

Assaig de bionete- teges bacterianes sobre material arqueològic divers: ceràmica, os i pintura mural

El present article és una selecció parcial del treball final efectuat durant el curs d'adaptació a la nova titulació de conservador-restaurador en l'especialitat de Conservació i Restauració de Béns Arqueològics de l'ESCRBCC. El treball, titulat *Neteges raonades: experimentació amb nous tractaments de neteja aplicats sobre 6 peces de material arqueològic divers*, tenia com a objectiu establir una metodologia de neteges enfocada a material arqueològic, efectuant un examen profund de les peces que ens permetés establir un protocol raonat, el més científic possible, en el que la proposta de neteja sorgís dels resultats de l'examen analític. A més a més, aquest protocol pretenia escollir sempre, d'entre els sistemes de neteja possibles, el més adient, eficaç i innoeu, tant per a la peça com per al restaurador, de manera que els sistemes aquosos tamponats, gelificats i bacterians van ser alguns dels mètodes suggerits. Aquest article se centrarà únicament en la part experimental de les bioneteques bacterianes perquè, d'entre els temes estudiats al treball final, és un dels més innovadors i presenta un camp d'estudi ampli encara per explorar.

Testing Biocleaning Bacterium on Diverse Archaeological Material: ceramics, bone and mural painting

This paper is an excerpt from the final project completed during the adaptation programme for the new qualification of conservator-restorer specialising in the Conservation and Restoration of Archaeological Artefacts at the ESCRBCC. This work, titled Reasoned Approaches to Cleaning: experiments carried out with new cleaning treatments applied to 6 diverse pieces of archaeological material, is aimed at establishing a specific methodology for cleaning archaeological material, carrying out an in-depth examination of the pieces which would allow us to establish a reasoned protocol, the most scientific possible, where the cleaning method proposed would arise from the results of the analytic study. Moreover, the intention of this protocol was to always choose, from the cleaning methods possible, the most appropriate, effective and safest, both for the piece involved and the restorer, so the buffered aqueous, gelled and bacterial processes were among the methods suggested. This paper will only deal with the experimental part of the biocleaning bacterium since, among the topics studied in the final project, this is one of the most innovative and introduces a broad area of study still to be explored.

Silvia Marín Ortega. Professora de Conservació i Restauració de Béns Arqueològics de l'ESCRBCC. Llicenciada en Història per la Universitat de Barcelona. Titulada Superior en Conservació i Restauració de Béns Culturals en l'especialitat d'Arqueologia per l'ESCRBCC. Postgraduada en Restauració Arquitectònica per la UPC i en Conservació Preventiva per la Universitat d'Alcalá d'Henares. Lecturer in Conservation and Restoration of Archaeological Artefacts at the ESCRBCC. BA in History from the University of Barcelona. Higher Degree in Conservation and Restoration of Cultural Heritage specialising in Archaeology from the ESCRBCC. Postgraduate Degree in Architectural Restoration from the UPC and in Preventative Conservation from the University of Alcalá de Henares. silviamarinortega@yahoo.es

Paraules clau: bioneteja, bacteris, *Pseudomonas stutzeri*, nitrats, coles orgàniques, material arqueològic.

Keywords: Corten steel, low alloy steels, architectural heritage, intervention criteria.

Data de recepció: 11-12-15 > **Data d'acceptació:** 19-12-15 / **Date received:** 11-12-15 > **Date accepted:** 19-12-15.



INTRODUCCIÓ I METODOLOGIA

Sovint, els restauradors de materials arqueològics ens trobem davant d'objectes absolutament destruïts, susceptibles a qualsevol intervenció i molt sensibles inclús a l'acció de l'aigua, pel fet que el medi soterrat en el qual s'han trobat durant segles, ha activat algunes reaccions químiques com la hidròlisi i la solubilitat de molts dels seus components. Així, doncs, ens trobem amb materials que sovint necessitarien un tractament aquós per eliminar residus fangosos, terrosos o salins, però que no es poden mullar perquè s'estoven, es descomponen o, fins i tot, es poden activar diverses reaccions químiques nocives per a les peces, amb facilitat. Exemple d'això és el material ossi, el material fòssil paleontològic, l'ivori, el cuir i els metalls, entre altres. D'aquesta manera, ens plantejem examinar prèviament i a consciència les peces, per establir un protocol raonat en el qual la proposta de neteja sorgeixi dels resultats d'un examen el més científic possible, a partir dels mitjans amb els quals pot comptar qualsevol restaurador. D'entre els sistemes de neteja possibles, sempre intentarem fer servir el més adient, el més eficaç i el més innocu tant per a la peça com per al restaurador. Concretament, en els casos que presentem en aquest article, els mètodes escollits van ser els biològics (neteja amb bacteris), per la seva eficàcia de remoció, selectivitat, respecte al suport i nul·la toxicitat.

