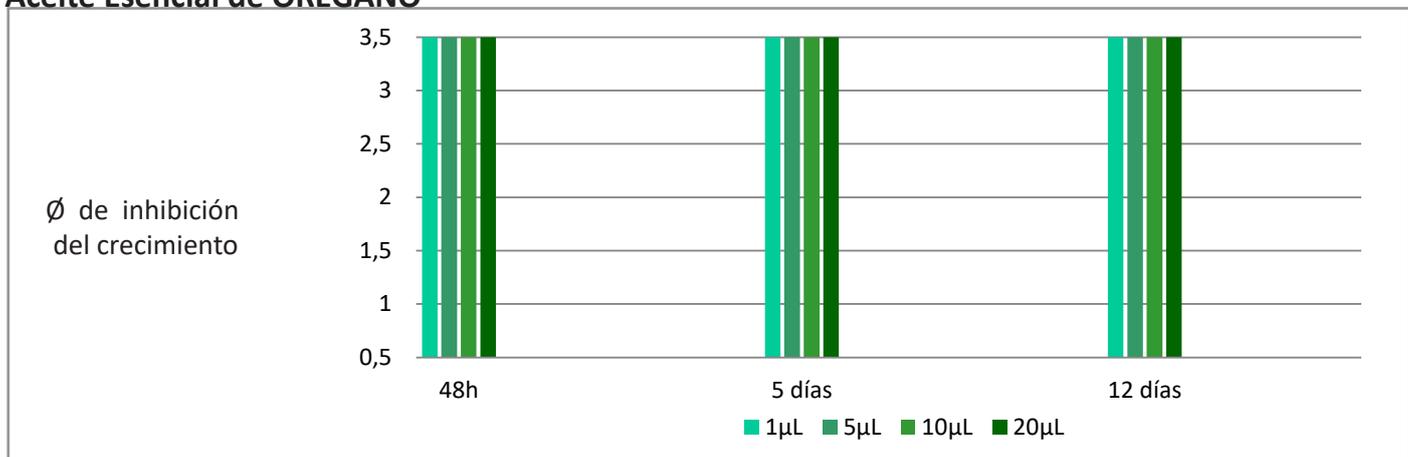
Alternaria - Aceite Esencial de Orégano



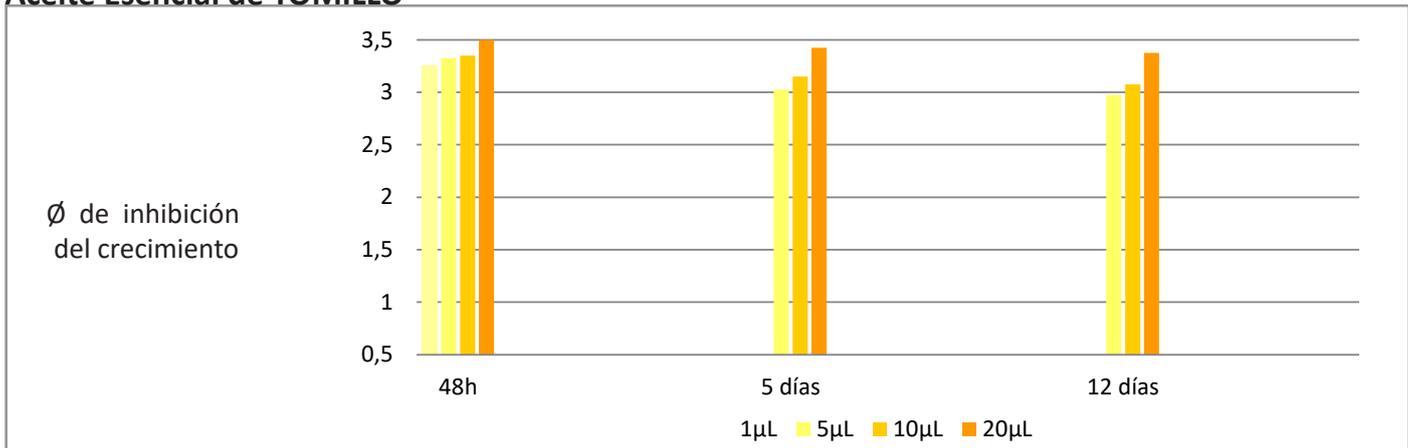
CLADOSPORIUM



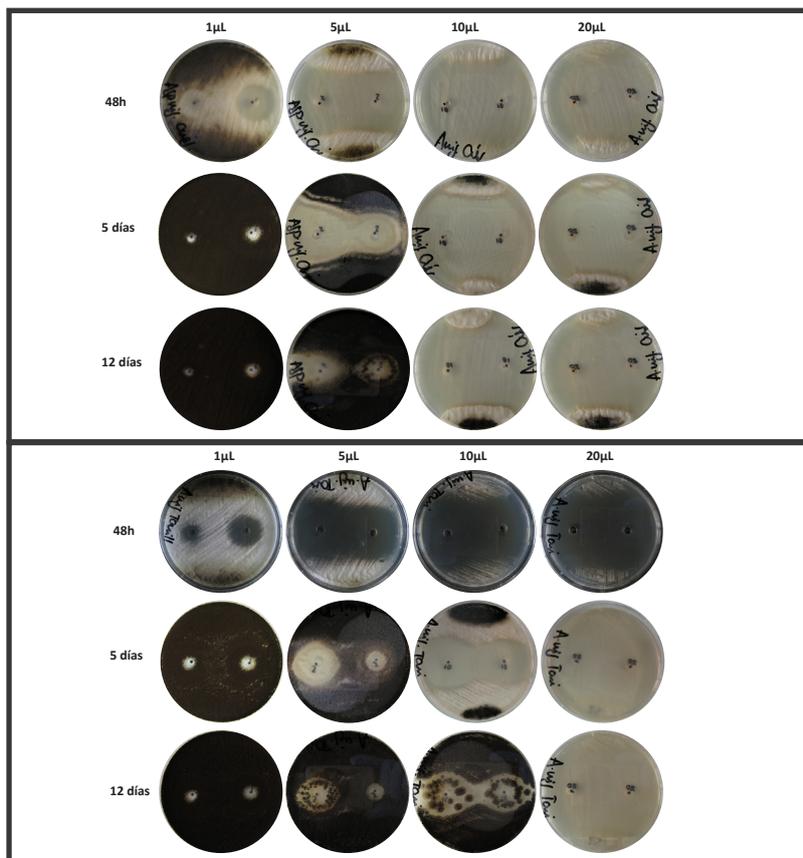
Aceite Esencial de ORÉGANO



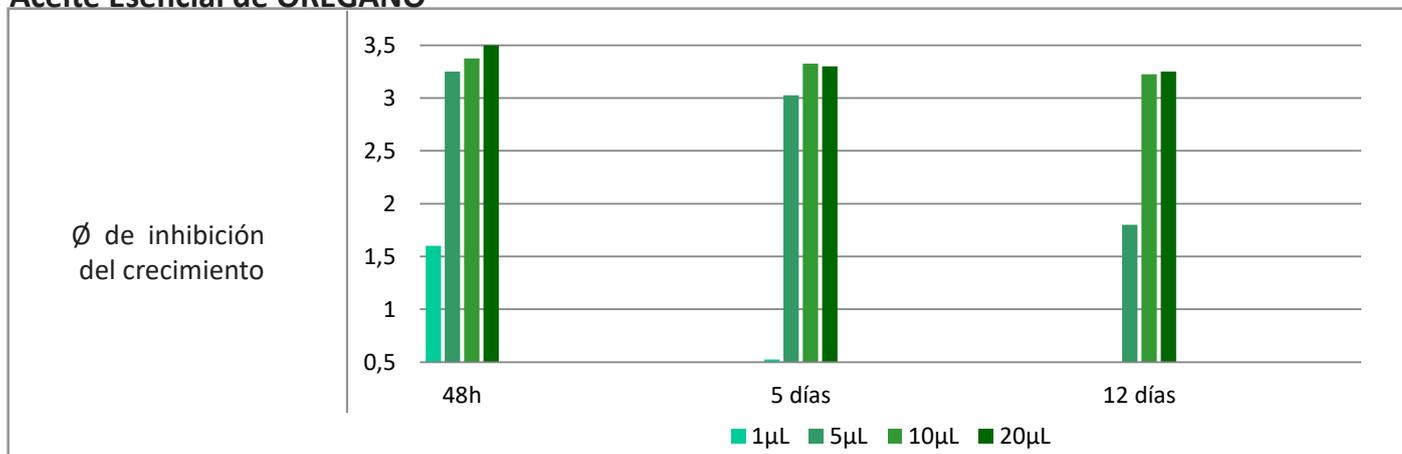
