

ENSAYOS DE BIOLIMPIEZA CON BACTERIAS EN PINTURAS MURALES

Pilar Bosch Roig¹, Jose Luis Regidor Ros², Pilar Soriano Sancho², M^a Teresa Doménech Carbó³ y Rosa Montes Estellés¹

Instituto Universitario de Restauración del Patrimonio de la Universidad Politécnica de Valencia

¹Área de microbiología, Departamento de biotecnología, UPV

²Taller de pintura mural

³Laboratorio de análisis fisico-químicos y control medioambiental de obras de arte

AUTOR DE CONTACTO: Pilar Bosch Roig, pbschroig@gmail.com

RESUMEN: *Los microorganismos han sido considerados como agentes causantes de biodeterioro de obras de arte, sin embargo, en la actualidad se empiezan a utilizar para la limpieza de restos de compuestos orgánicos y costras salinas difíciles de eliminar por los métodos tradicionales de restauración. Este trabajo desarrolla el uso de *Pseudomonas stutzeri* para la “biolimpieza” de pinturas murales, con la intención de eliminar restos de materia orgánica de antiguas restauraciones o eflorescencias salinas insolubles. Para ello se ensayan distintas cepas de *Pseudomonas stutzeri* de colecciones tipo y distintos soportes que facilite su aplicación directa sobre obra real. Los métodos obtenidos en las pruebas previas se aplican de manera experimental sobre fragmentos de las pinturas murales de la Iglesia de los Santos Juanes de Valencia.*

PALABRAS CLAVE: “biolimpieza”, pseudomonas, bacterias, pintura mural, restauración y conservación

1. INTRODUCCIÓN

El aumento de los niveles de contaminación en la atmósfera debido al aumento de la actividad industrial, de la urbanización y del transporte, conlleva a la aceleración de los procesos de deterioro de los materiales artísticos. Así, encontramos en ambiente urbano, la presencia de costras negras o grises sobre las obras de arte, costras constituidas principalmente por sulfatos, nitratos y residuos carbonosos (Sáiz-Jiménez, 1995b). La formación de sales sobre las pinturas murales, es uno de los mecanismos más importantes de su deterioro en ambientes interiores. Estas sales, una vez en el interior del muro o de las pinturas, generan procesos de precipitación y crecimiento de cristales de manera que ejercen una presión a causa del incremento del volumen de los cristales. Ésta situación genera unas fuerzas de tracción que pueden llegar a sobrepasar la resistencia del material generando microfisuras en el muro o en la *pintura mural*. Los procesos de nitrificación y sulfatación pueden producirse también por movimientos de sales, por ascensión desde el suelo o por filtración desde zonas con acumulación de detritus de animales, como ocurre en la Iglesia de los Santos Juanes de Valencia, puesto que los nitritos y nitratos pueden formarse por descomposición de materia orgánica nitrogenada (Doménech y Yúsá, 2006).

Se puede encontrar también acumulación de materia orgánica sobre la superficie de las obras artísticas, debido a la deposición de partículas atmosféricas, a restos de colonizaciones de microorganismos y a sustancias orgánicas aportadas durante las restauraciones. Esta acumulación puede producir importantes daños en las obras así como servir de sustrato para el crecimiento de microorganismos (Ranalli *et al.*, 2003a).

Estos dos tipos de patologías son habitualmente tratadas por los restauradores mediante métodos físico-químicos, en ocasiones inadecuados para la obra de arte ya que pueden ser agresivos, invasivos, poco selectivos y requerir tiempos largos de aplicación, pudiendo llegar a causar cambios de color, movimientos de sales en

la estructura del material, eliminación excesiva de material original, etc. Así mismo estas técnicas suelen emplear materiales tóxicos, exponiendo a los trabajadores a un riesgo durante el tratamiento e introduciendo en el medio ambiente sustancias tóxicas indeseadas (Cappitelli *et al.*, 2007).

Empieza a surgir una prometedora metodología para la eliminación de estas patologías, basada en métodos biológicos de limpieza. Diferentes equipos de investigación están estudiando la utilización de microorganismos como agentes de limpieza biológica, proceso llamado “*Biolimpieza*”. Los microorganismos son considerados generalmente como agentes biodeteriorantes ya que son responsables de la alteración de obras de arte, sin embargo también pueden tener efectos positivos al ser utilizados para la *conservación y restauración* (Sorlini and Cappitelli, 2008). Los microorganismos seleccionados para estos procesos, son siempre no patógenos y no esporulantes, de manera que no generan un riesgo para los trabajadores y tras su aplicación mueren, al no ser capaces de producir formas de resistencia (esporas).

Los microorganismos presentan ventajas sobre los tratamientos físico-químicos y las enzimas, sobre todo cuando las sustancias a eliminar son complejas e incrustadas. En estos casos, los métodos físico-químicos deben ser drásticos, generando ocasionalmente daños irreparables en los materiales; y las enzimas, al ser sustrato-específicas, no son capaces de degradar sustancias complejas, por lo tanto se requiere una mezcla de enzimas difícil de utilizar conjuntamente. Sin embargo, las *bacterias*, gracias a sus mecanismos de inducción génica, son capaces de adaptarse ante las distintas condiciones ambientales y los distintos nutrientes, sintetizando las enzimas que necesitan en cada momento para degradarlos (Ranalli and Sorlini, 2007).

En las pinturas murales de la iglesia de los Santos Juanes de Valencia, encontramos los dos tipos de alteraciones mencionadas. Por un lado, observamos costras blanco-grises producidas por eflorescencias salinas (Zalbidea, *et al.*, 2008), en la zona de los lunetos de la bóveda central; éstas se producen por el aumento de la contaminación

atmosférica y por filtración de sales desde zonas con acumulación de detritus de animales. Detrás de la bóveda donde encontramos las pinturas murales, existe un espacio interbóveda comunicado con el exterior, donde roedores, aves e insectos viven y anidan. Esto genera un gran acumulo de residuos orgánicos, fundamentalmente en la parte posterior de los lunetos, que con el agua de lluvia son arrastrados y depositados en las zonas más profundas, generando constantes fuentes de materiales en descomposición y sales que acaban filtrando hasta las pinturas murales formando eflorescencias y costras.

Por otro lado, sobre las pinturas murales pintadas por Palomino, nos encontramos tanto con contaminación salina (sulfatos y oxalatos) como con restos de materia orgánica de las restauraciones anteriores realizadas por el equipo de los hermanos Gudiol (1958-1965).