La metodologia emprada en aquesta recerca va començar amb una fase d'estudi tant dels materials constitutius de cada peça, com de les capes de superfície

susceptibles d'eliminar durant la neteja. Aquest primer estudi abastava la recerca històrica, la revisió de referències bibliogràfiques i fitxes de restauració, l'observació macroscòpica de les superfícies amb microscopi digital de mà (50-200x), l'eina informàtica de gran detall fotogramètric 3D RTI¹ i l'observació de les superfícies amb làmpada de Wood, per descartar, detectar o fins i tot reconèixer materials filmògens en superfície a partir de la seva reflexió característica.

Després de la primera fase d'estudi, vam procedir a una fase analítica, efectuant des de senzills tests fins a tècniques analítiques instrumentals, segons la necessitat. En alguns casos es va fer servir la tècnica instrumental FT-IR,² efectuada als Centres Científics i Tecnològics de la UB, per identificar materials constitutius i de superfície, i en altres casos, senzills tests com el de polaritat i solubilitat³ per obtenir un valor *Fd* concret de les capes de superfície. En tots els casos, a més a més, es van efectuar els tests

informació sobre la tridimensionalitat de la superfície al prendre un valor per a la *Normal* en cada píxel. D'aquesta manera, el programari calcula uns valors tenint en compte l'angle resultant entre la llum i l'objecte en una sèrie de fotografies. Cal destacar que els càlculs de l'RTI aporten nova informació de gran detall impossible de revelar a partir d'un examen visual físic directe. A diferència d'una fotografia típica, la informació de reflectància deriva de la forma tridimensional de l'objecte, donant com a resultat final un joc de llums i ombres que revela els relleus i irregularitats de la superfície, generant una imatge 3D de gran detall de la superfície en qüestió.

² Espectroscòpia d'infraroig per transformada de Fourier.

³ A partir del triangle de TEAS i el test de dissolvents Wolbers-Cremonesi podem conèixer de manera aproximada quin material filmogen de superfície tenim sobre la superfície original.

¹ *Reflectance Transformation Imaging (RTI)*: mètode fotogràfic digital computacional creat per capturar la superfície dels objectes facilitant, a través d'un programari, una re-il·luminació interactiva de les superfícies des de qualsevol direcció. La informació de les imatges respecte a la seva il·luminació se sintetitza matemàticament per generar un model numèric de la superfície, el que permet examinar la imatge generada en profunditat. L'RTI millora, a partir dels càlculs matemàtics, la visualització de la superfície fotografiada, emfatitzant el color i el relleu de forma evident. L'RTI no només registra dades sobre el color de la superfície en cada píxel sinó que també emmagatzema in-

⁴ A partir d'una anàlisi a la gota, calculem l'angle de contacte entre la gota d'aigua i la superfície. El resultat serà més o menys hidròfil i ens pot donar pistes respecte a la constitució del material, si es tracta o no d'un material filmogen, etc. Posteriorment observem amb microscopi digital si la zona de la gota s'ha inflat o alterat per estipular si la superfície és més o menys sensible a l'aigua.

⁵ Amb tires indicadores de pH. El sistema de neteja emprat haurà de tenir un pH que estigui en el rang de seguretat de la peça (cada material té un rang de pH de seguretat característic).

⁶ Es mesura la conductivitat de la superfície de l'objecte amb una petita planxa d'agar-agar que posteriorment s'introdueix en un conductímetre de sòlids. D'aquesta manera no cal submergir la peça per poder mesurar la seva conductivitat. El sistema de neteja emprat haurà de tenir una conductivitat similar a la de la superfície a tractar (solució isotònica) per poder actuar eficaçment i sense malmetre el substrat.

⁷ Les cèl·lules viues necessiten energia per sobreviure, i aquesta és emmagatzemada pels bacteris a un element anomenat ATP (adenosí trifosfat: una molècula energètica present a tots els organismes vius) que, gràcies a la bioluminescència, ens serveix d'indicador de la presència de bacteris vius

sobre les superfícies patrimonials. La bioluminescència és una tecnologia basada en la detecció de l'ATP a través de l'enzim present en les cuques de llum (luciferasa) que, en combinar-se amb l'ATP dels bacteris, produeix llum.