Aceite Esencial de TOMILLO



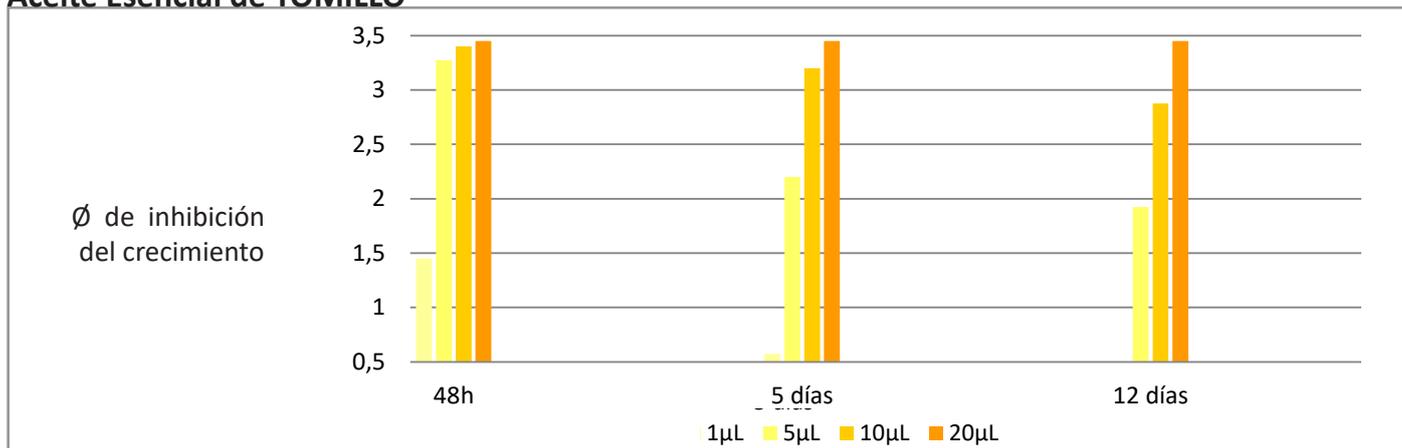
ASPERGILLUS NIGER



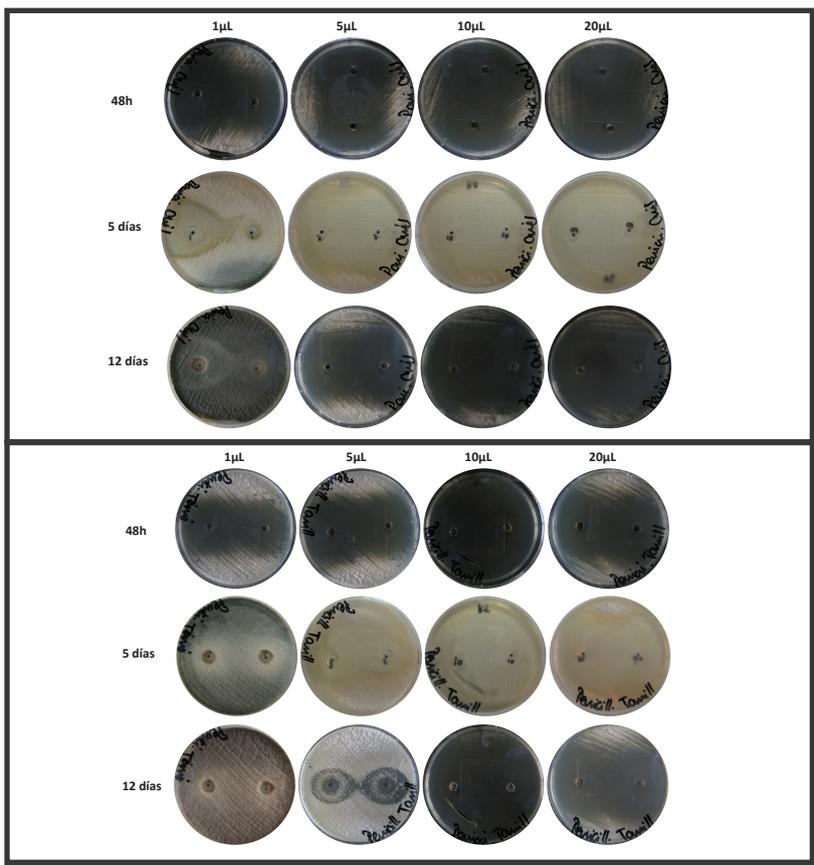
Aceite Esencial de ORÉGANO



Aceite Esencial de TOMILLO



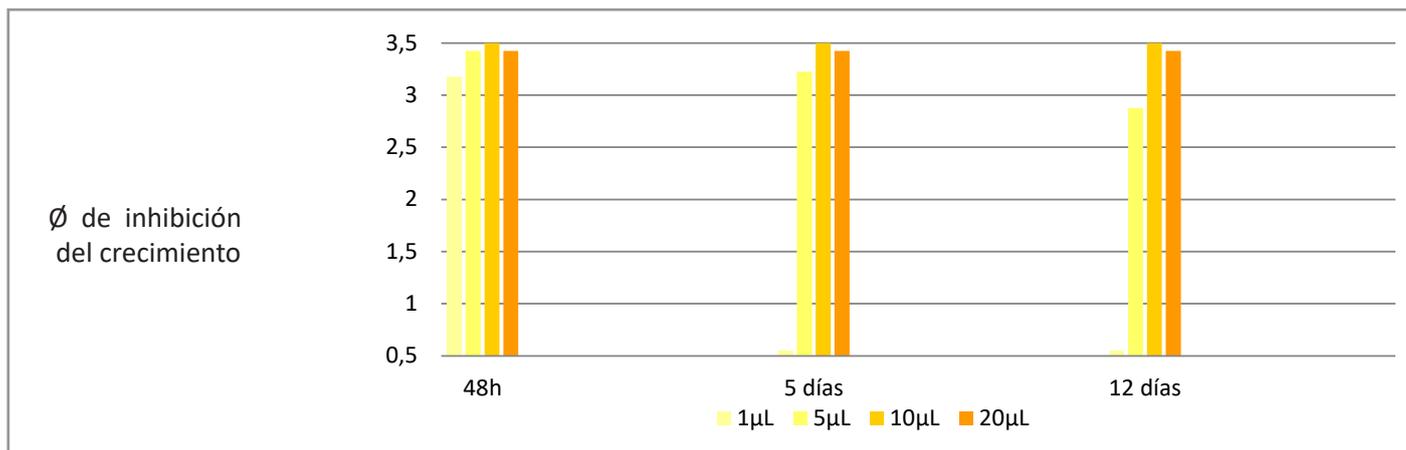
PENICILLIUM