Estas costras así como los restos de materia orgánica se han intentado eliminar mediante técnicas físico-químicas sin obtener los resultados deseados debido a que son métodos complejos y delicados pues incluyen distintas fases y reactivos de distintas naturalezas (resinas de intercambio iónico, resinas, etc.). Por lo que, en este trabajo, se propone la realización de un estudio para la *biolimpieza* de estas dos patologías con la intención de simplificar el método con eficacia y economía.

Para la eliminación de las eflorescencias producidas por sulfataciones y nitrataciones de las superficies artísticas, deben utilizarse *bacterias* reductoras de sulfatos y de nitratos. Éstas convierten los sulfatos en sulfuro de hidrógeno y los nitratos en nitrógeno molecular, ambas moléculas son gases a temperatura ambiente, de manera que se evaporan a la atmósfera (Ranalli e Sorlini, 2003b). Uno de los primeros trabajos de *biolimpieza*, fue el realizado por Gauri *et al.* (1988) quienes eliminaron parcialmente costras negras de yeso sobre estatuas de mármol, mediante la inmersión del objeto durante 24-84h, en una suspensión con la bacteria *Desusfovibrio desulfuricans*. Estudios más recientes, muestran la *biolimpieza* del 81% de los sulfatos sobre una escultura de mármol, tras 36h con *D. desulfuricans* y la limpieza del 79% de los sulfatos en una columna de mármol tras 30h con *D. vulgaris* (Ranalli *et al.*, 2000).

En cuanto a la eliminación de nitratos, se han obtenido resultados interesantes mediante tratamientos de 36 horas en una estatua de mármol con *Pseudomonas denitrificans*, en condiciones de anaerobiosis (Ranalli *et al.*, 2003b). Así mismo, se ha conseguido la eliminación en el laboratorio, del 90% de los nitratos en 30h mediante la utilización de *Pseudomonas stutzeri* en anaerobiosis sobre materiales pétreos (Ranalli *et al.*, 2000). En grandes superficies también se han eliminado nitratos, como en los muros de la catedral de Matera, donde se eliminaron el 90% de los nitratos mediante la aplicación durante 96h de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* o *Paracoccus denitrificans* (Cappitelli *et al.*, 2005).

Para la eliminación de materia orgánica sobre las superficies artísticas es necesario seleccionar *bacterias* capaces de utilizar como nutriente la materia que se desea eliminar. Un estudio reciente con muy buenos resultados, es el realizado sobre los frescos del siglo XIV de Spinello Aretino en el Camposanto Monumentale di Pisa. El equipo de Ranalli (2005) eliminó satisfactoriamente un gran estrato de cola animal alterada, que había sido aplicada en el pasado para su arranque del muro, mediante la aplicación de *Pseudomonas stutzeri* y enzimas durante 2-17h (Ranalli *et al.*, 2003b y 2005; Antonioli *et al.*, 2005; Sorlini and Cappitelli, 2008).

2. METODOLOGÍA

2.1. Material artístico utilizado

Para comprobar la disminución de costras blanco-grises se utilizan las pinturas murales de los hermanos Guillot pintadas en los lunetos de la bóveda central de la Iglesia de los Santos Juanes de Valencia. En estas zonas aparecían grandes eflorescencias blanquecinas de nitratos y sulfatos.

Para estudiar la eliminación de materia orgánica se han utilizado zonas de *pintura mural* pintadas por Palomino y arrancadas en los años sesenta, cuya *restauración* dejó entre otros depósitos, restos de cola por distintas zonas de la superficie de las pinturas.

2.2. Reactivos y materiales de referencia para análisis físico-químicos

Los reactivos utilizados para el tratamiento de las muestras fueron: hexamethyldisilazane (HMDS) (99% pureza), etil cloroformo, Cloroformato de Etilo (ECF), HCl 6M, piridina absoluta y cloroformo al 98% para GC (Acros, Cambridge, MA, USA), metanol absoluto (Carlo Erba, Rodano, Italy), Resina poliéster Serifix (Struers).

2.3. Preparación de las muestras

Las muestras fueron tomadas mediante bisturí. Se tomaron muestras de las zonas alteradas antes y después del tratamiento de *biolimpieza*.

Las muestras destinadas al análisis por microscopía fueron incluidas en resina poliéster Serifix (Struers) y posteriormente pulidas mecánicamente con discos abrasivos CSi (Struers) en desbastadoras mecánicas Struers Knuth-rotor 2 y Struers DAP-6 (Struers, Erkrath, Germany) para obtener una sección lisa de corte transversal.

2.4. Técnicas de análisis

Análisis de microscopía óptica mediante luz incidente para la cual se utilizó un microscopio óptico Leica DMR con sistema de luz polarizada incidente y transmitida, y un microscopio estereoscopia Leica GZ6, con zoom (6-40x), iluminación vertical con anillo de fibra óptica Leica CLS 100 y sistema fotográfico Leica MPS 60.

Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) para la identificación de compuestos inorgánicos y orgánicos. Utilizando un espectroscopio FTIR modelo Vertex 70 (Bruker) con DTGS (sulfato de triglicina deuterado), el espectro fue obtenido en modo de absorbancia, con un número de escaneados de 32 y con una resolución de 4 cm⁻¹. Las micromuestras fueron analizadas en modo ATR.

Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas para las muestras que resultaron poseer componentes orgánicos. Éstos análisis se realizaron con un cromatógrafo de gases "Agilent 6890N GC" (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) unido a un espectrómetro de masa "Agilent 5973N". Las columnas de capilaridad HP-5 MS fueron utilizadas para obtener la separación adecuada de los componentes. Los iones fueron generados mediante ionización de electrones (70 keV) en la cámara de ionización del espectrómetro de masa. El espectrómetro de masas fue escaneado desde 20m/z a 800m/z, con ciclos de un segundo de tiempo. El software "Agilent Chemstation G1701CA MSD" fue utilizado como control de GC-MS, como pico de integración y para la evaluación de la masa espectral. La librería "Wiley" de espectros de masa fue utilizada para identificar los componentes. Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron: temperatura inicial de cromatografía de gases de 100°C, un gradiente de temperatura programada de 40°C/min hasta 295°C que es mantenido durante 20min. El gas portador fue el helio con una presión de entrada de 72,5 kPa con una velocidad de flujo de 1ml/min y un radio de ruptura de 1:20.

2.5. Realización de las probetas

Se realizaron dos tipos de probetas: Probetas para la simulación de las pinturas murales con eflorescencias salinas y probetas para la simulación de los restos de cola de arranque de las pinturas de Palomino. Para su realización se utilizan baldosas de cerámica sobre las que se aplicó una capa de yeso de 1 cm, sobre ella se aplicó una capa de cal viva y arena (1:2) de unos 3 mm, simulando el *intonaco*

y sobre él se aplicó una capa pictórica con pigmento tierra según la técnica del buen fresco empleada por Palomino.

