

*“Nada Sobre la tierra se pierde, todo se transforma”
(Antoine Laurent Lavoisier (1743-1794), Científico Francés)*

INDICE

1. Objetivos	Pág. 3
2. Plan de trabajo	Pág. 4
3. Introducción	Pág. 5
4. Desarrollo del trabajo	Pág.10
<u>4.1. Limpieza biológica. Estado de la cuestión</u>	<u>Pág.10</u>
4.1.1. Las Enzimas. Antecedentes de la limpieza con Bacterias.	Pág.10
<u>4.2. Bacterias utilizadas como agentes de limpieza en restauración</u>	<u>Pág.12</u>
4,2.1. Baterías reductoras de sulfatos (BRS	Pág.12
4,2.2. Bacterias que eliminan nitratos y materia orgánica	Pág.13
4,2.3. Metodología descrita en la bibliografía consultada	Pág.13
4,2.4. Comparativa entre bacterias y enzimas	Pág.18
<u>4.3. Pseudomonas.....</u>	<u>Pág.19</u>
4.3.1. Características.	Pág.19
4.3.2. Clasificación.....	Pág.20
4.3.3. Hábitats	Pág.21
4.3.4. <i>Ps. stutzeri</i>	Pág.21
4.3.5. Condiciones	Pág.22
4.3.6. Cultivo.....	Pág.22
5. Materiales y métodos	Pág.24
6. Resultados.....	Pág.45
7. Conclusiones	Pág.50
8. Bibliografía	Pág.51
9. Agradecimientos.....	Pág.54
10. Anexos	Pág.55

1. Objetivos.

- ✓ Profundizar en el conocimiento del uso de las bacterias para la limpieza de pinturas murales.
- ✓ Introducir mejoras en los sistemas de aplicación de la bacteria, partiendo de los estudios realizados por Giancarlo Ranalli.
- ✓ Comprobar la eficacia de dichas bacterias para la eliminación de colas y su interacción con la superficie.
- ✓ Desarrollo de la metodología de la aplicación de dicha bacterias.

2. Plan de trabajo

Esto se pretende llevar a cabo mediante el siguiente plan de trabajo:

1. Revisión bibliográfica.
2. Adquisición de las cepas de *Ps. Stutzeri* de las colecciones de cultivo tipo DSMZ 5190 y CECT 4899.
3. Precipitación y cultivo de las cepas liofilizadas para su utilización.
4. Cultivo en un medio líquido para obtener masa celular.
5. Aplicación a la probeta.
6. Retirada de los empacos y evaluación de los resultados.

3. Introducción

Esta investigación surgió a raíz de los trabajos realizados en Italia en el Camposanto de Pisa para la limpieza y recuperación de las pinturas murales arrancadas de Spinello Aretino mediante el uso de bacterias, que según los artículos consultados (Anexo I) dieron muy buen resultado.

El abordar la limpieza de una obra siempre es complicado, ya que se trata del proceso más comprometido de la restauración.

La limpieza se define como la remoción en la superficie de la obra de toda sustancia extraña a la propia naturaleza de la obra, pudiendo llegar a ser nociva para ésta, ya que no sólo afecta al aspecto estético, de legibilidad y apariencia, sino también a la estabilidad estructural de la obra pudiendo llegar a provocar reacciones químicas dañinas sobre la superficie.

Este aspecto es el que hace de la limpieza uno de los tratamientos de restauración más complicados y controvertidos debido a su cualidad de irreversibilidad, por lo que también es uno de los procesos de intervención más polémicos y criticados. Y por ello debe ser uno de los procesos de conservación más delicados ya que, lo eliminado no se puede reponer.

Uno de los términos más asociados a la limpieza es la pátina, la cual debe ser considerada siempre a la hora de abordar una limpieza, estableciendo una correcta separación entre la materia a eliminar y el original para evitar posibles abrasiones sobre el estrato pictórico.

Por todo esto, nos damos cuenta que la limpieza de una obra siempre es complicada y comprometida ya que, existe una polémica histórica sobre el cómo, cuando y hasta dónde llegar con dicho proceso.

Y al respecto, encontramos dos corrientes, que son:

- ✓ El planteamiento objetivo.
 - ✓ El planteamiento crítico.
1. El **planteamiento objetivo**. Por el cual se considera que la limpieza es una técnica de recuperación y por ello se debe eliminar del original todos los elementos que lo distorsionan. La meta de este planteamiento es la recuperación del estado original, atendiendo a una serie de preceptos, como son:
 - La comprensión rigurosa y objetiva de la ejecución de la estructura pictórica.
 - La identificación y calificación de las estructuras extrañas.
 - La desnitrificación del aspecto oscurecido de la pintura antigua y la confusión que pueden llegar a provocar términos como veladura, barniz y pátina.

- El reconocimiento de que el barniz sólo tiene función de protector.
- La creencia de que los procedimientos utilizados son fiables y que si no lo fueran la pericia de los restaurados lo subsana.

De la aplicación de estas posturas surge la llamada **limpieza integral**, que defiende que los barnices oscurecidos, repintes y cualquier material ajeno al original deben ser eliminados.

2. El **planteamiento crítico** que surge de la teoría de la restauración de Brandi¹ al reconocer la obra de arte, en su consistencia física y en su doble polaridad estética e histórica. Sus criterios son, que:

- La limpieza se entiende como apoyo a los estudios históricos y estéticos sin confiar tanto en la ayuda científica.
- El barniz no es considerado como algo ajeno a la obra de arte sino como algo que forma parte de la misma y de su historia.
- La limpieza realizada con disolventes no es inocua para la obra de arte.

Este concepto terminará desembocando en la llamada **limpieza parcial**. Teniendo en cuenta que las intervenciones sobre cualquier obra son irreversibles una intervención parcial nos dará margen para que puedan realizarse intervenciones futuras.

En esta misma línea encontramos la llamada **limpieza selectiva** en la cual se defiende una eliminación no homogénea del barniz dependiendo de la función que tenga éste con el equilibrio total de la obra.

Con todo esto podemos concluir, que la técnica a utilizar en la limpieza de una obra y la filosofía en la que nos basamos para seleccionar el método de limpieza se asientan en el conocimiento de tres elementos, que son:

- La técnica pictórica.
- La sustancia a eliminar.
- Y el estado de conservación.

Y del conocimiento de estos tres elementos surgirá el método de restauración.

Podemos encontrar muchos sistemas y materiales utilizados para la limpieza de las superficies pictóricas. Dichos sistemas se pueden clasificar en:

- Sistemas de limpieza no acuosos.
- Sistemas de limpieza acuosos.

¹ BRANDI; C. Teoría de la restauración. Madrid: Alianza Editorial, 1998, p.15

Los métodos físico-químicos los podemos aplicar a:

Pincel.

Hisopo.

Esponja.

Por vaporización.

Por empaco. Este método nos proporciona:

- Que el disolvente se aplique en un material “soportante”.
- Reblandece las películas insolubles.
- Reduce la acción mecánica.
- Permite prolongar el tiempo de contacto del reactivo.
- Nos permite regular la cantidad de reactivo.

Por tampón. Que nos permite:

- La acción directa del disolvente sobre un área de poca extensión.
- Precisa de una continua acción mecánica.
- El tiempo de contacto de los reactivos son breves.
- Este método no nos permite controlar la cantidad de reactivo.
- La operación se suele realizar a pincel, esponja o hisopo de algodón.
- Este método es aconsejable para materiales en suspensión.

Medios que modifican las cualidades de una sustancia acuosa:

Espesantes:

Son sustancias macromoleculares que se pueden mezclar con agua o disolventes orgánicos formando soluciones de una alta viscosidad.

Suele utilizarse para modificar la densidad de los disolventes, poder controlarlos y trabajar en áreas pequeñas.

Soportantes:

Estos no forman geles verdaderos, sino emulsiones o empastos como la sepiolita, el papel, el papel japonés, etc.

Comparativa entre los Métodos de limpieza a Seco y los Físico-Químicos

Sistemas de limpieza	Ventajas	Desventajas
Sistema no acuosa o seco	<p>No aporta humedad.</p> <p>No disuelve nada.</p> <p>Los materiales no interaccionan.</p> <p>Desprenden sedimentos.</p>	<p>Pueden erosionar la superficie.</p> <p>Algunos de estos medios tienen infraestructuras complicadas.</p> <p>Es difícil de controlar.</p> <p>No es selectivo.</p> <p>Se trata de un trabajo mecánico.</p>
Sistema Físico-Químico	<p>Disuelve total o parcialmente sobre la superficie porosa.</p> <p>Permite la acción directa sobre un área concreta.</p> <p>Tiempos de contactos cortos.</p> <p>Permiten la eliminación de la suciedad sin demasiada acción mecánica.</p>	<p>Disuelve total o parcialmente sobre la superficie porosa.</p> <p>Sobre superficies porosas puede provocar interacciones Físico-químicas con los materiales pictóricos.</p> <p>La limpieza no es homogénea por toda la superficie de la obra.</p>

Ventajas e inconvenientes entre los disolventes y los sistemas acuosos

Sistemas Físico-químicos	Ventajas	Inconvenientes
Disolventes	<p>Acelera la disolución de la suciedad.</p>	<p>Tóxico para el ser humano.</p> <p>Difícil de controlar.</p> <p>Posibles interacciones con los materiales de la obra.</p>
Sistemas acuosos	<p>Acelera la disolución de la suciedad.</p>	<p>Interacción del agua con distintos materiales.</p> <p>Interacción del agua con el disolvente.</p>

A todos estos sistemas, lo que les pedimos, sobre todo a los acuosos, es que sean selectivos a la hora de eliminar la suciedad de la obra para que tengan una acción localizada.

Y para evitar la acción superficial se le puede añadir tensoactivos.

Después de esta breve introducción a los sistemas de limpieza aplicados en pintura mural, podemos concluir que hay elementos ajenos a la obra, sustratos a eliminar, que son difícilmente eliminables con cualquiera de los métodos expuestos, o bien, al eliminar dichos elementos, eliminamos también elementos constituyentes de la obra.

Como hemos visto, el láser es un método muy selectivo, pero hoy, contamos con otros sistemas de limpieza igualmente selectivos, como son la aplicación de enzimas o bacterias.

Esta investigación, como se ha adelantado en el capítulo de objetivos, se centra en el estudio del uso de bacterias como método de limpieza. Para ello haremos un pequeño repaso del uso de enzimas, pues supone el antecedente al uso de las bacterias en nuestro campo.

4. Desarrollo del trabajo

4.1. La limpieza biológica: Estado de la cuestión

4.1.1. Las Enzimas. Antecedentes de la limpieza con Bacterias.

En los últimos años se ha estado investigando y experimentando con nuevos métodos acuosos basados en la presencia de principios activos de origen biológico.