Aceite Esencial de ORÉGANO



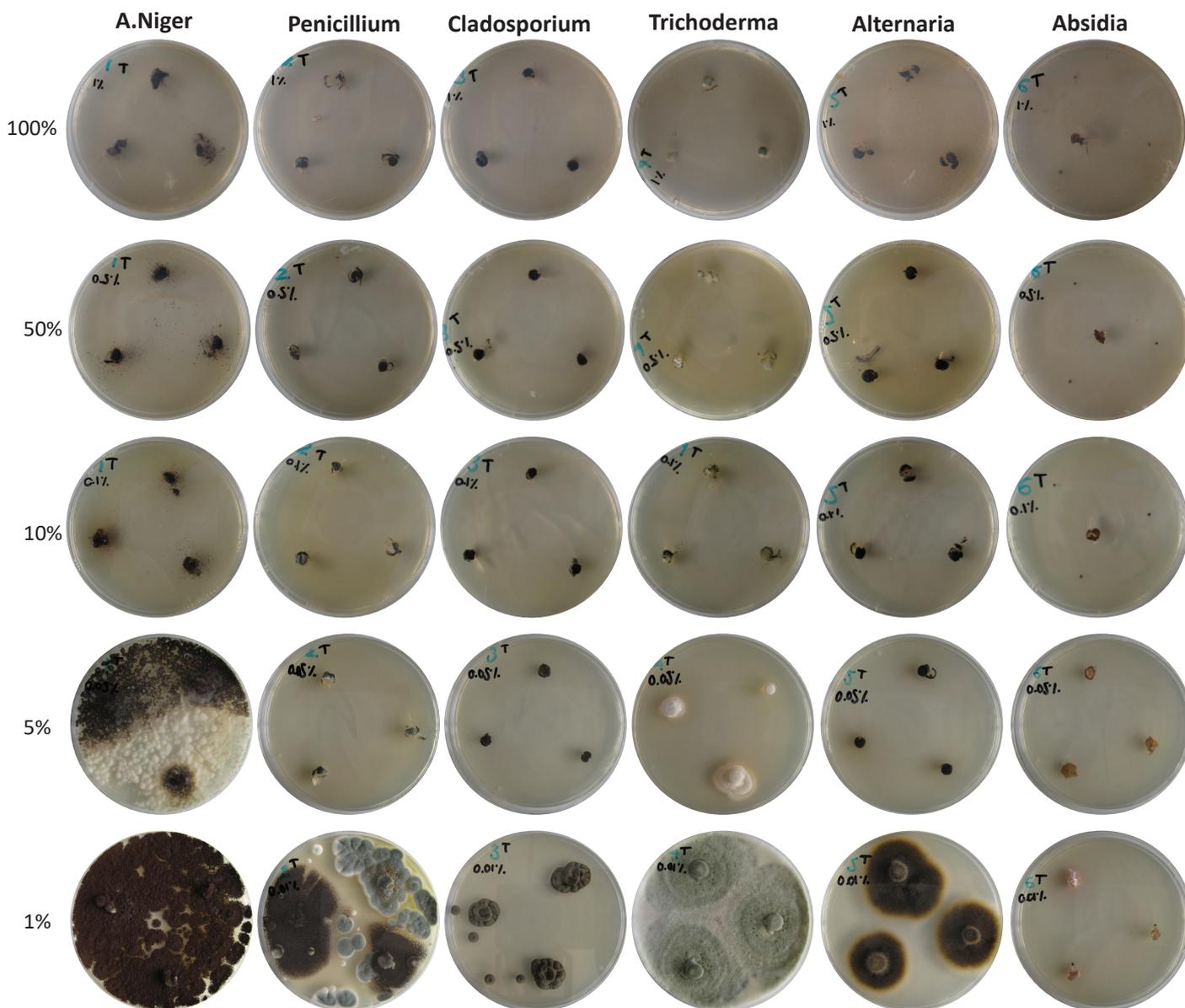
Aceite Esencial de TOMILLO



Concentraciones Inhibitorias



Aceite esencial de Tomillo

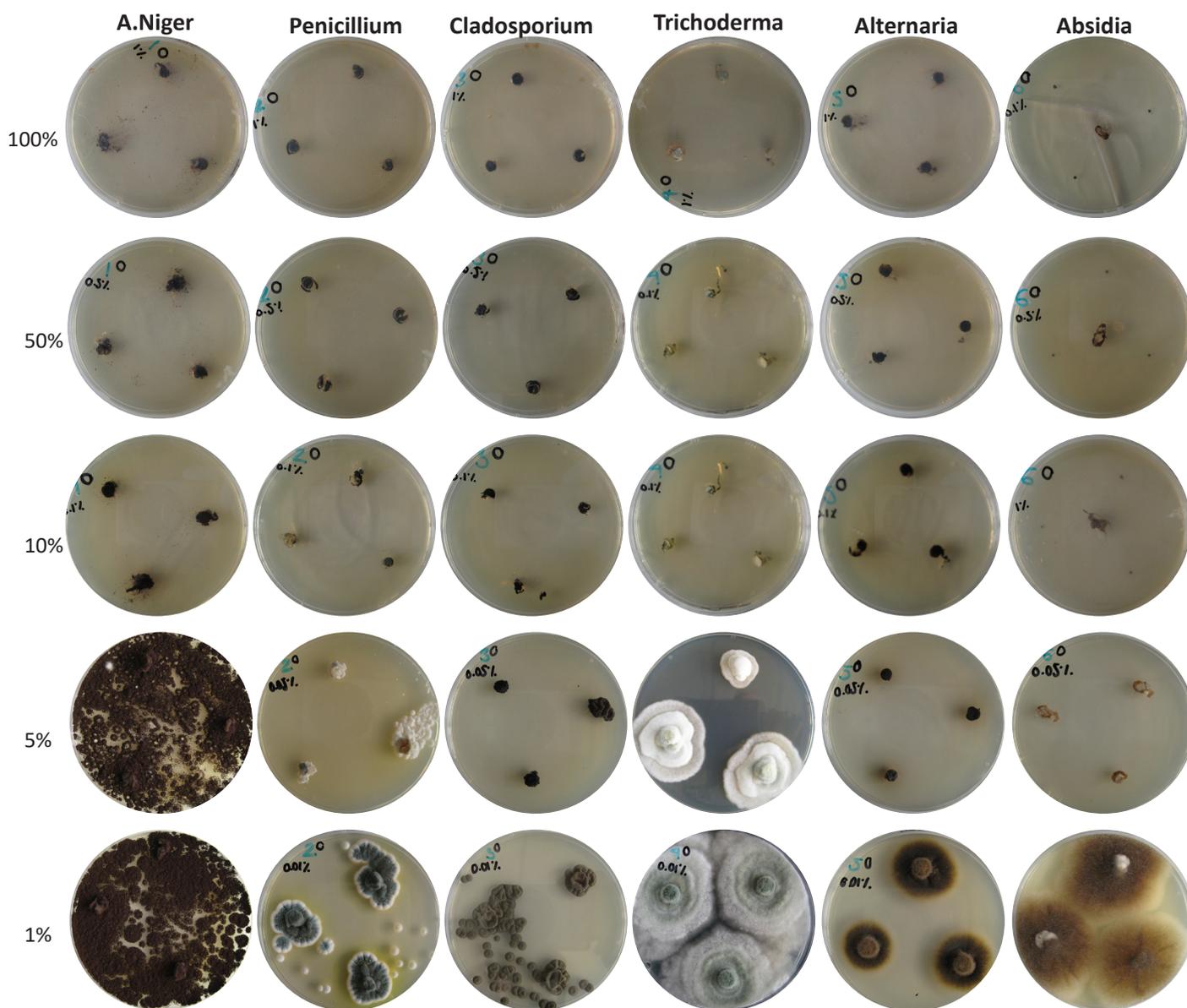


Control Negativo



		ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO																	
% AE	A. Niger			Penicillium			Cladosporium			Trichoderma			Alternaria			Absidia			
100%	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
50%	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
10%	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
5%	---	++	+++	+-	---	+++	---	---	---	++	++	---	---	---	---	---	---	---	
1%	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+-	+++	+++	+++	
C-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	