Para la generación de las eflorescencias salinas, nos basamos en la norma UNE-EN 12370(1999): "Métodos de ensayo para piedra natural. Determinación de la resistencia a cristalización de sales". Se introduce la probeta en estufa a 60-100°C hasta obtener una masa constante. Se sumerge entonces la probeta, hasta la mitad, en una solución saturada de Nitrato de potasio durante 2h. Posteriormente se introduce en una estufa a 60-100°C durante 6h y se deja a temperatura ambiente unas 13h. Este proceso se repite 3 veces hasta que aparecen las eflorescencias blanquecinas en la superficie de la probeta (Ver figura 5.2). Para la generación de las probetas con cola, se aplicó una capa de cola fuerte de carpintero Zurigo disuelta en agua (1:3) al baño maría.

2.6. Obtención de Cultivos

Bacterias: Pseudomonas stutzeri cepas 4899 (CECT); 930 (CECT); 5190 (DSMZ); 4166 (DSMZ); 46321 (DSMZ)

Materiales: Placas Petri, placas de contacto Rodac, tubos de cristal, agitadores, centrifuga, micropipetas, balanza, tubos eppendorf, campanas de Durham, papel japonés (12g), algodón hidrofílico, agar bacteriológico europeo (Laboratorios Conda S.A. Pronadisa), agarosa (Laboratorios Conda S.A. Pronadisa), sepiolita, carbopol 934 (STEM-Servicios Técnicos y Equipamientos para Museos), pinceles y esponjas naturales.

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

Plate count (PC) es un medio nutritivo no selectivo para el crecimiento de *bacterias*. Está compuesto de triptona (5g/L) y extracto de levadura (2,5g/L) como fuentes de proteínas, glucosa (1g/L) como fuente de carbono, a un pH 7; y Plate count agar (PCA) es el mismo medio al que añadimos Agar-agar (15g/L) para formar un gel.

Caldo nutriente (Nutrient broth: NB) se trata de un medio general para el cultivo de *bacterias* compuesto de 5g de peptona y 3g de extracto de carne bovina por cada litro de caldo. NB agar es el mismo medio gelificado con agar-agar al 2%.

Caldo Nitrato, solución que contiene por cada litro de caldo 1000ml de Solución Salina Estandar (1/20), 2g de nitrato potásico, 5g de carbonato de calcio, 10g de glucosa y 1ml de solución de oligoelementos.

Solución Salina Estandar (SSE) contiene por cada litro de solución 5g de Fosfato bipotásico, 2.5g de Sulfato Magnésico, 2.5g de Cloruro Sódico, 0.05g de Sulfato Férrico, 0.05g de Sulfato de Manganeso y 1000ml de agua destilada.

Solución de Oligoelementos posee por cada litro de solución 0.05g de Molibdato Potásico, 0.05g de Borato Sódico, 1 gota de Cloruro férrico, 0.05g de Nitrato de Cobalto, 0.05g de Sulfato de Cadmio, 0.05g de Sulfato de Cobre, 0.05g de Sulfato de Zinc, 0.05g de Sulfato de Manganeso y 1L de agua destilada.

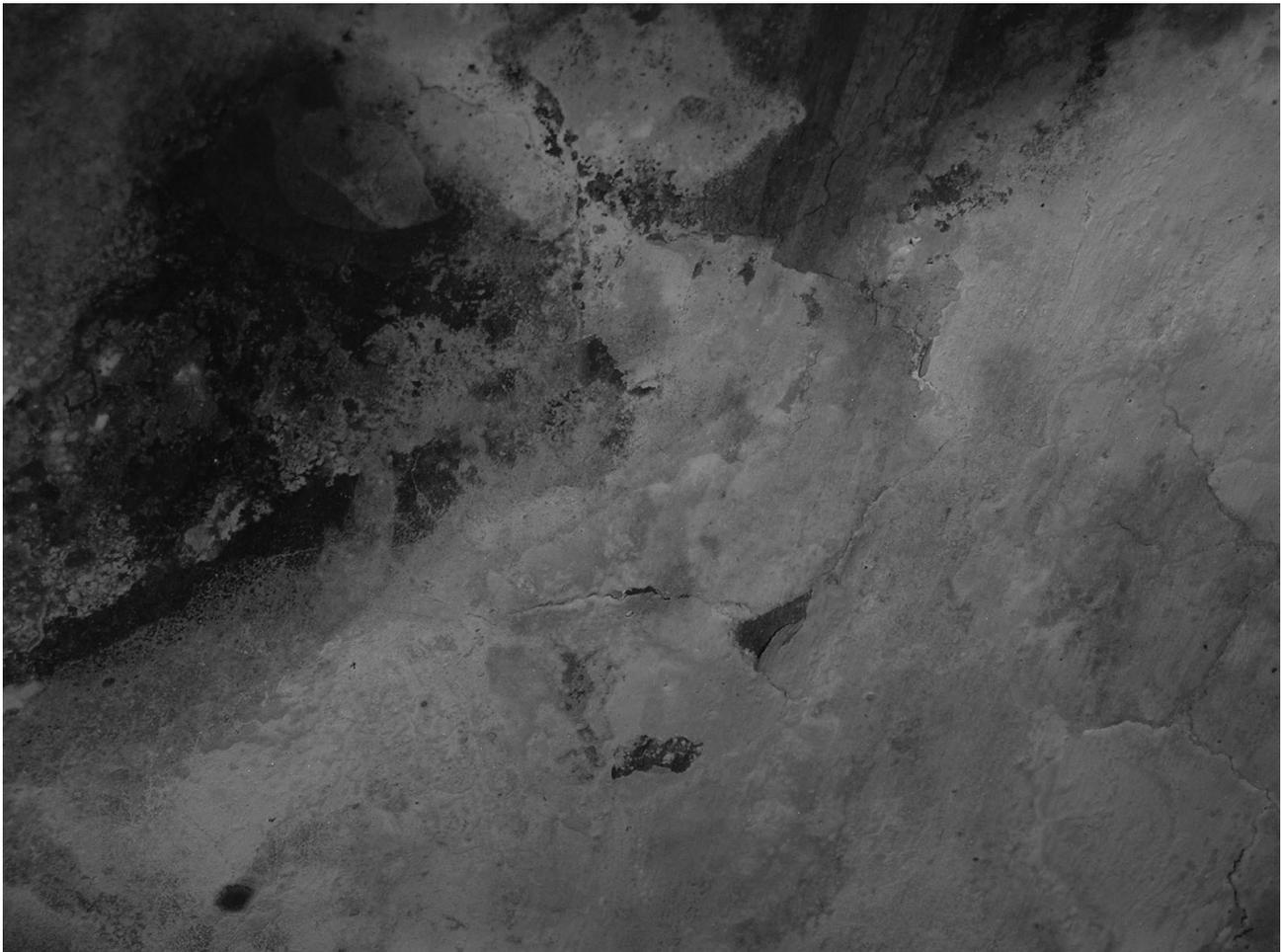


Figura 1. Imagen de las eflorescencias blanco-grisáceas presentes sobre los frescos de uno de los lunetos de bóveda central de la Iglesia de los Santos Juanes de Valencia