Y dentro de estos nuevos métodos encontramos:

- La limpieza biológica con enzimas.
- La limpieza biológica con bacterias.

Como ya hemos mencionado con anterioridad una de las cualidades que necesitamos de los sistemas de limpieza es que sean selectivos a la hora de eliminar la suciedad y estas nuevas tecnologías de limpieza son interesantes precisamente por este aspecto, por su gran selectividad, ya que actúan sobre sustancias y materiales muy específicos.

Las enzimas son proteínas extraídas y aisladas de los sistemas biológicos en los que operan y actúan como catalizadoras², es decir son capaces de acelerar las reacciones bioquímicas de transformación de un sustrato concreto y en relación a ese sustrato se suelen seleccionar.

La actividad de una enzima queda afectada por la temperatura, el pH, la concentración del sustrato y algunos otros factores físico-químicos.

Tradicionalmente se clasificarían según el tipo de acción que catalizan, como por ejemplo:

- Oxido-reductoras: son enzimas de oxidoreducción.
- Transferasas: son las que aceleran el paso de ciertos grupos de un sustrato a otro.
- Hidrolasas: son las que hidrolizan determinadas moléculas. Son las utilizadas en restauración.
- Isomerasas: intervienen en el proceso de reconversión estructural de algunas moléculas.

En concreto las empleadas en sistemas de limpiezas de obras de arte son las hidrolasas: proteasas, lipasas, amilasas, dependiendo de la naturaleza del sustrato a hidrolizar.

El uso de las enzimas en la limpieza de pintura mural no se halla muy extendido y son pocas las referencias bibliográficas que relatan su empleo.

² Las acciones catabólicas liberan energía.

Por ejemplo, en:

G. Ranalli³ y otros experimentan para la eliminación de residuos de cola animal con cinco clases de enzimas. Dos de ellas son dos tipos de proteasa (extraídas de dos sistemas biológicos diferentes). Las proteasas son adecuadas para la remoción de sustancias proteínicas. Otra de las enzimas utilizadas en este estudio es la lipasa, que es apropiada para la eliminación de productos grasos, óleo, ceras e incluso resinas sintéticas. Además de estudiarse la colagenasa que es otra variante de la proteasa tratándose de una enzima proteasa gástrica.

En otro estudio⁴, menos satisfactorio, se han obtenido algunas conclusiones, que son:

- Para la eliminación de colas en probetas y bajo condiciones de laboratorio ha funcionado la proteasa.
- Para la eliminación de huevo se utilizaron tanto proteasa como la lipasa y con la única, que obtuvieron algún tipo de resultado, fue la lipasa aunque no demasiado bueno.
- También se observó que las caseínas se hidrolizan ligeramente con la proteasa, reblandeciéndola.
- Se observó, que para la pintura a caballete los tiempos de contacto eran cortos y para la pintura mural dichos tiempos se alargaban, incluso hasta 30 minutos.

También Paolo Cremonesi⁵ ha estudiado sobre el tema: emplearon la enzima proteasa Alcalina de Phase para la eliminación de un empapelado de protección aplicado con cola animal o restos de cola en unos murales arrancados.

Dicha enzima se aplicó espesada, se cubría con Melinex y se dejaba actuar durante 30 minutos. Posteriormente se lavaba la zona con tensoactivo y agua tras su aplicación. Y el tratamiento se realizó en verano a una temperatura de 30°C.

Otro estudio de la aplicación de la misma enzima, que se menciona en el mismo libro, se realizó para el reblandecimiento de un repinte de caseína sobre un fresco. Tras 20 ó 30 minutos de contacto y con la superficie del muro calentada artificialmente se procedía a la eliminación mecánica del repinte.

Y por último el estudio con una proteasa básica consistió en la eliminación de una cola animal empleada como consolidante en una pintura mural realizada al óleo.

³ G. Ranalli, G. Alfano, C. Belli, G. Lustrato, M.P. Colombini, I. Bonaduce, E. Zanardini, P. Abbruscato, F. Cappitelli and C. Sorlini; 2003-2004; Biotechnology applied to cultural heritage: biorestitution of frescoes using viable bacterial cells and enzymes. Journal of Applied Microbiology 2005, 98, 73-83.

⁴ AAVV. Scienza e beni Culturali XXI 2005, Cap: Gli enzima: limiti e potenzialita nell campo Della pulitura delle Pitture murali⁴, Cristina Todazo.

⁵ Paolo Cremonesi; 1999; L'uso degli enzima nella pulitura di opera policrome, Il prato, 2002.

4.2. **Bacterias**

La utilización de bacterias para la limpieza de obras de arte ha surgido a raíz de las investigaciones realizadas por un equipo de la Universidad de Milán que ha trabajado en los frescos del claustro del Camposanto de Pisa (noroeste).

Se trata de “Conversione di Sant’Efigio e battaglia”, unas pinturas murales ejecutadas en el s.XIV por Spinello Aretino que forman parte de un monumental ciclo muy deteriorado por el paso del tiempo, la acción bélica y por su posterior extracción del muro.

Dicha extracción fue por arranque mediante la técnica del *strappo*. El adhesivo utilizado para este proceso se endureció hasta el punto de afectar a los pigmentos e impedir que las pinturas fueran despegadas de las telas utilizadas para el arranque.

Para separar las pinturas del lienzo se intentó emplear tanto medios mecánicos como medios físico-químicos. Pero estos métodos tradicionales de limpieza no resultaban efectivos sino, al contrario.

Debido a esto fue cuando se pensó en el empleo de bacterias para su restauración, con muy buenos resultados⁶.

Las bacterias con las que se está experimentando en el campo de la restauración en estos momentos son de dos tipos:

4.2.1. **Bacterias reductoras de sulfatos (BRS)**. Y dentro de estas se estudian:

- Desulfovibrio DSMZ63, para la desulfatación en obras de arte.
- *D. desulfuricans* ATCC 13541, para la desulfatación en obras de arte.
- *D. vulgaris* ATCC 29577, para la desulfatación en obras de arte.
- *D. vulgaris subps. vulgaris* ATCC 29579 para la desulfatación en obras de arte.

Se trata de unas bacterias de crecimiento anaeróbico⁷ que es también un modo de clasificación de ciertas bacterias ya que responde a su necesidad de oxígeno o no.

Estas bacterias reducen los sulfatos en suelos anegados y aguas residuales al transformarlos en sulfato de hidrógeno.

⁶ Paolo Antonioli, Giacomo Zapparoli, Pamela Abbruscato, Claudia Sorlini, Giancarlo Ranalli and Pier Giorgio Righetti; Art-loving bugs: 2005; The resurrection of Spinello Aretino from Pisa’s cemetery; Proteomics 2005, 5, 2453-2459.

⁷ Se trata aquellas bacteria que no necesitan o no precisan de la presencia de oxígeno para sobrevivir.

Una de sus características es que las BRS están representadas tanto por microorganismos heterótrofos como autótrofos además de ser anaeróbicas obligatorias.

4.2.2. Bacterias reductoras de nitratos. Y dentro de éstas encontramos:

- *Pseudomonas aeruginosa* RZ 94, para la desnitrificación y eliminación de materia orgánica en obras de arte.
- *Pseudomonas stutzeri* GB 94, para la desnitrificación y eliminación de materia orgánica en obras de arte.
- *Pseudomonas stutzeri* A29, para la desnitrificación y eliminación de materia orgánica en obras de arte.

4.2.3. Antecedentes de la limpieza con Ps. *Stutzeri*:

En los estudios publicados de Antonioli y otros (2005), seleccionaron la cepa en relación tanto a su alta actividad tanto metabólica como de “reproducción”.

Dichas bacterias a seleccionar, se pueden obtener de muy diversas maneras:

- Se pueden obtener a través de las colecciones Internacionales de cultivo tipo (bacterias, levaduras y mohos de ATCC, DSMZ, CBS, etc).
- O por aislamiento de los hábitats diferentes (suelos, aguas residuales o muestras del patrimonio cultural).
- O extraerla de una actividad metabólica específica (como es nuestro caso).

Para establecer condiciones de los microorganismos se tienen en cuenta factores como:

- El pH.
- El medio y las fuerzas iónicas del medio.
- Las condiciones (que en este caso como ya hemos mencionado con anterioridad deben ser anaeróbicas).
- La viscosidad que interviene en el proceso de cristalización de biopolímeros.
- La higrometría necesaria para el desarrollo de las mismas.
- Las fuentes de energía.
- Los carbones.

- Es importante obtener las condiciones metabólicas óptimas en laboratorio porque si no, en el exterior no funcionaría.

Una vez seleccionadas las cepas, se selecciona el portante considerando:

- Que sea inerte para no interferir con el metabolismo de la bacteria.
- La capacidad de proporcionar una buena y adecuada hidratación sin interferir en el sustrato por el lanzamiento de iones con los procesos metabólicos de las bacterias.
- Debería ser fácil de eliminar.
- No debe modificar ni química, ni física, ni cromáticamente la obra.
- Debería de dejar pasar la bacteria y evitar las precipitaciones residuales (lo que evitaría el manchado de la superficie).
- Nos debería proporcionar un buen contacto entre las células y la superficie a tratar.
- También debería permitir la remoción después de su aplicación.
- Debería ser capaz de mantener unos ciertos niveles de células viables además de un número elevado.
- Tendría que mantener una buena actividad microbiana en la matriz.

Hay que tener cuidado con:

- Manchar la superficie.
- Con la posible corrosión que podemos provocar debido al metabolismo de las bacterias que se podría evitar a través de la eliminación de los subproductos en nuestras bacterias en concreto debería evitar la precipitación de hierros.

Los tipos de portantes⁸ investigados fueron:

- Sepiolita:

Según su ficha: Arcilla absorbente utilizada como carga inerte en la preparación de papetas de limpieza, para superficies pétreas y frescos, a las cuales confiere propiedades soportantes y absorbentes.

Como portante para bacterias, según Francesca Cappitelli (2006): se trata de un material que debe ser colonizado por la bacteria antes de su aplicación.

Tardan en colonizar este material entre 10 a 14 días.

Nos permite un buen contacto con la superficie.

Se trata de un material inorgánico, aunque no evita la precipitación del hierro y con ello la formación del sulfuro de hierro.

- Carbogel:

Según su ficha: El Carbogel, es el resultado de una investigación efectuada sobre productos condensantes para papetas, formado por ácido poliacrílico neutralizado, que permite la preparación de un gel con el simple añadido de agua, y cuya viscosidad puede variarse a placer. Es suficiente una cantidad variable del 0,5 al 4% en peso de Carbogel en solución acuosa para obtener un gel de alta viscosidad, particularidad que resuelve los problemas de eliminación del soporte por los geles utilizados hasta ahora, ligados también a la cantidad de materiales sólidos en juego. Carbogel tiene una alta capacidad de retención de agua, por lo que evapora en tiempos muy largos. El ácido poliacrílico modificado Carbogel puede adicionarse a las papetas de pulpa de papel y a las clásicas soluciones de amonio carbonato o bicarbonato, EDTA, etc.