Aceite esencial de Orégano

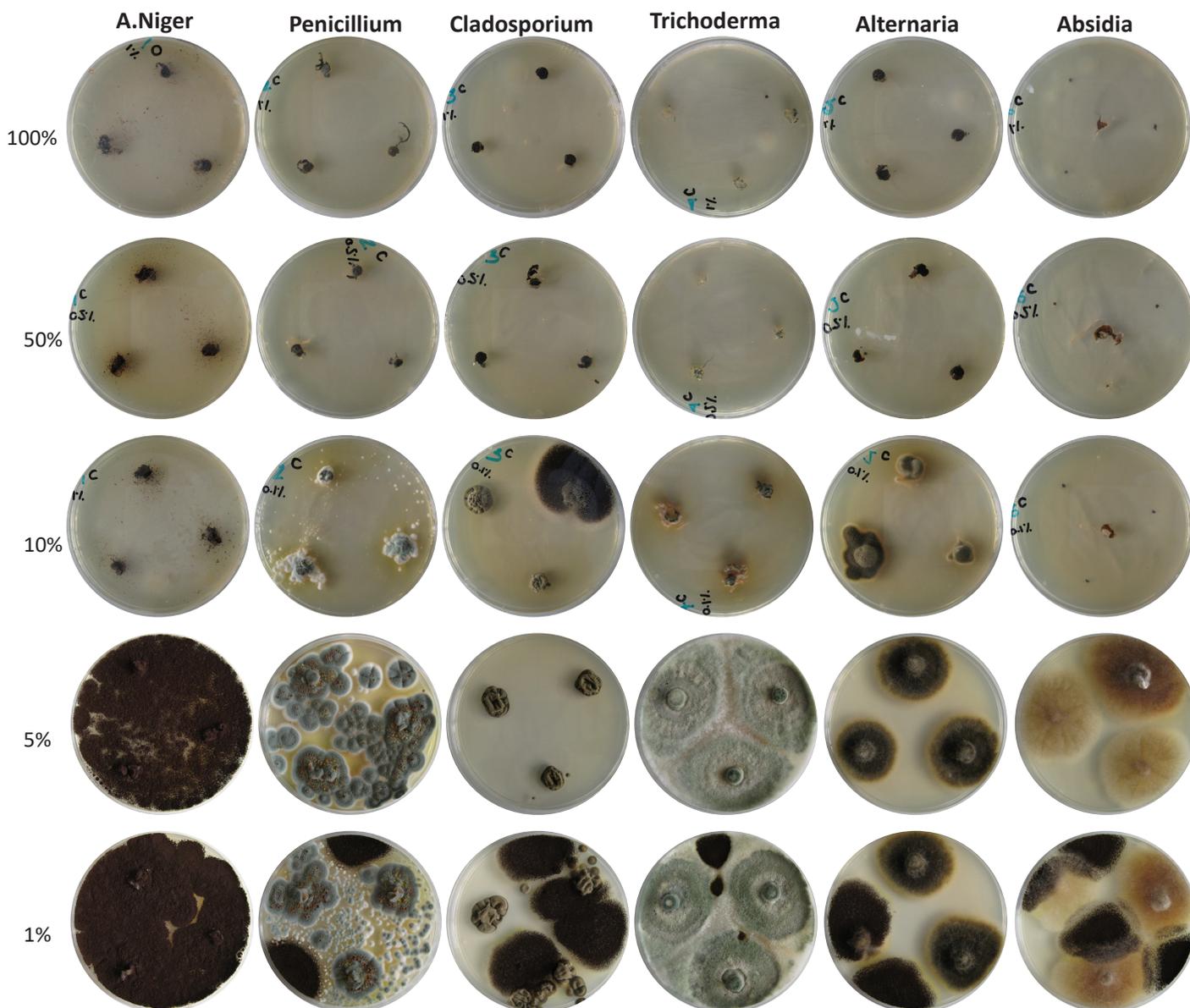


Control Negativo



ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO																			
% AE	A. Niger			Penicillium			Cladosporium			Trichoderma			Alternaria			Absidia			
100%	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
50%	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
10%	+--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
5%	+++	++-	++-	---	---	--+	---	---	---	++-	++-	--+	---	---	---	---	---	---	
1%	+++	+++	+++	++-	++-	++-	+++	+++	++-	+++	+++	+++	+++	++-	+++	+++	+++	+++	
C-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	