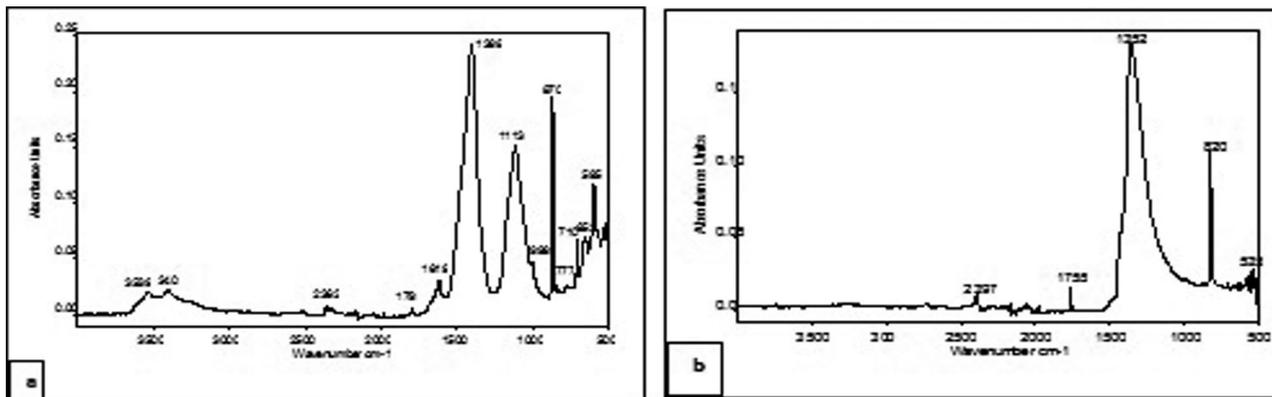


Figura 2. Espectro de absorción IR de la muestra 2 (a) donde podemos identificar la presencia de sulfatos (3539, 3400, 1619, 1113, 595cm⁻¹), carbonatos (1791, 1398, 870, 710cm⁻¹) y nitratos solapados bajo el carbonato (2362cm⁻¹); y (b) de la muestra 3 donde podemos identificar la presencia de nitrato potásico (2397, 1755, 1352, 820 y 535 cm⁻¹)

M9 diluido al 50% es una solución compuesta por 3g de Na₂HPO₄, 1.5g de KH₂PO₄, 0.5g de NH₄Cl y 0.25g de NaCl y 1L de agua destilada.

NaCl 0,8% pH: 7.0 (Panreac), cola animal (Colla Forte CTS 01113001), Nitrato Potásico (Panreac).Tiras marcadoras de nitratos y nitritos de Merck.

3. RESULTADOS

3.1. Análisis físico-químicos

Antes de iniciar los tratamientos sobre las pinturas, es muy importante realizar un estudio analítico de la obra para determinar el tipo de materia orgánica presente y la composición de las

eflorescencias encontradas. Es también muy importante hacer los mismos estudios tras la limpieza, para determinar analíticamente el resultado y la eficiencia del tratamiento.

Para el análisis de las eflorescencias se tomaron de uno de los lunetos más afectados (Ver figura 1), tres muestras observando la existencia de zonas con eflorescencias en forma de costras duras donde, mediante FTIR y SEM/EDX se detectó la presencia mayoritaria de carbonato y sulfato, (Ver figura 2 a); y zonas más blanquecinas con cristales aciculares en las que se detectó la presencia mayoritaria de nitrato de potasio (Ver figura 2 b).

Para el análisis de los restos de materia orgánica se tomaron diferentes muestras y se analizaron por FTIR, GC/MS, observando que la distribución de la materia orgánica es muy heterogénea y mayoritariamente de cola animal. El origen de la presencia de esta cola se debe a los arranques llevados a cabo por el equipo de Gudiol,