Como portante para bacterias, según los artículos de Francesca Cappitelli (2006): Se trata de un material en el cual, se debe encerrar la batería durante la formación del gel.

Se trata de un gel orgánico.

- Hidrobiogel- 97:

Según su ficha: No se encuentran referencias.

Como portante para bacterias, según los estudios que se han hecho de este soportante con bacterias de Francesca Cappitelli (2006): se trata de un material en el cual se debe encerrar la batería durante la formación del gel.

⁸ Francesca Cappitelli, "Improved methodology for bioremoval of Historical stone artworks by use of sulphate-reducing bacteria. (2006)":

Se trata de un gel orgánico.

El uso y tiempo de contacto del tratamiento se debe considerar en relación a diversos factores, como son:

- La naturaleza de la materia tanto de la obra a intervenir como del material a eliminar.
- La composición química tanto del material de la obra como de la materia a eliminar.
- El grosor de la materia a eliminar.
- La localización de dicha materia a eliminar (interior, exterior o sobre una zona importante de la obra) que quedaría ubicada a través de un mapa de daños.
- El clima de la zona y temperatura (convendría un estudio climático y de las variaciones de temperatura tanto si es dentro o fuera, para poder prever cómo “reaccionarían” las bacterias).
- La uniformidad de la costra que se quiera eliminar.
- La contaminación atmosférica.
- También depende de la concentración de la biomasa.
- Del contacto con la superficie, por lo que es importante el portante.

Los tiempos suelen ser largos. Aunque los tiempos de un tratamiento se suelen evaluar para la eficacia del proceso biológico.

La aplicación de los microorganismos puede ser:

- Aerosol.
- Empaco.
- Compresión.
- Cepillado.
- Pincel.
- Esponja.
- Hisopo.

El método de aplicación depende de:

- El tipo de alteración.
- El material sobre el que se aplica.
- La localización de las áreas donde se aplica el tratamiento.
- El tamaño de las mismas.

- La actividad metabólica de los organismos seleccionados (si son anaeróbicos o aeróbicos).
- La estructura del material de la obra y su estado.

Se debe tener cuidado porque se puede provocar:

- La corrosión de los materiales como consecuencia de una acidificación de la superficie después de un tratamiento prolongado.

Por lo que se debería establecer una comisión técnica para el uso en restauración de dicha metodología de trabajo.

Se debería hacer una estricta supervisión de los procesos biológicos durante el tratamiento.

Se deberían de evitar los procesos metabólicos indeseados.

Se debe retirar cuidadosamente los residuos de los procesos biológicos y microflora.

Y se debería definir una estrategia apropiada respecto a la actuación y protección de la obra.

Metodología de aplicación:

- Tendremos que humedecer la zona donde aplicamos las bacterias.
- Tras lo cual se cubrirá la zona con Tissue antes de cualquier aplicación, que nos permitirá un mejor retiro después del tratamiento.
- Debería dar el mismo tiempo de contacto tanto a las muestras sobre obra real como las de laboratorio como en la muestra control (que no tenga sulfatos).
- Tendremos que asegurarnos que tienen más o menos las mismas condiciones todas las pruebas.
- Si tras la aplicación cubrimos ésta con una película de cloruro de polivinilo reduciremos la evaporación indeseada del agua además de reducir el oxígeno y mejorar la capacidad de la bacteria para quitar sulfatos.
- Debemos controlar el medio portante y las células viables a través de un kit enzimático.
- Tras el retiro de la superficie y con la superficie aún mojada retiraremos el material residual, ya ablandado con un ligero cepillado.

Metodología de eliminación de los mismos.

El proceso de eliminación de las bacterias tras su aplicación sería:

- Un retiro mecánico suave.
- Seguido por un proceso de limpieza con agua desmineralizada o mejor estéril.
- También podrían utilizarse biocidas o tensoactivos (si fuera necesario).
- Y se podría utilizar antibióticos para su eliminación.

También debemos tener cuidado con los posibles contratiempos, por una mala eliminación de las mismas.

4.2.4. Ventajas y desventajas de las bacterias y enzimas:

Ventajas	Desventajas
<p>Ninguno de los dos métodos es tóxico para el ser humano.</p> <p>Nos ahorra el uso de disolventes nocivos para el ser humano.</p> <p>Son selectivos, a la hora de la eliminación de suciedades distintas.</p> <p>Sencillos de eliminar tras su aplicación.</p> <p>Más baratas de obtener que las enzimas (según: <i>Biotechnology applied to cultural heritage: biorestauration of frescoes using viable bacterial cells and enzymes</i>, G. Ranalli -ver Anexo I-).</p>	<p>Las enzimas necesitan tiempos más cortos de contacto pero a la hora de obtenerlas son más caras que las bacterias (según: <i>Biotechnology applied to cultural heritage: biorestauration of frescoes using viable bacterial cells and enzymes</i>, G. Ranalli -ver Anexo I-).</p> <p>Las bacterias por el contrario son baratas pero necesitan tiempos de contacto más largos (según: <i>Biotechnology applied to cultural heritage: biorestauration of frescoes using viable bacterial cells and enzymes</i>, G. Ranalli -ver Anexo I-).</p> <p>Al tratarse de medios acuosos debemos tener cuidado con la movilización de las sales de la superficie de la obra.</p> <p>También deberemos tener cuidado con la aparición de hongos (sobre todo con los tiempos de contacto largos).</p> <p>Tendremos que vigilar a las bacterias y enzimas que pueden reaccionar en los medios ácidos.</p>

4.3. *Pseudomonas*

Las bacterias que vamos a utilizar para nuestra investigación pertenecen al género *Pseudomonas* y encontramos las cepas de *Ps. Stutzeri* ya que, ha sido la utilizada en todos los estudios citados en el Anexo I.

Es fácil su cultivo *in vitro* y ampliamente disponibles en número, por lo que ciertas cepas son excelentes para investigaciones científicas.

Se trata de una bacteria de crecimiento aeróbico⁹ estricto aunque en algunas ocasiones puede utilizar nitratos como aceptadores de electrones.

Pertenece a un género de bacilos¹⁰ rectos o ligeramente curvados, Gram negativos¹¹, oxidasa¹² positivos.

No forman esporas y es común la presencia de plásmidos.

También son heterótrofas en condiciones anóxicas utilizando el sustrato orgánico como fuente de carbono.

Con el reciente análisis de secuencias del RNAr 16S se ha definido la taxonomía de muchas especies bacterianas y como resultado, el género *Pseudomonas* incluye algunas cepas clasificadas anteriormente dentro de las *Chryseomonas* y *Flavimonas*. Otras cepas clasificadas previamente en el género *Pseudomonas*, ahora son agrupadas en los géneros *Burkholderia* y *Ralstonia*.

4.3.1. Características:

Los miembros de este género generalmente son móviles gracias a uno o más flagelos polares que poseen.

Son catalasas¹³ positivas y no forman esporas.

Dentro de este género algunas son patógenas.

Las especies de *Pseudomonas* son típicamente oxidasa positivas, con ausencia de formación de gas a partir de glucosa, son hemolíticas (en agar sangre), prueba del indol negativas, rojo de metileno negativas y Voges Proskauer negativas.

⁹ Se denomina aerobios a los organismos que necesitan del oxígeno diatómico para vivir o a los procesos que lo necesitan para poder desarrollarse.

¹⁰ Los bacilos son bacterias que tienen forma de bastón, cuando se observan al microscopio.

¹¹ En microbiología, se denominan bacterias Gram negativas a aquellas bacterias que no se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram: de ahí el nombre de "Gram-negativas" o también "gramnegativas". Esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular, por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana.

¹² Una oxidasa es una enzima que cataliza una reacción de oxidación/reducción envolviendo oxígeno molecular (O₂) como aceptor de electrones. En estas reacciones el oxígeno se reduce a agua (H₂O) o a peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

¹³ La catalasa es una enzima que se encuentra en organismos vivos y cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en oxígeno y agua.

Este género es uno de los más proclives a la degradación de compuestos orgánicos; esta condición es la que nos interesa para nuestro estudio.

4.3.2. Clasificación científica¹⁴:

Reino: Bacteria.

Filo: Proteobacteria.

Clase: Gamma Proteobacteria.

Orden: Pseudomonadales.

Familia: Pseudomonadaceae.

Género: *Pseudomonas* (Migula, 1894).

Especies:

- *P. aeruginosa*
- *P. fluorescens*
- *P. fragi*
- *P. putida*
- *P. syringae*
- *P. denitrificans*
- *P. oleovorans*
- *P. phaseolica*
- *P. stutzeri*
- *P. pseudoalcaligenes*
- *P. mallei*
- *P. maltophilia*
- *P. acidovorans*
- *P. alcaligenes*
- *P. testosteroni*
- *P. vesicularis*, etc

¹⁴ <http://es.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas>
(13:21)19-septiembre-08

4.3.3. Hábitats:

Se han aislado bacterias de este género tanto en suelos limpios como en suelos contaminados por productos biogénicos y xenobióticos¹⁵.

También son microbiota predominante en la rizosfera¹⁶ y en la filosfera de plantas.

Del mismo modo, se han aislado de ambientes acuáticos, tanto de agua dulce como de aguas marinas.

En general inocuas para el hombre también existen: patógenos oportunistas como *P.aeruginosa*; patógenos de animales y patógenos de plantas como *P.syringae*.

La ubicuidad de las bacterias del género **Pseudomonas** y su capacidad para explotar una amplia variedad de nutrientes refleja un sistema de adaptación al medio ambiente que no se encuentra en bacterias de otros géneros.

4.3.4. Pseudomona stutzeri:

Microorganismo común en diversos hábitats.

Ha recibido una especial atención debido a sus especiales capacidades metabólicas como degradador de compuestos aromáticos (García-Valdés et al., 1988).

Se han diseñado métodos moleculares que permiten la identificación y el seguimiento de *P. stutzeri* en muestras naturales.

La identificación de *P. stutzeri* se consiguió utilizando cebadores específicos para amplificar el gen rDNA 16S seguido por el análisis RFLP ("restriction fragment length polymorphism") al tratar los productos de PCR con la endonucleasa BamHI. Por otra parte, se han utilizado métodos moleculares de tipado basados en la amplificación por PCR con cebadores para secuencias consenso derivadas de regiones invertidas repetidas palindrómicas altamente conservadas encontradas en enterobacterias (ERIC).