Aceite esencial de Clavo

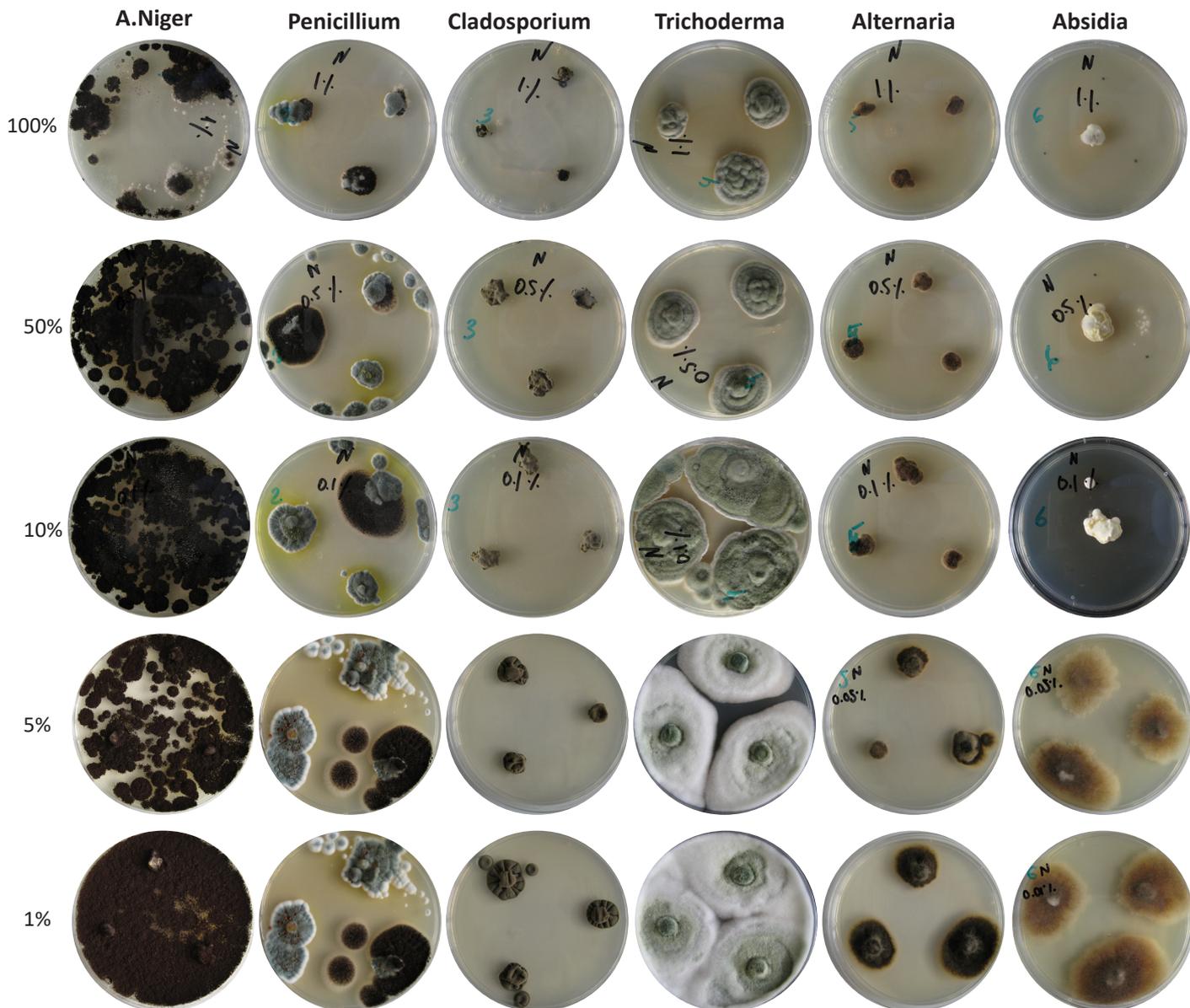


Control Negativo



ACEITE ESENCIAL DE CLAVO																			
% AE	A. Niger			Penicillium			Cladosporium			Trichoderma			Alternaria			Absidia			
100%	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
50%	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
10%	+-	+-	---	+-	+-	+-	+-	++	+-	---	---	---	+-	+-	---	---	---	---	
5%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
1%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
C-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	

Cloruro de benzalconio (neo Desogen)



Control Negativo



Cloruro de Benzalconio - neo®Desogen																			
% AE	A. Niger			Penicillium			Cladosporium			Trichoderma			Alternaria			Absidia			
100%	++-	++-	++-	--+	--+	--+	---	--+	--+	---	--+	--+	---	+++	+++	---	+++	---	
50%	+++	+++	+++	--+	--+	--+	---	---	---	--+	--+	--+	---	--+	---	---	--+	+++	
10%	+++	+++	+++	--+	--+	--+	---	---	---	+++	+++	+++	---	--+	--+	---	--+	+++	
5%	+++	+++	+++	+++	+++	--+	+++	+++	++-	+++	+++	+++	+++	+++	--+	+++	--+	--+	
1%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
C-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	

YPD Broth • Becton, Dickinson and Company

Base para el mantenimiento y a propagación de levaduras en procedimientos de biología molecular

Instrucciones: Disuelva 50 g del polvo en 1L de agua purificada. Mezclar bien. Procesar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Analice muestras del producto final para verificar su rendimiento usando cultivos de control típicos y estables.

Fórmula aproximada* por litro:

Extracto de levadura (10,0 g) ; Peptona (20,0 g); Dextrosa (20,0 g)

*Ajustada y /o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento

Para uso de laboratorio

pH final: 6'5 ± 0,2

Higroscópico . Mantener el envase bien cerrado

SABOURAUD DEXTROSE AGAR • Scharlau Microbiology

Medio sólido para el cultivo y enumeración de levaduras y hongos, de acuerdo a la Pharmacopeial Harmonized Methods y los estándares ISO.

Agar Sabouraud Dextrosado

Fórmula representativa* en g/l:

D(+)-Glucosa (40.00); Peptona de carne (5.00); Peptona de Caseína (5.00); Agar (15.00)

pH final: 5.6 ± 0.2 a 25°C

*Ajustada y /o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento

Para uso de laboratorio

Producto muy higroscópico

Disolver 65 g de polvo en 1L de agua destilada, calentando hasta ebullición con agitación frecuente. Distribuir en recipientes y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C. No recalentar.