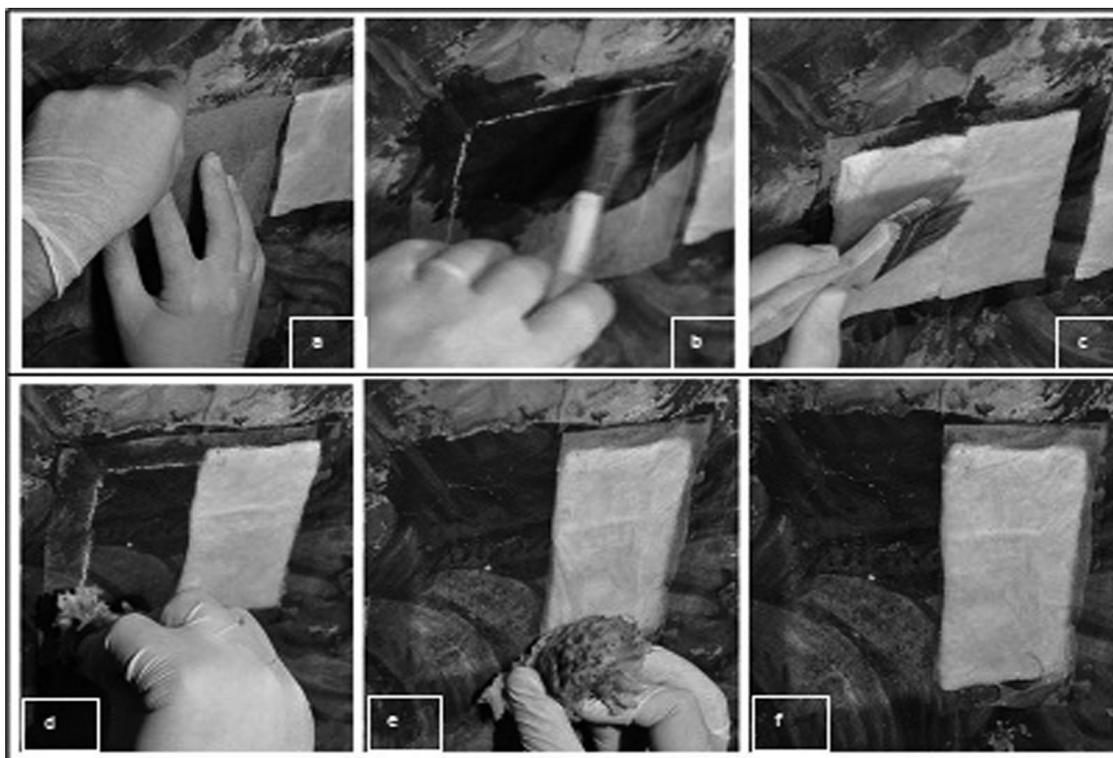


Figura 3. Proceso de biolimpieza con algodón sobre eflorescencias blanquecinas. a) protección con papel japonés; b) aplicación de las bacterias con pincel; c) recubrimiento de algodón empapado en bacterias; d) tras la hora y media se retira el algodón y se limpia con agua destilada; e) se quita el papel japonés y se limpia con agua destilada; f) resultado limpieza

ya que utilizaron cola animal para el *strappo* y su eliminación no fue completa, quedando restos sobre las pinturas que con los años se han endurecido y perdido su reversibilidad, siendo difíciles de eliminar.

3.2. Estudio de condiciones óptimas de “biolimpieza” sobre probetas en laboratorio

Una vez caracterizados los dos problemas, se pasó a seleccionar las *bacterias* que serían capaces de eliminar las eflorescencias y los restos de cola. Tras una búsqueda bibliográfica, y con la intención de utilizar una única bacteria para la eliminación de los distintos problemas estudiados, decidimos decantarnos por la especie: *Pseudomonas stutzeri*. Esta bacteria, según la bibliografía, es capaz de limpiar cola y nitratos; y de degradar sulfatos (Lalucat *et al.*, 2006), aunque no hemos encontrado trabajos sobre su utilización para eliminación de sulfatos sobre obras de arte. Por lo que centramos nuestros experimentos de laboratorio en la aplicación de estas *bacterias* para la eliminación de los nitratos y de cola.

Realizamos distintas pruebas en el laboratorio con cinco cepas de *Pseudomonas stutzeri* estudiando su crecimiento con cola animal o con nitrato potásico como nutrientes en aerobiosis y en anaerobiosis. De todas las cepas estudiadas, seleccionamos la cepa DSMZ 5190 debido a su mayor efectividad de crecimiento en ambos medios y en condiciones de aerobiosis.

Para la aplicación de las *bacterias* sobre las pinturas, se selecciona un soporte inerte, capaz de retener las *bacterias* y de conservar una hidratación adecuada para el crecimiento bacteriano, durante el periodo del tratamiento.

Así mismo el soporte debe permitir su aplicación en todo tipo de superficies, no manchar ni dejar residuos y ser de fácil eliminación, sin ser tóxico para los operarios ni para el medio ambiente.

En las publicaciones sobre “biolimpieza” con *bacterias* encontramos la utilización de soportes como: espuma de poliuretano (Bang *et al.*, 2001), algodón (Antonioli, *et al.*, 2005; Ranalli *et al.*, 2005), sepiolita (Ranalli *et al.*, 2003a), Hydrobiogel-97, Carbogel y Carbopol, (Cappitelli, *et al.* 2006). De todos estos seleccionamos 3: algodón, sepiolita y Carbopol 934. En todos los casos se utilizó papel japonés (12g) antes de la aplicación del soporte para proteger las pinturas y permitir la fácil eliminación de los soportes tras el tratamiento.

La cepa bacteriana seleccionada, fue crecida a lo largo de 5 días consecutivos en dos medios distintos: en M9 diluido 50% con 1% de cola y en Caldo Nitrato. De esta manera se preparó a las *bacterias* para utilizar la cola y los nitratos como nutrientes. Tras esos cinco días, se procedió a la obtención de grandes cantidades de *bacterias*. Para ello, se sembraron en matraces con 400ml de medio con cola o con nitrato creciéndolas en agitación a 28°C, 24h para que alcanzaran el punto máximo de su crecimiento exponencial.

Tras las 24h de incubación, fueron centrifugadas en 3 ciclos de 10 minutos a 4200rpm, lavando los pellets con NaCl 0,8% y resuspendiéndolas en un volumen final de 50ml de agua destilada estéril. Utilizando 100 µl para realizar el recuento del número de

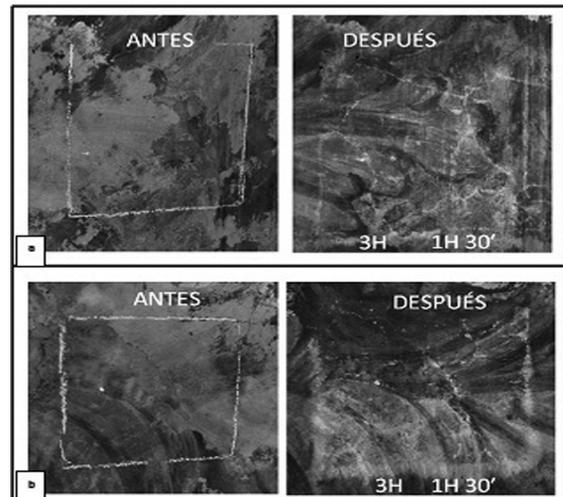


Figura 4. Imágenes de la limpieza de las eflorescencias sobre pinturas murales. a) Imágenes del antes y después en el control algodón con agua, y b) imágenes del antes y después tras la limpieza con algodón y *Pseudomonas stutzeri*

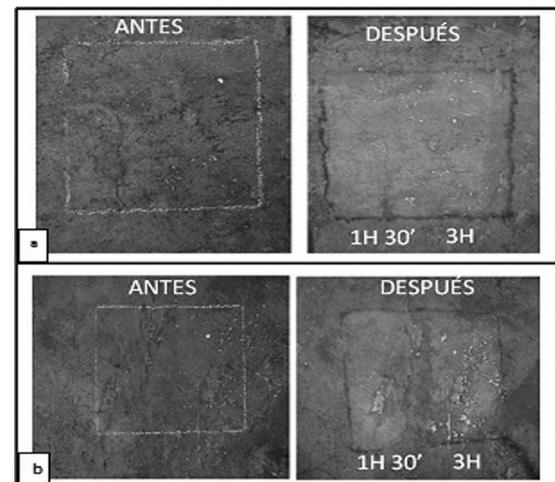


Figura 5. Imágenes de la limpieza de restos de cola sobre pinturas murales; a) Imágenes del antes y después (tras 1h y 30min, y tras 3h) en el control algodón con agua, y b) imágenes del antes y después (tras 1h y 30min, y tras 3h) de la limpieza con algodón y *Pseudomonas stutzeri*

bacterias presentes en la solución y el resto fue utilizado para las distintas pruebas de “biolimpieza”. Se obtuvieron recuentos de alrededor de 10^6 *bacterias*/mL. De los estudios realizados en los soportes, acabamos descartando la sepiolita y el Carbopol.