¹⁵ La palabra xenobiótico deriva del griego "xeno" ("extraño") y "bio" ("vida"). Se aplica a los compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados por el hombre en el laboratorio. La mayoría han aparecido en el medio ambiente durante los últimos 100 años.

¹⁶ La rizosfera es una parte del suelo inmediata a las raíces donde tiene lugar una interacción dinámica con los microorganismos. Las características químicas y biológicas de la rizosfera se manifiestan en una porción de apenas 1 mm de espesor a partir de las raíces.

Finalmente, se ha utilizado un método de Western Blot y "fingerprinting" inmunológico para la diferenciación de las cepas de *P. stutzeri*.

4.3.5. Condiciones que influyen en su actividad metabólica y porqué.

El género demuestra una gran diversidad metabólica, y consecuentemente son capaces de colonizar un amplio rango de nichos ecológicos.

Es fácil su cultivo *in vitro* y ampliamente disponibles en número, por lo que ciertas cepas son excelentes para investigaciones científicas.

Las cepas del género *Pseudomonas* son capaces de procesar, integrar y reaccionar a una amplia variedad de condiciones cambiantes en el medio ambiente, y muestran una alta capacidad de reacción a señales físico-químicas y biológicas.

Se han descrito cepas capaces de adquirir resistencia a metales pesados, disolventes orgánicos y detergentes, lo cual les permite explotar una amplia gama de fuentes de carbono como nutrientes, así como colonizar ambientes y que difícilmente son colonizables por otros microorganismos. Por ello no es sorprendente que se considere a las bacterias del género *Pseudomonas* un paradigma de versatilidad metabólica, y microorganismos claves en el reciclado de materia orgánica, en los compartimentos aeróbicos de los ecosistemas, jugando, por tanto, un papel esencial en la mejora y el mantenimiento de la calidad medioambiental.

Además de su uso en biodegradación las especies del género *Pseudomonas* se emplean en distintos procesos industriales, tales como la fabricación de bioplásticos o en técnicas de biocontrol. La posición taxonómica de las distintas especies del género se encuentra sujeta a revisión.

4.3.6. Cultivo:

Las *Pseudomonas* crecen en medios simples.

En caldo crecen abundantemente formando un anillo y un sedimento de color verde azulado.

En agar simple forman colonias brillantes, confluentes, de borde continuo y a veces ondulado con un centro opaco. Los pigmentos se difunde en el medio dándole tonalidad. Este pigmento tiene cualidades bactericidas sobre otras bacterias Gram positivas y Gram negativas.

El medio de cultivo empleado para *Ps. stutzeri* según bibliografía como base es: M9 (Mineral).

El Biofilm¹⁷ y su importancia:

Definición: Estructuras complejas de poblaciones heterogéneas. Estas estructuras están moldeadas por el medio físico, fisiológico y genético en el cual se encuentran las poblaciones microbianas.

Características del Biofilm:

1. Estado más habitual de las bacterias en la naturaleza. Superficies como el lugar preferencial para el crecimiento.
2. Células adheridas a superficies. Embebidos en matriz polisacárido (producida por los propios microorganismos). Compuestos por constituyentes orgánicos e inorgánicos.
3. Se forman en múltiples etapas. Crecimiento estructurado. A menudo con arquitecturas complejas.
4. Colonias o comunidades normalmente mixtas.
5. Gradientes físico-químicos dentro de los biofilms maduros, resultan en un gran número de microambientes potenciales dentro de un área muy pequeña.
6. Presentan características fenotípicas diferentes que sus equivalentes planctónicos.
7. Muy resistentes a los antibióticos y desinfectantes.
8. Implican comunicación célula a célula.
9. Biofilms maduros pueden contener alrededor de 10^{10} células/ml. Parte de las células se liberan y pasan al agua.

Ventajas y desventajas del Biofilm:

1. Ambiente resguardado.
2. Protección frente a tóxicos y biocidas.
3. Interacción entre microorganismos.
4. Mejor captación de nutrientes.
5. Metabolismo más activo.
6. Mayor crecimiento.
7. Posibilidad de intercambio de material genético.
8. Intercambio de metabolitos.

¹⁷Grupos de células (bacterias) normalmente en poblaciones mixtas (comunidades), que se adhieren a una superficie y forman una estructura en 3 dimensiones, unida por sustancias poliméricas extracelulares (matriz de polisacáridos) producidas por ellos mismos.

5. Material y Métodos.

5.1 Preparación de las probetas:

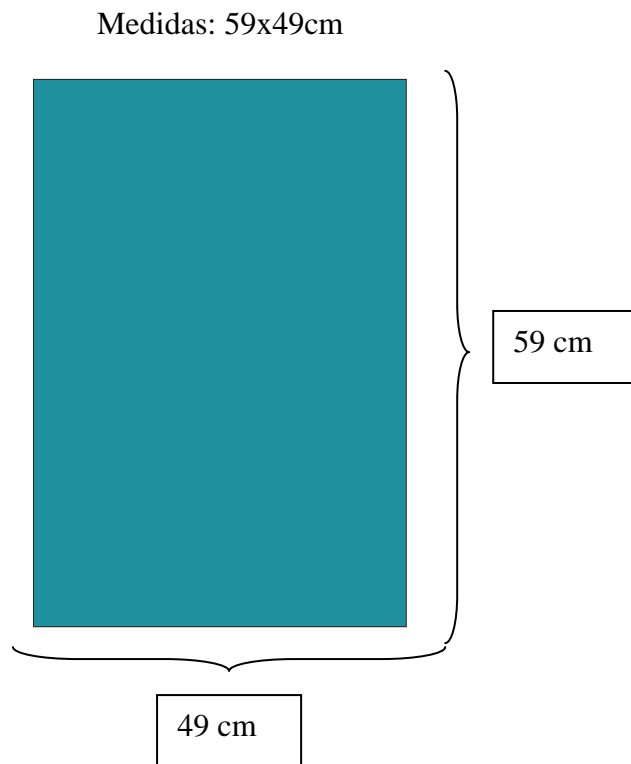
- ✓ 10 losetas color crema de Mayólica de 10x10.
- ✓ Balanza digital
- ✓ Cámara digital compacta (BENQ, DC E300, 4x Digital zoom).
- ✓ Agua Destilada.
- ✓ Cola Zurigo (cola fuerte de carpintero)
- ✓ Eye-one (medición del blanco).
- ✓ Tabla de yeso preparada con motero de cal.
- ✓ Paletina.
- ✓ Etiquetas.
- ✓ Regla.
- ✓ Calculadora.
- ✓ Cinta de reserva.

Preparación de la cola para su aplicación:

Hidratación de la cola (1 parte de cola por 3 de agua destilada) en la proporción empleada para efectuar arranques por medio de *strappo*. Y a esta proporción le añadimos medio litro más de agua destilada.

La cantidad de cola para hidratar es de 92'5 g con 276 g de agua destilada más 500 ml para conseguir la textura de trabajo, consiguiéndose una cola de trabajo al 10%, con un pH = 7.

La tabla de yeso con mortero de cal:



División de la tabla de yeso con mortero de cal:

1	2	3	4
5	6	7	8
9	10	11	12
13	14	15	16
17	18	19	20



Tamaño de las cuadrículas:

Las 4-8-12-16-20. Miden 10x12'7cm

El resto mide 10x10 cm

Aplicación de la cola:

La cola se ha aplicado mediante paletina sobre la superficie.

Antes y después de cada aplicación se pesa la cola en el balanza digital, de esta manera podremos saber la proporción de cola aplicada por centímetro cuadro (cm^2).

Hemos aplicado en cada una de las 20 porciones $\sim 0'12\text{g}$ por cm^2 .

Las losetas de mayólica crema:

10 losetas
Medidas: 10x10cm
Numeradas por el reverso



Medición de blanco de la tabla (Eye-one)

Se ha empleado el espectrofotómetro Eye-one para medir el blanco de las losetas que utilizaremos para las mismas prácticas en el laboratorio. Los datos obtenidos antes de la aplicación de la cola son:

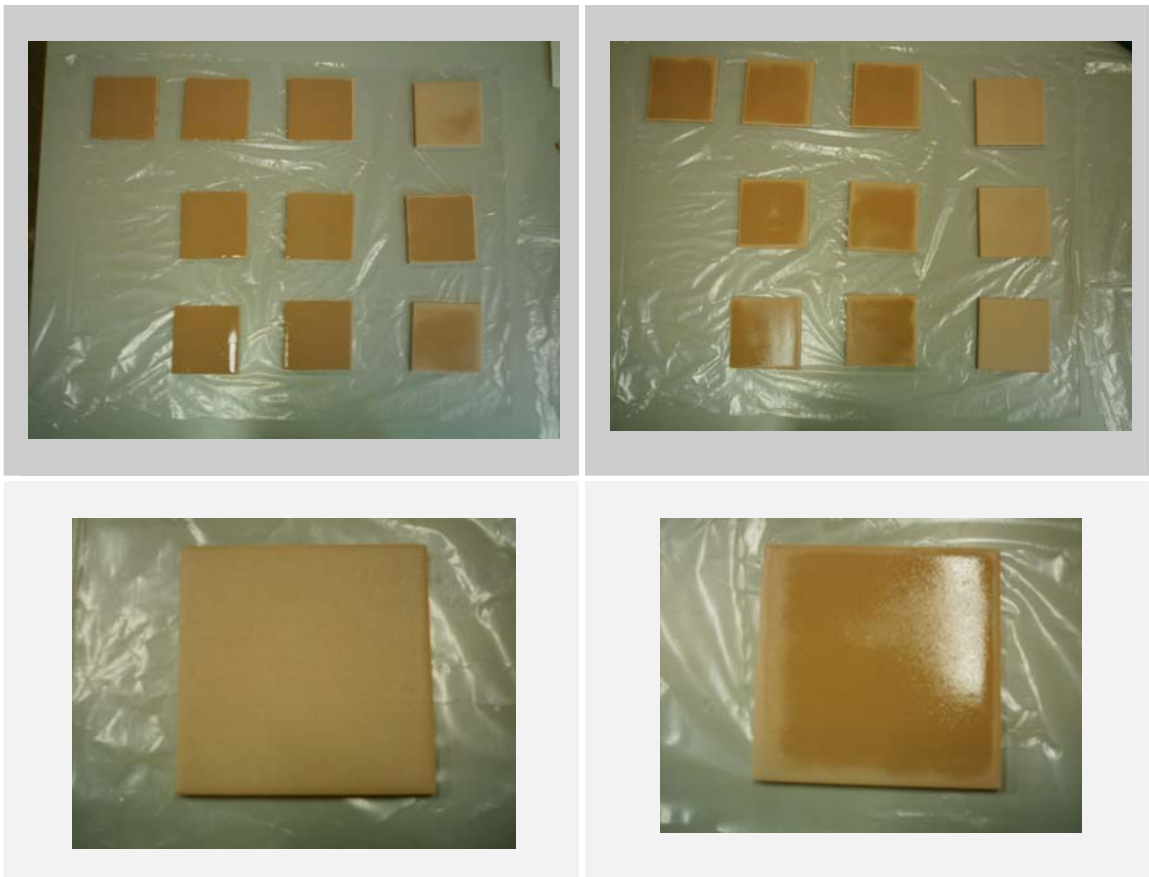
```
LGOROWLENGTH 01
CREATED      "11/7/2008" # Time: 11:47
INSTRUMENTATION  "eye-one"
MEASUREMENT_SOURCE  "Illumination=D50  ObserverAngle=2°  WhiteBase=Automatic  Filter=No"
KEYWORD       "SampleID"
KEYWORD       "SampleName"
BEGIN_DATA_FORMAT
SampleID SampleName      XYZ_X  XYZ_Y  XYZ_Z  Lab_L  Lab_a  Lab_b
END_DATA_FORMAT
NUMBER_OF_SETS 2
BEGIN_DATA
1      A1      89.17  92.42  73.82  96.99  0.11  2.08
2      B1      57.80  57.05  35.88  80.21  6.92  14.34
END_DATA
```

Estos datos nos permitirán apreciar los cambios de tonalidad real de nuestras probetas.