PLATE COUNT AGAR (PCA) • Scharlau Microbiology

Medio para recuento en placas en superficie del método de inoculación, de acuerdo a los estándares ISO 4833, 8552, 17410 y IFU no.6.

Agar de Recuento en Placa (PCA)

Fórmula representativa* en g/l:

Peptona de Caseína (40.00); Extracto de levadura (5.00); Dextrosa (5.00); Agar (15.00)

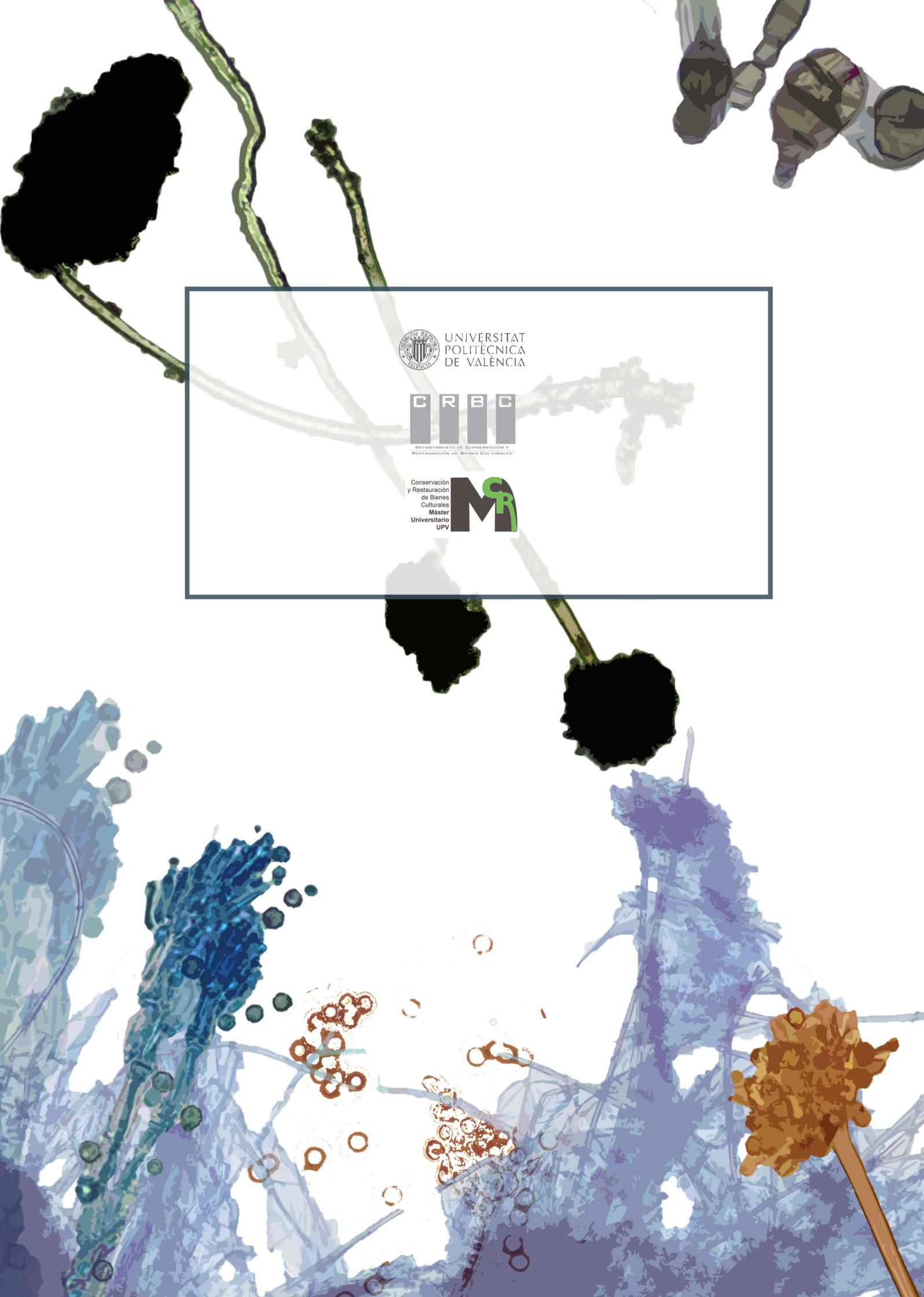
pH final: 7.0 ± 0.2 a 25°C

*Ajustada y /o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento

Para uso de laboratorio

Producto muy higroscópico

Añadir 23,5 g del polvo a 1 L de aguadestilada. Calentar hasta ebullición con agitación constante. Repartir en los recipientes y esterilizar al autoclave durante 15 minutos a 121°C.



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



DEPARTAMENT DE CONSERVACIÓ I
RESTAURACIÓ DE BENS CULTURALS

Conservación
y Restauración
de Bienes
Culturales
Máster
Universitario
UPV