La sepiolita secaba rápidamente no permitiendo la actuación adecuada de los microorganismos y dejaba una ligera mancha sobre la superficie, pudiendo dañar las pinturas como ya comprobamos en un estudio previo (Casanova, 2008). El Carbopol por su parte dejaba restos sobre la probeta. De las pruebas realizadas con algodón, obtuvimos buenos resultados de aplicación y de limpieza en todas ellas.

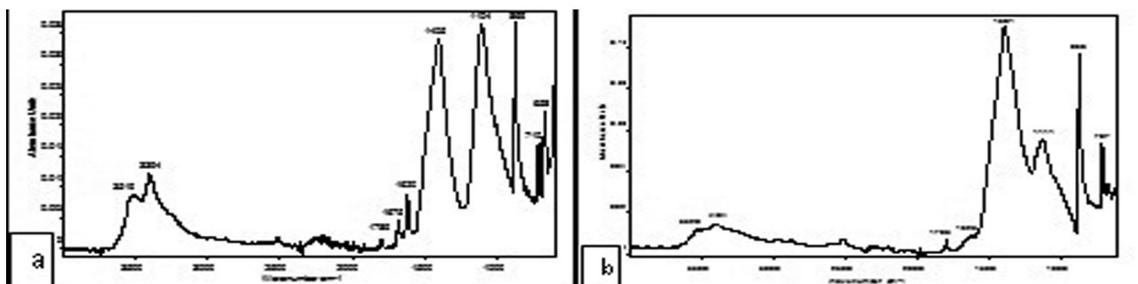


Figura 6. Espectros de absorción IR tras las pruebas de limpieza de eflorescencias con a) algodón y agua y b) con algodón más *Pseudomonas stutzeri*.

Así mismo, en el laboratorio testamos distintos tiempos de aplicación. En la bibliografía se observa que todas las pruebas de desnitrificación conllevan largos periodos de tiempo, alrededor de 30-96h, pruebas realizadas sobre materiales pétreos, no sobre *pintura mural*. En cuanto a los tratamientos de “*biolimpieza*” de cola sobre *pintura mural*, el equipo de Ranalli utiliza tiempos de entre 3 y 17h. Debido a que no es aconsejable realizar limpiezas acuosas sobre *pintura mural* durante tan largos periodos de tiempo decidimos hacer las pruebas en obra real a dos tiempos relativamente cortos: 1h 30' y 3h.

3.3. Pruebas de “*biolimpieza*” en obra real

Tras las múltiples pruebas previas en el laboratorio pasamos a hacer pequeñas pruebas de “*biolimpieza*” sobre la obra real. Las condiciones seleccionadas fueron: aplicación de solución acuosa de aproximadamente 10⁶ bacterias/ml de la cepa DSMZ 5190, durante 1h 30' y 3h, con soporte de algodón, aplicándolas sobre papel japonés para proteger la pintura y facilitar la eliminación del soporte.

El proceso de aplicación de las bacterias sobre el soporte de algodón, lo realizamos siguiendo el protocolo utilizado para la restauración de las pinturas murales arrancadas del Camposanto de Pisa por el equipo de Colalucci y Ranalli. Éste consiste en la aplicación de las bacterias resuspendidas en agua destilada sobre

	ASO ₄ (1105)/ACO ₃ (1395)	Porcentaje de sulfatos
Control	3,00	78%
Algodón + agua	0,86	60%
Prueba: algodón + bacterias	0,10	20%

Tabla 1. Valores correspondientes al cociente de área sulfato (banda 1105 cm⁻¹) vs carbonato (banda 1395 cm⁻¹), y su correspondencia en porcentaje de sulfatos en función de la curva patrón, de los controles y de las pruebas de *biolimpieza* con bacterias realizadas sobre las eflorescencias de las pinturas murales estudiadas

	ASO ₄ (1105)/A CO ₃ (1395)	Porcentaje de sulfatos	Aorgánico (2900+2800)/ACO ₃ (1394)
Control	0.97	61%	0.02
Prueba control: algodón + agua	0.02	10%	0.018
Prueba algodón + bacterias	0.05	6%	0.006

Tabla 2. Valores correspondientes al cociente de área sulfato (banda 1105 cm⁻¹) vs carbonato (banda 1395 cm⁻¹), y su correspondencia en porcentaje de sulfatos en función de la curva patrón, de los controles y de las pruebas de *biolimpieza* realizadas sobre las eflorescencias de las pinturas murales estudiadas. Y valores correspondientes al cociente de área orgánico (bandas 2900 más 2800 cm⁻¹) y área de carbonato (banda 1395 cm⁻¹)

el papel japonés con pincel, aplicación del algodón y sobre él la solución de bacterias empapando abundantemente el algodón. Trascurridas las tres horas se elimina el algodón y se limpia y seca el papel japonés con agua destilada y esponjas naturales. Una vez limpio y seco, se elimina el papel japonés con cuidado y se limpia la superficie pictórica de nuevo con agua destilada y esponja, eliminando de esta manera los posibles restos de bacterias, algodón o papel japonés que puedan haber quedado sobre la superficie pictórica (Ver figura 3).

Las pruebas realizadas fueron sobre zonas de 10cm² para cada prueba. En cada caso realizamos controles con agua destilada estéril, en lugar de bacterias y micro-tomas de muestras con bisturí, antes y después del tratamiento, para el análisis mediante FTIR. Tras el tratamiento realizamos toma de muestra mediante placas de contacto Rodac, para el análisis de los posibles restos de bacterias. Los resultados obtenidos, tanto en las zonas de tratamiento con bacterias como en las zonas de control con agua, fueron de entre 0-2 colonias por 25cm², por lo que el tratamiento no supone un peligro de incremento de biodeterioro sobre las pinturas murales.

Los resultados obtenidos a simple vista son espectaculares en el caso de la limpieza de las eflorescencias, observando una desaparición completa tras los tratamientos con bacterias, mientras que en los controles observamos restos de eflorescencias (Ver figura 4).