Aplicación de la cola:

A paletina. Antes y después de cada aplicación, pesado de la cola en el balanza digital. De esta manera podremos saber la proporción de cola aplicada por centímetro cuadrado (cm²).

Hemos aplicado en cada una de las partes (en las 10 losetas): ~ 0'13g por cm²



Medición de blanco de la tabla (Eye-one)

Los datos obtenidos después de la aplicación de la cola son:

```
LGOROWLENGTH 01
CREATED "11/7/2008" # Time: 11:52
INSTRUMENTATION "eye-one"
MEASUREMENT_SOURCE "Illumination=D50 ObserverAngle=2° WhiteBase=Automatic Filter=No"
KEYWORD "SampleID"
KEYWORD "SampleName"
BEGIN_DATA_FORMAT
SampleID SampleName XYZ_X XYZ_Y XYZ_Z Lab_L Lab_a Lab_b
END_DATA_FORMAT
NUMBER_OF_SETS 2
BEGIN_DATA
1 A1 76.26 79.27 57.54 91.35 -0.33 7.72
2 B1 50.29 48.81 26.97 75.34 8.80 19.70
END_DATA
```

De todos estos datos, que aparecen en las tablas del Eye.one los que nos interesan son, los 3 últimos donde observamos la diferencia entre el antes y el después de la aplicación de la cola:

Antes de la cola			Después de la cola		
Lab_L	Lab_a	Lab_b	Lab_L	Lab_a	Lab_b
96.99	0.11	2.08	91.35	-0.33	7.72
80.21	6.92	14.34	75.34	8.80	19.70

Una vez que ya hemos preparado las probetas pasamos a realizar las experiencias con bacterias en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biotecnología de la Escuela de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Valencia.

5.2 Ensayos microbiológicos

En este ensayo lo que se pretende es:

- El cultivo en un medio líquido para obtener masa celular.
- Aplicación a la probeta.
- Retirada de los empacos y evaluación de los resultados.

- Materiales:

Las probetas:

- ✓ 10 losetas con cola aplicada.
- ✓ Tabla de mortero de cal con cola aplicada

Los portantes:

- ✓ Sepiolita y papel japonés.
- ✓ Algodón.
- ✓ Agar.

Las bacterias empleadas:

- ✓ DSMZ 5190 *Pseudomonas stutzeri*
- ✓ CECT 4899 *Pseudomonas stutzeri*

Medios de cultivo:

- ✓ Medios líquidos:
 - Medio base mineral M9
 - Caldo de agua marina
 - Caldo Común
- ✓ Medios sólido:
 - Agar nutritivo y adicionado con cola.
 - Agar Plate Count.

Otros materiales de laboratorio:

- ✓ Matraz.
- ✓ Placas Petri.
- ✓ Agitador orbital.
- ✓ Centrifuga
- ✓ Autoclave.
- ✓ Tubos estériles desechables con tapa de rosca, etc

Otros materiales necesarios para la práctica:

- ✓ Agua estéril
- ✓ Espátula.
- ✓ Bisturi.
- ✓ Pinzas.
- ✓ Alcohol, etc

- Obtención de las bacterias:

Se adquieren las dos cepas de *Ps. stutzeri*. Una obtenida a través de la Colección de Cultivos Tipo Alemana DSMZ 5190, y que es una de las estudiadas en la bibliografía consultada¹⁸. La otra cepa fue obtenida a través de la Colección Española de Cultivo Tipo; se trata de la cepa CECT 4899 la cual, aun no está estudiada en este campo.

Las bacterias llegan al laboratorio liofilizadas¹⁹ por lo cual tienen que rehidratarse para su activación y para ello, primero se introducen en un medio líquido y después en uno sólido.

En la primera fase el medio líquido empleado es caldo común para la cepa DSMZ 5190 y para la cepa CECT 4899 se empleó caldo agua marina.

Y el segundo paso es resembrarlas en medio sólido y para ello se empleó el agar nutritivo donde se observaba crecimiento y agar adicionado con cola donde la bacteria no creció hasta una segunda resiembra (el porcentaje era de un 1% de cola y un 2% de agar).

Una vez que se observó crecimiento en el medio sólido se pasó a inocular las cepas en el medio mineral M9 con cola, y para observar el crecimiento se ensayaron tres concentraciones del medio M9 con la cola.

El medio Mineral M9 empleado se compone de (g/l):

- | | |
|--------------------------------------|-----|
| - Na ₂ PO ₄ : | 6 |
| - K H ₂ PO ₄ : | 3 |
| - NH ₄ Cl: | 1 |
| - NaCl: | 0'5 |

¹⁸ Process For Bio-Cleaning of The surfaces of objects of various chemical Natures and Building.

¹⁹La liofilización es un proceso en el que congela el alimento y una vez congelado se introduce en una cámara de vacío para que se separe el agua por sublimación. Mediante diversos ciclos de congelación-evaporación se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original.

Se trata de un medio tan sólo provisto de sales que obliga a la bacteria a activar la capacidad enzimática que nos interesa ya que, su única fuente de carbono es a través de la cola que le hemos añadido al medio M9.

Se ensayaron tres concentraciones para observar el crecimiento de la bacteria y ver cuál de los tres porcentajes de cola, era el más propicio para el desarrollo de ésta.

Los porcentajes de cola en medio mineral M9 fueron:

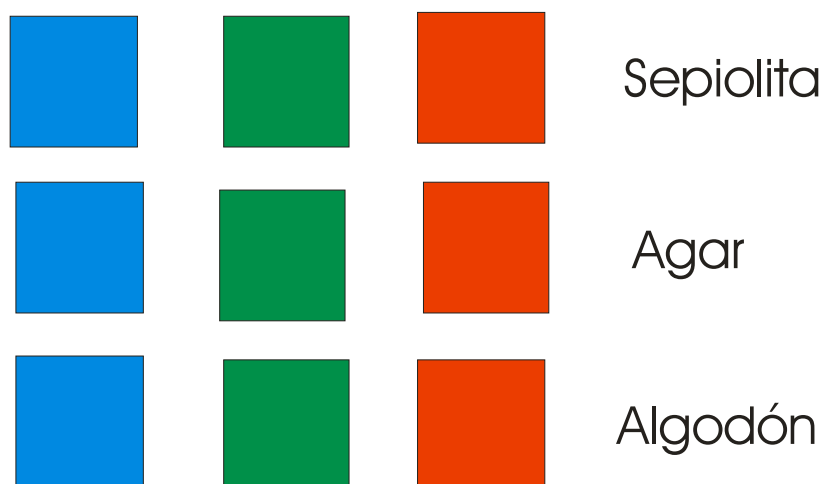
- Al 0'5% de cola
- Al 1% de cola
- Al 5% de cola

Se inocularon matraces de 300 ml de medio líquido con 3 ml de una suspensión bacteriana, obtenida del crecimiento en placa resuspendido en un tubo de agua estéril. Estos matraces se incubaron a 28 °C en agitador orbital a 130 r.p.m. durante 24 horas. Se observó crecimiento en todas las concentraciones de cola ensayadas y se escogió la concentración del 1% por ser la utilizada en la bibliografía consultada.

Para la obtención de masa celular se inocularon tres matraces de 300 ml de medio mineral M9 adicionado con el 1% de cola de cada una de las cepas, CECT 4899 y DSMZ 5190. El cultivo se incubó a 28 °C durante 24 horas en agitación orbital de 130 r.p.m.

Las células bacterianas de los 900 ml del cultivo se concentraron mediante centrifugación a 4200 r.p.m. durante 15 minutos. Las bacterias concentradas se resuspendieron en 500 ml de medio mineral M9, siendo ésta la solución bacteriana utilizada para los ensayos microbiológicos.

- Diseño de la práctica:

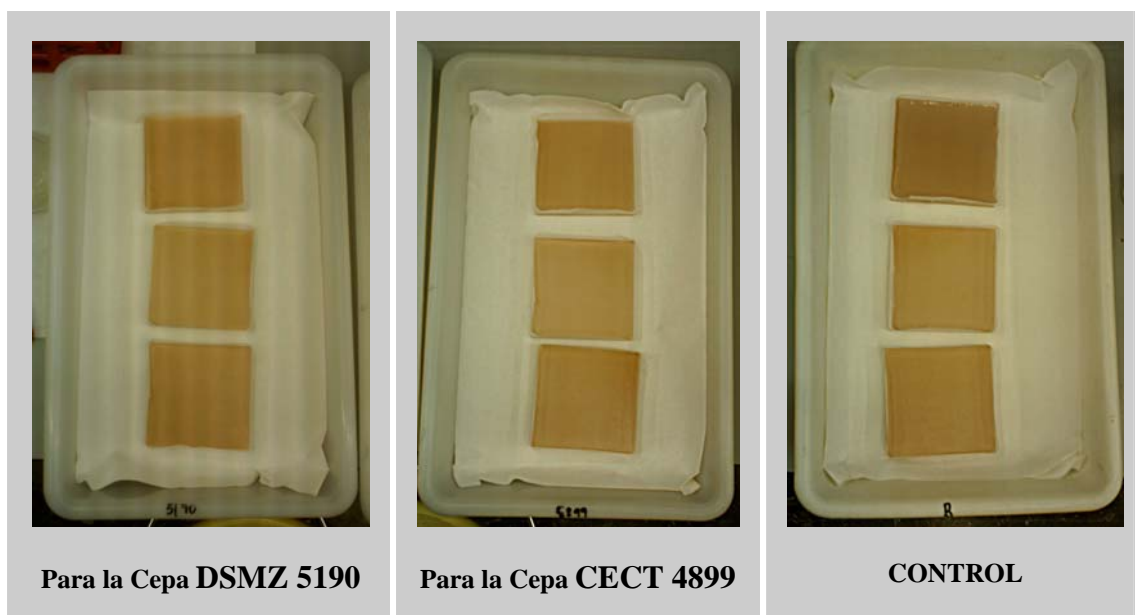


Leyenda:

- Agua sólo con los portantes
- Cepa CECT 4899
- Cepa DSMZ 5190

Para este ensayo se han dispuesto tres bandejas una por cada cepa de la bacteria.

- Una para la cepa DSMZ 5190.
- Otra para la cepa CECT 4899.
- Y otra en la que sólo hemos puesto los portantes con agua destilada estéril como control.



- Portantes. Preparación y aplicación.

✓ Agar:

Se prepara agar al 2% a doble concentración y se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos, una vez atemperado a 45 °C se añade igual volumen de solución bacteriana en M9 obteniéndose agar al 2% para su aplicación sobre la probeta.

El modo de aplicación ha sido por vertido de 50 ml en las probetas. Dejándolo secar hasta que solidificara.



Enfriamiento del Agar hasta obtener la temperatura de 45°C



Mezclando el Agar con la bacteria



Vertido del Agar con la bacteria sobre la probeta



Vertido del Agar con la bacteria sobre la probeta

✓ **Sepiolita:**

Se utilizó la solución bacteriana para humectar la sepiolita hasta conseguir una pasta homogénea de textura apta para la aplicación, por cada 40g de sepiolita se necesitaron 70 ml del medio M9 con la bacteria.

Modo de aplicación:

Para esta aplicación se ha seguido la misma metodología que se utiliza para su aplicación sobre obra mural. Se ha aplicado una primera capa de papel japonés (la cual nos ayudará después al retiro de la sepiolita de la superficie) y sobre ésta se aplica la sepiolita. Y una vez aplicada se vuelve a cubrir con otra capa de papel japonés que mantendrá el portante húmedo y evitará la excesiva evaporación del agua.



Detalle de la aplicación



Una vez aplicada

✓ Algodón:

El algodón se cortó a la medida de cada loseta y se aplicó sobre la superficie dos capas de algodón.

Modo de aplicación:

Sobres las dos capas de algodón se vierte la solución bacteriana. Para cada empaque de algodón se necesitó 100 ml del medio M9 con la bacteria.

Éste fue el empaque empleado también para la probeta del mortero de cal.



Vertido del medio en las losetas



Vertido del medio en las losetas



Vertido del medio en el mortero de cal



Vertido del medio en el mortero de cal

En el mortero de cal, se colocaron dos empaques de algodón para cada cepa bacteriana ensayada y dos empaques con agua destilada estéril. Los empaques con bacterias se inocularon, uno con 100 ml de la solución bacteriana en M9 y el otro se inocula con 100 de medio M9 con 1 % de cola crecido. Una vez aplicados los portantes se cubrieron las bandejas con bolsas de plástico y la tabla de mortero de cal para evitar la evaporación rápida del agua. La tabla de mortero se incubó a temperatura ambiente.



Las losetas se incubaron en estufa a 28 °C durante dos días, revisándolas periódicamente para comprobar que los portantes seguían húmedos y si no fuera así, volver a humectarlos.



En la primera revisión se observó que probetas inoculadas con bacterias no necesitaban ser humectadas mientras que las probetas control de sepiolita presentaban un aspecto más reseco y agrietado por lo que se procedió a humectarla con agua destilada estéril.



Humectación de la sepiolita en la bandeja control



Detalle del empaque de sepiolita

Se ensayaron dos tiempos de contacto de los portantes con las probetas. Transcurridos dos días, se procedió a retirar la mitad de todos los empaques para ver los resultados del ensayo a las 48 horas y la segunda parte se retiró 3 días más tarde.



Las bandejas con los portantes transcurridos dos días Control



Las bandejas con los portantes transcurridos dos días CECT 4899



Las bandejas con los portantes transcurridos dos días DSMZ 5190

**Fotografías del proceso de retirada de la mitad de los portantes
(transcurridos dos días)**

De las losetas.



Retirada del agar



Retirada del agar



Retirada de la sepiolita



Retirada de la sepiolita



Retirada del algodón



Retirada del algodón



Foto de las bandejas retirado
la mitad del portante
CECT 4899



Foto de las bandejas retirado
la mitad del portante
DSMZ 5190



Foto de las bandejas retirado
la mitad del portante

**Fotografías del proceso de la retirada de la mitad de los portantes
(transcurridos dos días)**

De la tabla del mortero de cal.



La tabla antes del retiro de la mitad del
portante



Retiro de la mitad del portante

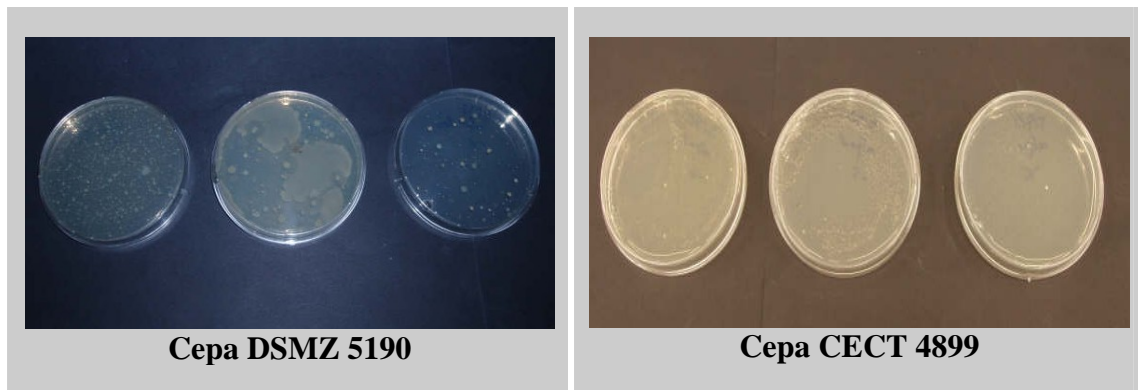


Detalle tras el retiro del portante



Detalle tras el retiro del portante

El material retirado de cada una de las mitades de los portantes, fue introducido en recipientes estériles, para realizar un recuento de células viables y comprobar, de esta manera, cuantas bacterias están vivas transcurridos dos días.



Tras esto se volvieron a introducir las bandejas, en la estufa a 28°C. No se han limpiado las zonas donde se retiraron los empacos para poder comprobar si quedaban restos de cola.

Transcurridos los cinco días pasamos a retirar el resto del empaco con la bacteria. La retirada se realizó de igual modo que la anterior.

Fotografías del proceso de retirada de la otra mitad de los portantes (transcurridos cinco días)

De las losas



**Fotografías del proceso de retirada de la otra mitad de los portantes
(transcurridos cinco días)**
De la tabla del mortero de cal



Detalle del retiro del empaco de algodón



Detalle del retiro del empaco de algodón



Detalle del retiro del empaco de algodón



Detalle del retiro del empaco de algodón

Parte práctica con las enzimas

- Materiales:

Preparado enzimático – Mix Enzimi. Se trata de un kit compuesto por tres elementos, que son:

- ✓ La enzima.
- ✓ La sustancia tampón.
- ✓ La saliva artificial.



Arbocel BWW 40.
Una de las losetas.

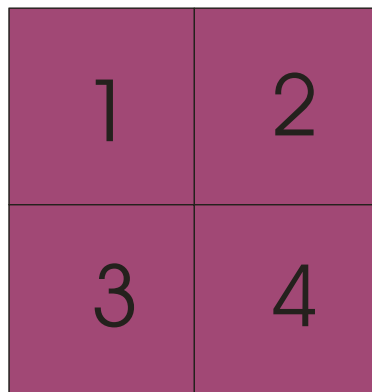
- Realización de la práctica:

En primer lugar se ha dividido la loseta en cuatro partes.



A cada una de estas porciones se dieron tiempos de contactos distintos.
Los tiempos fueron:

- ✓ Para la primera 20 minutos.
- ✓ Para la segunda 40 minutos.
- ✓ Para la tercera 60 minutos.
- ✓ Para la cuarta 80 minutos.



Para mantener la humedad de la enzima se aplicó sobre ésta Arbocel BWW 40.
Y a medida que se va retirando la encima de la superficie se lava la zona con la saliva artificial.

Durante este proceso no se empleó ningún objeto metálico para evitar los iones metálicos, ya que pueden influir en la actividad enzimática.

Fotografías de la aplicación de las enzimas



Aplicación de la enzima



Medición del Ph



Arbocel BWW 40



Empaco de arbocel con la enzima

6. Resultados.

LOSETAS

Bacterias:

De los envases retirados a las 48 horas de su aplicación se realizaron recuentos en placa de células viables mesófilas en agar plate count.

Resultado de los recuentos (nº de células viables/gramo de envase)

Portante	Cepa CECT 4899	Cepa DSMZ 5190
Agar	$1'4 \cdot 10^6$	$1'0 \cdot 10^7$
Sepiolita	$>3'0 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^8$
Algodón	$8'6 \cdot 10^7$	$>3'0 \cdot 10^8$

A la vista de los resultados de los recuentos podemos deducir que la carga microbiana original de los envases de sepiolita y algodón se ha desarrollado durante la incubación dando como resultado recuentos más altos que los obtenidos en el agar estéril, que sólo estaba inoculado por las cepas de pseudomonas.

Por lo tanto sólo resultan fiables, en cuanto a la viabilidad de las pseudomonas en las probetas, los envases de agar.

A los cinco días de actuación se realizan recuentos de viables mesófilos en placa de los dos envases de agar siendo los resultados mayores a $3.0 \cdot 10^8$ células viables/gr de envase.

Esto demuestra que la carga de pseudomonas no sólo se ha mantenido viva en el envase en contacto con la cola sino que ha aumentado considerablemente su número, lo que nos lleva a pensar que se han adaptado al medio y a la utilización del sustrato como nutriente.

Después del contacto durante 48 horas los resultados fueron satisfactorios en las losetas, ya que parecía haberse retirado la gran mayoría de la cola aplicada sobre todo en las que se aplicó la cepa CECT 4899. En las que aplicó la cepa DSMZ 5190 se podía observar que aun quedaban restos de cola.

Portantes (dos días):

El algodón no deja restos en superficie y parece retirar la gran mayoría de la cola. Además de mantener la humedad que la bacteria necesita.

La sepiolita tampoco deja restos aunque no mantiene la humedad que necesita la bacteria y se debe controlar más.