En cuanto a los tiempos de aplicación, no encontramos diferencias, por lo que con tiempos breves de una hora y media, podemos realizar una buena limpieza de eflorescencias sobre *pintura mural*. Estos resultados son muy interesantes al ofrecer tiempos mucho menores de los hallados en la bibliografía, donde se utilizan tiempos de alrededor de 30 horas, sobre materiales pétreos.

Los resultados obtenidos para la limpieza de cola sobre las pinturas murales arrancadas, a simple vista no son tan evidentes como en el caso de las eflorescencias, pero sin embargo, sí se observa una limpieza de la superficie pictórica, aunque no se aprecian grandes diferencias entre los controles y las pruebas de limpieza con bacterias. (Ver figura 5).

Para determinar de una forma analítica los resultados de las pruebas de *biolimpieza*, se realizaron análisis FTIR de todas las muestras tomadas, tanto de los controles como de las pruebas de limpieza con bacterias; prestando atención a las intensidades de bandas de absorción IR del nitrato potásico, del sulfato de calcio, del carbonato de calcio y de los compuestos orgánicos.

En el caso de las eflorescencias, en los espectros de absorción IR tras las pruebas de algodón con bacterias observamos que los sulfatos han disminuido respecto a las pruebas control: (Ver figura

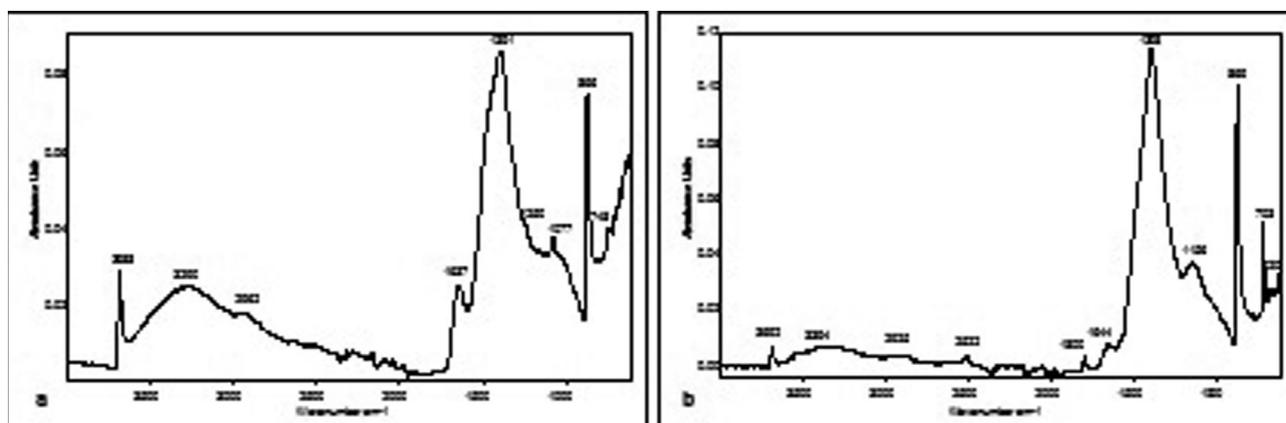


Figura 7. Espectros de absorción IR tras las pruebas de limpieza de cola a) del control: algodón con agua; y b) de la prueba de limpieza: algodón más *Pseudomonas stutzeri*

6). Sin embargo no observamos los picos de absorción de nitrato, probablemente porque se encuentren enmascarados bajo los picos del carbonato.

Para la obtención de aproximaciones semicuantitativas de las disminuciones de los sulfatos observadas, realizamos un procedimiento basado en el cálculo de los cocientes de área de banda de FTIR. Se selecciona la banda correspondiente a la vibración de tensión del grupo sulfato que aparece a 1105cm⁻¹ y la banda correspondiente al carbonato que aparece a 1395 cm⁻¹, por ser las dos bandas mayoritarias de ambos espectros de absorción. Para hacer este cálculo se divide la banda de sulfato (1105cm⁻¹) entre la de carbonato (1395 cm⁻¹), ya que se asume que el carbonato es el componente mayoritario al formar parte del *intonaco* y de la capa pictórica al fresco, y que su concentración es significativamente mayor a la del resto de componentes. En primer lugar se procede a la construcción de una curva de calibrado mediante el cálculo de los valores del cociente de área de banda de mezclas de carbonato-sulfato en diferentes concentraciones. Así se obtiene una curva de calibrado con carácter exponencial creciente.

Gracias a este análisis semicuantitativo podemos determinar cómo los sulfatos disminuyen en todos los tratamientos respecto al control donde encontramos un 78% de sulfatos. Obteniendo una disminución en todos los casos menor en los tratamientos con agua, respecto a los tratamientos con *bacterias*. En el caso del tratamiento control (algodón y agua), pasamos de un 78% de sulfatos en la zona sin tratar, a un 60% en la zona tratada con agua, y a un 20% en la zona tratada con *Pseudomonas stutzeri*. Observando una disminución de sulfatos de casi un 60% tras el tratamiento con *bacterias*.

En el caso de los restos de cola, en los espectros de absorción IR tras las pruebas de "biolimpieza", observamos las bandas características del carbonato, de arcillas (proveniente de restos de pigmento tierra natural) y de sulfatos aunque con bandas de mucha menor intensidad que en las zonas con eflorescencias. Sin embargo, los picos de absorción de cola aparecen con muy poca intensidad en todas las muestras tomadas (Ver figura 7), esto puede deberse a que los puntos seleccionados para el muestreo, no tenían grandes cantidades de materia orgánica, ya que el contenido en cola es altamente heterogéneo a lo largo de la superficie de los frescos arrancados.

Si observamos los cocientes de área de material orgánico vs área del carbonato, observamos en todos los casos un cociente de áreas menor después de los tratamientos respecto al control (TABLA 2). Si comparamos los tratamientos con agua y los tratamientos con *bacterias*, de nuevo observamos menor cantidad de cola tras la limpieza con *bacterias*.

En este caso, de pinturas arrancadas, la disminución que observamos de los sulfatos, podemos estimarla de una manera semicuantitativa.

Al realizar esta correlación podemos determinar la presencia de un 61% de sulfatos antes del tratamiento y observar cómo los tratamientos han disminuido el contenido en sulfatos, obteniendo un 10% de sulfatos tras el tratamiento de algodón con agua; y un 6% después del tratamiento de algodón con *bacterias*.

4. CONCLUSIONES

En función de los resultados obtenidos podemos concluir que la aportación más importante de esta investigación es el hecho de haber realizado satisfactoriamente, el primer estudio sobre limpieza de eflorescencias salinas en pinturas murales con *bacterias*, mostrando cómo la bacteria *Pseudomonas stutzeri* DSMZ 5190 elimina

eficientemente eflorescencias de nitratos y sulfatos, sobre pinturas murales en condiciones aeróbicas.

A partir de nuestros resultados podemos proponer el uso controlado de microorganismos como agentes de *biolimpieza*, lo que supone una reciente y eficiente forma de intervención en *conservación y restauración* de bienes culturales. Estos tipos de tratamientos son en muchos casos, más convenientes que los métodos tradicionales al ser inocuos y selectivos, al eliminar del fresco únicamente las sustancias no deseadas y no ser tóxicos.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a los párrocos de la Real Parroquia de los Santos Juanes de Valencia y a la dirección general de patrimonio por apoyar el estudio y *restauración* de las pinturas.

A Gianluigi Colalucci, Donatella Zari, Carlo Giantomasi y Giancarlo Ranalli y a la Primaziale Pisana por permitirnos visitar el Camposanto de Pisa y aprender de las novedosas técnicas de *restauración con bacterias* que allí están aplicando con gran éxito. A Laura Osete del I.R.P. por la realización de los análisis de GC/MS.

A los restauradores de la Iglesia de los Santos Juanes, en particular a José Juan e Irene Carpio por ayudarnos con los procesos de *biolimpieza*.

BIBLIOGRAFÍA

- Antonoli P., Zapparoli G., Abbruscato P. Sorlini C., Ranalli G., Righetti P.G. (2005) "Art-loving bugs: the resurrection of Spinello Aretino from Pisa's cemetery" *Proteomics*. 2453-2459.
- Bang S.S., Galinat J.K., Ramakrishnan V. (2001) "Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*" *Enzyme and Microbial Technology* 28 404-409
- Cappitelli F., Ranalli G., Zanardini E., Mello E., Sorlini C. (2005) "Biotreatment of salts in stone at Matera Cathedral" in: Conference on heritage, Microbiology and Science. University of Portsmouth, 29 June-2 July 2005, Portsmouth, UK: p.51
- Cappitelli F., Zanardini E., Ranalli G., Mello E., Daffonchio D. and Sorlini C. (2006) "Improved Methodology for bioremoval of Black Crusts on Historical Stone Artworks by Use of Sulfate-Reducing Bacteria." *Applied and Environmental Microbiology*, 3733-3737.
- Cappitelli F., Toniolo L., Sansonetti A., Gulotta D., Ranalli G., Zanardini E., and Sorlini C. (2007) "Advantages of using Microbial Technology over traditional Chemical Technology in Removal of Black Crusts from Stone Surfaces of Historical Monuments." *Applied and Environmental Microbiology*. 5671-5675
- Casanova Beviá I. (2008) "Limpieza de obra mural mediante el uso de *bacterias*". Tesis de Máster en conservación y restauración de Bienes Culturales de la U.P.V.
- Doménech Carbó M.T. y Yusa Marco D.J. (2006). "Aspectos físico-químicos de la pintura mural y su limpieza". Editorial U.P.V. ISBN: 84-9705-941-7
- Gauri K. L. and Chowdhury A.N., (1988) "Experimental studies on conversion of gypsum to calcite by microbes" Int J. Ciabach (ed). Proceedings of the 6th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone. 545-550. Nicolas Copernicus University Press, Toruń, Poland
- Lalucat J., Bannasar A., Bosch R., García-Valdés E., Palleroni N. (2006) "Biology of *Pseudomonas stutzeri*" *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70(2) 510-547

- Ranalli G., Matteini M., Tosini I., Zabardini E., Sorlini C. (2000) "Bioremediation of Cultural heritage: removal of sulphates, nitrates and organic substances" in: O. Ciferri, P. Tiano, G. Mastromei (eds). *Of Microbes and Art*. Kluwer Academic, New York, 231-245.
- Ranalli G., Belli C., Barachini C., Caponi G., Pacini P., Zanardini E. and Sorlini C. (2003a) "Deterioration and bioremediation of frescoes: A case-study" *Molecular Biology and Cultural heritage* ed. Sáiz-Jiménez, C. 243-246. Lisse, the Netherlands: A.A. Balkema Publishers.
- Ranalli G. and Sorlini C. (2003b) "Application of microorganisms for the deteriorated surfaces recovery" *Coalition* 6 (2) 2-4.
- Ranalli G., Alfano G., Belli C., Lustrato G., Colombini M.P., Bonaduce I., Zanardini E., Abbruscato P., Cappitelli F. and Sorlini C. (2005) "Biotechnology applied to cultural heritage: biorestitution of frescoes using viable bacterial cells and enzymes" *Journal of Applied Microbiology* 96 73-83
- Ranalli G., Sorlini C. (2007) "Il Biorisanamento". in *La biologia vegetale per in beni culturali Vol.I. Biodeterioramento e Conservazione*. A cura di: Giulia Caneva, Maria Pia Nugari, Ornella Salvadori. Nardini Editore
- Sáiz-Jiménez C. (1995) "Deposition of anthropogenic compounds on monuments and their effect on airborne microorganisms" *Aerobiologia* 11 (3) 161-175.
- Sorlini C. and Cappitelli F. (2008) "The application of viable bacteria for the biocleaning of Cultural heritage surfaces". *Coalition* 15.
- Zalbidea Muñoz M.A., Soriano Sancho P., Del Valle Bartolomé P. y Roig Picazo P. (2008) "Lunetos de la Iglesia de los Santos Juanes de Valencia: Proceso de Intervención". in: Preprints of the Papers to the Congress: 17th International Meeting on heritage Conservation. Castellón-Vila-Real-Burriana. 20-22 novembre 2008. 673-677

English version

TITLE: *Biocleaning tests with bacteria on mural paintings*

ABSTRACT: *Microorganisms have been considered agents causing biodeterioration of works of art. Nowadays they are however starting to be used for cleaning remains of organic compounds and salt crusts that are difficult to eliminate by traditional restoration methods. This work develops the use of Pseudomonas stutzeri for "biocleaning" mural paintings, for the purpose of eliminating remains of organic material from old restorations or insoluble saline efflorescence. To this end different strains of Pseudomonas stutzeri are used from type collections and different supports facilitating their direct application on real works. The methods obtained in the preliminary tests are experimentally applied on the mural paintings of Santos Juanes Church in Valencia.*

KEYWORDS: *"biocleaning", pseudomonas, bacteria, mural painting, restoration and conservation*