Y el agar, no deja restos, no mancha la superficie, es sencillo de quitar y mantiene la humedad que la bacteria necesita para que actúe sobre la cola.

- Resultados a los cinco días:

Después de transcurridos cinco días de contacto los resultados fueron más satisfactorios, ya que parecía haberse retirado la totalidad de la cola aplicada tanto con la cepa CECT 4899 como con la cepa DSMZ 5190.

Aunque también podemos apreciar cierta coloración de las losetas sobre todo donde se aplicó el portante de sepiolita.

Portantes (cinco días):

El algodón en las losetas, no deja resto en superficie, parece retirar la gran mayoría de la cola. Además mantiene la humedad que la bacteria necesita.

La sepiolita tampoco deja restos, aunque sigue sin mantener la humedad que necesita la bacteria por lo que se debe controlar más. Parece colorear la superficie.

Y el agar, no deja restos, no mancha la superficie, es sencillo de quitar y mantiene la humedad que la bacteria necesita para que actúe sobre la cola.

El control realizado con agua destilada estéril removió la cola, dejándola reblandecida y eliminando parte de ella al eliminar el empaque, sin embargo a los cinco días los empaques de sepiolita y agar habían sido colonizados por hongos filamentosos que no habían aparecido en los empaques inoculados por pseudomonas.

Al retirar los empaques quedaron restos de algodón adheridos a la superficie y en el caso de la sepiolita manchó la zona tratada.

TABLA DE CAL

En la tabla de mortero de cal sí que se notó cierta diferencia entre las cepas obteniendo un mejor resultado en las zonas donde se aplicó la cepa CECT 4899.

En los empaques de algodón inoculado con medio de 1 % de cola crecido, al retirar los empaques a los 5 días parecía llevarse parte del mortero además de dejar restos en superficie, aunque lo suficientemente reblandecida para retirarla con una acción mecánica leve.

Fotografías tras la retirada de los empacos con bacterias



Losetas



Detalle de una de la losetas



Detalle de una de la losetas



Restos de la cola, empaco de la cepa Alemana

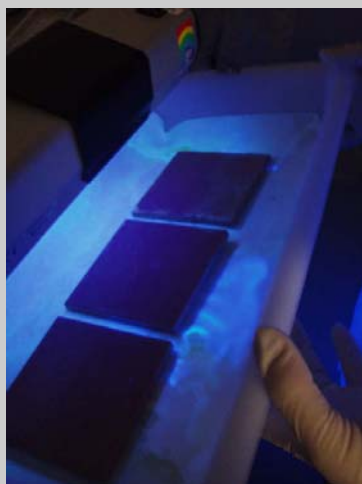
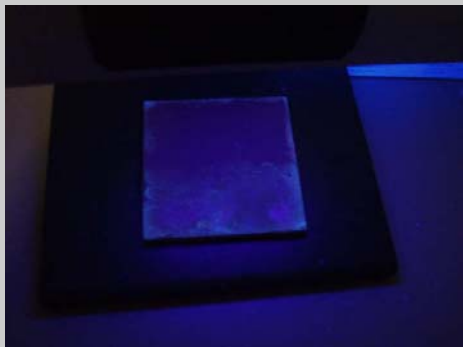


Restos de la cola, empaco de la cepa alemana



Zona de la cepa española, parece no quedar restos

Observación de las losetas con luz ultravioleta.



En estas fotografías, podemos apreciar una cierta fluorescencia de las bacterias sobre todo de la cepa CECT 4899 (española)

Enzimas:

Tras realizar la práctica con las enzimas se observó que a mayor tiempo de contacto de las enzimas con la superficie, mayor era su poder de limpieza. Aunque no se consigue la eliminación por completo de los retos de cola.

A menos tiempo de contacto los retos de cola se quedan en superficie y son fácilmente visibles.

Y a mayor tiempo de contacto los retos de cola que quedan se han introducido en la superficie de la probeta, porque ha tenido una mayor disolución.

Por lo que los resultados obtenidos de la experimentación con las enzimas siguen siendo insatisfactorios.

Fotografías del proceso limpieza con enzimas tras su retirada



Fotografía de la loseta tras la retirada de la enzima

7. Conclusiones

Como ya hemos dicho que a los sistemas de limpieza se les pide, y sobre todo a los acuosos, que sean selectivos a la hora de eliminar la suciedad de la obra y además que tengan una acción localizada, podemos concluir que hay elementos ajenos a la obra, sustratos a eliminar, que son difícilmente eliminables con cualquiera de los métodos expuestos.

Las bacterias según las investigaciones, serían un buen sistema para la eliminación de colas animales envejecidas, nitratos y sulfatos, nada fáciles de eliminar con los métodos tradicionales, por ello el uso de bacterias nos facilitaría la eliminación de tales sustancias.

La *Pseudomona*, que es la bacteria sobre la que trata este pequeño estudio, nos facilita la eliminación de colas animales, sin dañar la superficie mural, ni la pátina de la misma. De hecho en la bibliografía consultada el empleo de estas bacterias les ha dado muy buen resultado.

Se presentan como una alternativa y rival a los disolventes tan nocivos para el ser humano, ya que se trata de una sustancia no tóxica.

La desventaja que tiene este tratamiento sería los tiempos de contacto con la superficie de la obra, ya que se trata de tiempos más largos que los tratamientos tradicionales.

En este estudio el portante que mejor resultado ha dado ha sido el agar, ya que no ha dejado manchas ni restos sobre la superficie, mantiene la humedad y esto evita tener que controlar frecuentemente el empaque para aportarle humedad manteniendo de este modo las condiciones más adecuadas para la bacteria. Además de ser muy sencillo de retirar de la superficie.

Y a la inversa, el que peor resultados ha dado es la sepiolita, llegando a colorear la superficie de la probeta transcurridos cinco días del empaque. Además de ser el empaque sobre el que más control debemos ejercer, pues es el que antes pierde la humedad.

Los empacos de algodón son los que han dado un resultado intermedio ya que mantienen la humedad, lo que no evita el continuo control, aunque por otro lado deja algunos restos en superficie, aunque fácilmente eliminables.

Sin llegar a establecer las condiciones más apropiadas para nuestras bacterias, los resultados han sido bastante positivos.

En el futuro se pueden hacer estudios para averiguar las condiciones más apropiadas para potenciar su acción selectiva.

Esto tan sólo, ha sido un pequeño acercamiento a las grandes posibilidades que aportan las bacterias dentro del campo de la Restauración.

8. Bibliografía.

Libros:

CREMONESI Paolo; L'uso degli enzimi nella pulitura di opere policrome; pp. 160- Il prato.

Artículos:

RANALLI, Giancarlo; MATTEINI, Mauro; TOSINI, Isetta; ZANARDINI, Elisabetta; and SORLINI, Claudia. "Bioremediation of Cultural Heritage: Renoval of Sulphates, Nitrates and Organic Substances".

CAPPITELLI, Francesca; ZANARDINI, Elisabetta; RANALLI, Giancarlo; MELLO, Emilio; DANFFONCHIO, Daniele, and SORLINI, Claudia. "Improved methodology for bioremoval of Historical stone artworks by use of sulphate-reducing bacteria". *Applied and Enviromental Microbiology*, May 2006, p. 3733-3737

CAPPITELLI, Francesca; TONIOLO, Lucia; SANSONETTI, Antonio; GULOTTA, Davide; RANALLI, Giancarlo; ZANARDINI, Elisabetta; and SORLINI Claudia. "Advantages of using microbial technology over tradicional chemical tecnology in renoval of black crust from stone surface of historical monuments". *Applied and Enviromental Microbiology*, Sept. 2007, p. 5671-5675.

ATLAS, R. M.; CHOWDHURY, A. N.; and GAURY, L. K.; 1988; *Microbial Clacification of gypsum-rock and sulphated marble*.

GAURI, K. L., and CHOWDHURY, A. N. *Experimental studies on conversion of gypsum to calcite by microbes*. 1988.

ANTONIOLI, Paolo; ZAPPAROLI, Giacomo; ABBRUSCATO, Pamela; SORLINI, Caludia; RANALLI Giancarlo; and RITHETTI, Pier Giorgio. "Art-loving bugs: Te resurrection of Spinello Aretino from Pisa's cementery". *Proteomics* 5, 2005, pp.2453-2459.

RANALLI, G.; ALFANO, G.; BELLI, C.; LUSTRATO, G.; COLOMBINI, M.P.; BONADURE, I.; ZANARDINI, E.; ABBRUSCATO, P.; CAPPITELLI F.; and SORLINI, C.; "Biotechnology applied to cultural heritage: bio restoration of frescoes using viable bacterias cells an enzymes". *Journal of Applied Microbiology* 2005, pp. 98, 73-83.

RANALLI, Giancarlo; ZANARDINI, Elisabetta; CAPPITELLI, Francesca; and SORLINI Claudia. "Impregno di microorganismo nella biopolitura di affreschi" *Il Camposanto de Pisa: Un Progetto di Restauro Intagrato*; 6- 7- 8 Marzo 2008

Webs:

Art12:

<http://www.scielo.cl/pdf/rcp/v46n1/art12.pdf>

10:28 (16- septiembre-08)

Wikipedia(Ingles)

http://en.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_stutzeri

10:32 (16- septiembre-08)

Sobre la pseudomonas (ingles)

<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/481323/Pseudomonas-stutzeri>

10:33 (16- septiembre-08)

<http://www.thelabrat.com/restriction/sources/Pseudomonasstutzeri.shtml>

10:35 (16- septiembre-08)

<http://www.egr.msu.edu/schoolcraft/strainkc.htm>

10:36 (16- septiembre-08)

Artículos sobre estas bacterias

<http://mic.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/144/2/569>

10:37 (16- septiembre-08)

Nitratos Wikipedia

<http://es.wikipedia.org/wiki/Nitrato>

10:39 (16- septiembre-08)

SEM27

http://www.semico.es/Actualidad/PDFS/SEM27_18.pdf

10:43 (16- septiembre-08)

07-Biopelículas microbianas (DEFINICION DE BIO FILM)

<http://www.tecspar.org/Documentos/07-Biopeliculasmicrobianas.pdf>

10:50 (16- septiembre-08)

Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas

ISSN 0375-538X *versión impresa*

http://www.serbi.luz.edu.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-538X2005004000003&lng=es&nrm=iso

10:56 (16- septiembre-08)

MICROBIOLOGIA, 2

http://www.cibernetia.com/tesis_es/CIENCIAS_DE_LA_VIDA/MICROBIOLOGIA/2

13:35 (18- septiembre-08)

MÉTODOS MOLECULARES DE ESTUDIO DE LAS POBLACIONES DE PSEUDOMONAS STUTZERI.

http://www.cibernetia.com/tesis_es/CIENCIAS_DE_LA_VIDA/MICROBIOLOGIA/2

13:35 (18- septiembre-08)

9. Agradecimientos

**Al Departamento de Conservación y Restauración de Bienes Culturales de la
Universidad Politécnica de Valencia.**
**A mis tutores por darme la oportunidad de realizar este trabajo tan distinto a lo que
estamos acostumbrados.**
A mis compañeras y amigas por haberme apoyado en mis momentos más bajos.
A mis padres porque sin ellos no podría haber llegado hasta aquí.

Anexo I

Artículos consultados

Autores	Titulo del Articulo	Año	Investigación realizada
<p>Giancarlo Ranalli, Mauro Matteini, Isetta Tosini, Elisabetta Zanardini, and Claudia Sorlini</p>	<p>Bioremediation of Cultural Heritage: Renoval of Sulphates, Nitrates and Organic Substances.</p>		<p>Desarrollo de un sistema múltiple de tratamiento para el retiro biológico de sulfatos, nitratos y material orgánicos a través de la utilización y selección de bacterias. Dicho estudio consistió en la investigación de microorganismos con una alta capacidad de reducción de sulfatos, de desnitrificación y biodegradación de materiales orgánicos. Bacterias empleadas en la investigación por su capacidad desnitrificacnte: Pseudomona stutzeri (RZ94). Pseudomona stutzeri (GB94). La bacteria empleada para la capacidad de biodegradación fue: Pseudomona (A29). Y las utilizadas para la reducción de sulfatos fueron: Desulfovibrio vulgaris. D. Desulfuricans. Tambien se realizo un estudio entre diferentes portantes para ver cual era el mejor Biofilm para las bacterias. Se estudiaron: Sepiolita. Hydrobiogel 97</p>
<p>Francesca Cappitelli, Elisabetta Zanardini, Giancarlo Ranalli, Emilio Mello, Daniele Danffonchio, and Claudia Sorlini.</p>	<p>Improved methodology for bioremoval of Historical stone artworks by use of sulphate-reducing bacteria.</p>	<p>2006</p>	<p>Las bacterias utilizadas en esta investigación son las bacterias reductoras de sulfatos (BRS) para el retiro de costras negras. Las bacterias con las que se realizo esta investigación fueron: Desulfovibrio vulgaris subps. Vulgaris ATCC29579. En este estudio se avanzo evitando la precipitación del sulfuro de hierro a través de un filtrado del medio que quedo desprovisto del mismo. También se realizaron un estudio con tres portantes para ver cual era el Biofilm más apropiado. Dichos portantes fueron: Sepiolita Hydrobiogel-97 Carbogel. Quedando demostrado que el Carbogel es el que mantiene las condiciones mas apropiadas</p>
Autores	Titulo del Articulo	Año	Investigación realizada
<p>Francesca Cappitelli, Lucia Toniolo, Antonio Sansonetti, Davide Gulotta, Giancarlo</p>	<p>Advantages of using microbial technology over traditional chemical technology in renoval of black crust from stone</p>	<p>2007</p>	<p>En este artículo se realizo una comparativa entre dos métodos de limpieza para el retiro de la llamada corteza negra de los monumentos. El método tradicional empleado en el estudio fue el de EDTA de carbonato de amonio que fue comparado con el método biológico en el cual se emplearon BRS.</p>

Ranalli, Elisabetta Zanardini, and Claudia Sorlini.	surface of historical monuments		Las bacterias RS utilizadas fueron: D. vulgaris subsp. Vulgaris ATCC 29579 Dicha bacteria fue suspendida en un medio de almacenamiento intermedio de fosfato que contenía lactato, como donante de electrones. Esto evita la colonización de microorganismos subsecuentes al uso de dichas bacterias.
Atlas, R. M., A. N. Chowdhury, and L. K. Gaury	Microbial Clacification of gypsum-rock and sulphated marble.	1988	Propusieron el uso de bacterias reductoras de sulfatos(BRS) en particular: Desulfovibrio. Desulfuricans Y según sus estudios decían que dichas bacterias podían transformar el yeso. Por lo que sugirieron que esto era tanto un tratamiento de limpieza como conservativo.
Gauri, K. L., and A. N. Chowdhury.	Experimental studies on conversion of gypsum to calcite by microbes.	1988	Tambien sugirieron que el uso de BRS era tanto un tratamiento de limpieza como conservativo. Y se observo la formación de carbonatos nuevo lo que implicaba que también podía ser útil para la consolidación. Se observo que los carbonatos nuevos eran: - Menos solubles. - Eran más resistentes a la acción mecánica.
Webster, A., and E.	Bioremediation of weathered-building stone surface.	2006	Se mejoro el sistema de envío de las bacterias reductoras de sulfatos (BRS) evitando la precipitación del sulfato. Utilizando la especie: D. vulgaris subsp. Vulgaris ATCC 29579 Aunque en este estudio se dice aun que las ventajas y desventajas de este método quedan por probar.
Gauri, L.K., L. Parks, J. Jaynes, and R. Atlas.	Removal of sulphates-crust from marble using sulphate-reducing bacteria.	1992	En este estudio fue la primera vez que se utilizaron las bacterias reductoras de sulfatos (BRS) para la eliminación de la llamada corteza negra. Y durante su utilización en este estudio de puso al descubierto que era necesario antes de su utilización la consolidación de la pieza. Ya que, este método se utiliza por inmersión. Y debido quedaron al descubierto también dos desventajas: - La pieza a trata debía de ser de pequeño tamaño. - Y que era importante la previa consolidación de la pieza.
Autores	Titulo del Articulo	Año	Investigación realizada
Giancarlo Ranalli, Elisabetta Zanardini, Francesca Cappitelli, and Claudia Sorlini	Impregno di microorganismo nella biopolitura di affreschi, Il Camposanto de Pisa: Un Progetto di Restauro Intagrato.	2008	Se realizo un proyecto en el cual se estudiaron bacterias y se utilizaron bacterias para la eliminación de cola animal envejecida. Ya que, los métodos tradicionales utilizados para la eliminación de dichas colas no funcionaban de ahí que se buscara un método alternativo menos agresivo con la obras de arte.
			Como método mejorado en este estudio se empleo como portante de

Ranalli, G., M. Chiavarini, V. Guidetti, F. Marsala, M. Matteini, E. Zanardini, and C. Sorlini.	The use of micro organisms from the removal sulphates on artistries stoneworks.	1997	las bacterias BRS la sepiolita por su cualidad de inorgánica. Se utilizaron para el estudio tres tipos de bacterias reductoras de sulfatos(BRS) que fueron: - D. Desulfuricans ATCC13541 y ATCC 29577. - D. vulgaris subsp. Vulgaris ATCC 29579. Esta última BRS demostró ser la que tenía las mejores cualidades para el retiro de sulfatos incluso bajo condiciones de tensión baja.
Tiano, P., L. Biagiotti, and G. Mastromeni.	Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stone conservation: methods of evaluation.	1999	En este estudio se observo la neo formación de carbonatos y se sugirió el uso de varios tipos de bacterias para esto. Las bacterias sugeridas por el estudio fueron: - Micrococo. - Bacilo.
Rodríguez-Navarro, C., M. Rodríguez-Gallego, K. B. Chekroun, and M.T. González-Muñoz.	Conservation of ornamental stone by Myxococcus Xantus – indice carbonate biomineralization.	2003	Se sugiere la idea del uso del Myxococcus Xantus para inducir la mineralización del carbonato. También se observo un crecimiento negativo de microorganismos al evitarse la presencia de alimento orgánico.
Tiano, P., E. Cantisani, I. Sutherland, and J. M. Páger.	Biomedited reinforcement of weathered calcareous stone.	2006	Se reconoce la formación de una matriz orgánica producida por las bacterias. También recomiendan que durante los estudios de dichas bacterias se haga un seguimiento de las enzimas responsables de esto. Al que las bacterias que son capaces de esto.

Autores	Título del Artículo	Año	Investigación realizada
Paolo Antonioli, Giacomo Zapparoli, Pamela Abbruscato, Caludia Sorlini, Giancarlo Ranalli and Pier Giorgio Rithetti.	Art-loving bugs: Te resurrection of Spinello Aretino from Pisa's cementery.	"2005"	Se describe la metodología empleada para establecer las mejores condiciones de las bacterias mejorando de este modo la eficacia de esta en el tratamiento. También exponen que usando bacterias viables es mucho mas bajo que otros métodos convencionales.
G. Ranalli, G. Alfano, C. Belli, G. Lustrato, M.P. Colombini, I. Bonadure, E.	Biotechnology applied to cultural heritage: bio restoration of frescoes using viable bacterias cells an	"2003-2004"	Se demostró la eficacia de las bacterias Stuzari para la retirada de las gasas que cubrían las pinturas de Spinello ya que, la bacteria era capaz de digerir

Zanardini, P. Abbruscato, F. Cappitelli and C. Sorlini.	enzymes.		completamente el pegamento envejecido.
--	----------	--	--

Otros artículos, ha los que se hacen referencias en los textos anteriores, en relación al uso de bacterias y sus posibilidades en el campo de la Restauración.

Autores	Año	Investigación realizada
Krumbein y Krumbein y Giele	(1979) (1979)	Estudiaron la deposición de carbonatos causado por el crecimiento y la actividad metabólica de los estromatolitos del desierto que producirán la interceptación y precipitación del sedimento.
Gabrielli	(1981)	Comenta la posibilidad del uso de microorganismos desnitrificantes. Y la importancia de la pruebas preliminales para una buena identificación de las condiciones de vida de las bacterias(Ph, medio de cultivo, condiciones(anaeróbica o aeróbica), etc)
Knowles,	(1982)	Se habla de la Pseudomona y que en condiciones anaeróbicas pueden reducir los nitratos dando lugar a productos gaseosos tales como el oxido nitroso y el nitrógeno.
Gauri y Gwinn	(1983)	Determinan el grado de agotamiento del sulfuro en una solución de Desulfovibrio (BRS) experimentado en laboratorio. Optimizaron el medio microbiano para evitar la precipitación negra del hierro y mejoraron su función de limpieza.
Rivadeneira y otros	(1985)	Observaron que algunas características ambientales podían influir en la precipitación de los carbonatos, tales como las fuerzas iónicas el medio.
Heselmeyer y otros	(1991)	Estudio bajo condiciones del laboratorio para obtener la biocomversión del yeso de la roca de calcita.

Rivadeneira y otros	(1994)	Se consiguió aislar la tensión perteneciente al género vibrión demostrando que podían provocar la formación de cristales de magnesio y que podían variar la concentración de la misma dependiendo del medio proporcionado. Los ensayos demostraron que Mg^{2+} posee un efecto inhibitorio sobre la precipitación del carbonato.