⁸ Vegeu BOSCH, M.P. *Caracterización del biodeterioro y desarrollo de nuevos tratamientos de limpieza aplicables a los frescos restaurados de Antonio Palomina en la Iglesia de los Santos Juanes de Valencia*. Tesis Doctoral. València: Editorial Universitat Politècnica de València, 2012, p. 9.

⁹ Vegeu BOSCH, M.P.; REGIDOR, J.L.; SORIANO, P.; DOMÈNECH, M.T.; MONTES, R. "Ensayos de Bioluminiscencia con bacterias en pinturas murales". *Arché*, (2010), núm. 4 i 5, p. 117. Bacteris que no impliquen cap risc ni per al restaurador ni per a l'obra, ja que en assecat-se moren perquè no són capaços de produir formes de resistència (espores).

¹⁰ Vegeu MONTES, R. M. *La Biología y la Restauración. II Seminario Formativa: Bioluminiscencia de Obras de Arte. Apuntes del curso del 31 de mayo al 1 de junio de 2013*. Jaca: Museo Diocesano de Jaca, 2013, p. 23 i 33.

¹¹ Vegeu CIFERRI, O.; TIANO, P.; MASTROMEI, G. *Of Microbes and Art: The role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage*. Nova York: Kluwer Academic, Plenum Publishers, 2000. ISBN: 0306463776, p. 235.

¹² Vegeu GAURI, K.L.; AHAD, N.; CHOWDHURG, N.; KULSHRESHTHA, N.P.; PUNURU, A.R. "The Sulfacation of marble and the treatment of gypsum crust". *Studies in Conservation*, 34, 1989, p. 201-206.

d'hidrofilitat-hidrofobicitat,⁴ de pH⁵ i de conductivitat.⁶ En conclusió, totes aquestes proves havien de servir per conèixer millor què teníem i què volíem eliminar de manera selectiva (sense afectar el suport original), els rangs de pH segurs per a les preparacions aquoses tamponades, la influència del pH sobre l'acció dels quelants en les preparacions, quins quelants serien els més apropiats, quina conductivitat seria necessària per a cada neteja, i com empraríem neteges de base aquosa fent les preparacions prou segures per netejar superfícies especialment sensibles a aquest medi.

En finalitzar totes les proves de les fases 1 i 2, vam establir unes conclusions que ens van permetre escollir un sistema de neteja coherent amb els resultats i que podia eliminar el material aliè respectant el material constituït de cada peça. Tot seguit, durant la fase experimental, vam fer diverses proves de neteja amb els sistemes escollits i amb diversos modes d'aplicació per, finalment, valorar l'efectivitat de les neteges i els avantatges i inconvenients respecte als sistemes de neteja tradicionals: compatibilitat material, coherència, efectivitat, selectivitat, aportació de residus bacterians i dels gels d'aplicació, toxicitat, innocuïtat, valoració econòmica, rapidesa d'acció, etc. La valoració final es va fer gràcies a una segona fase analítica de comprovació, en què vam observar el sistema porós i superficial de les peces amb microscopi digital i làmpada de Wood per comprovar tant la incidència dels residus aportats pels sistemes gelificats com el nivell de neteja aconseguit. D'altra banda, es va constatar amb un luminòmetre mesurador d'ATP,⁷ que no quedaven bacteris vius en les superfícies netejades biològicament, i es va tornar a mesurar el pH, la conductivitat i la hidrofilitat per valorar els canvis soferts després de les neteges.

L'instrumental emprat per a l'estudi d'aquest article és el següent: conductímetre de sòlids Horiba CE B-711®, pH-metre EcoTestr pH2®, tires indicadores de pH, luminòmetre mesurador d'ATP Hygiene System Sure Plus®

amb hisops Ultra Snap®, balança de precisió, termòmetre de superfícies Testo®, tires indicadores de presència de nitrats i nitrats Quantofix®, làmpada de Wood, làmpada d'infrarojos, càmera fotogràfica Nikon D-70® amb objectiu macro, programari RTI Builder i microscopi Digital DinoLite Pro®.

BIONETEGES BACTERIANES: ESTAT DE LA QÜESTIÓ

Els bacteris són éssers vius senzills, microorganismes de 0,5-5,5 µm de mida, formats normalment per una sola cèl·lula procariota, que només és visible al microscopi. Els bacteris no disposen d'un nucli cel·lular diferenciat, sinó que el seu ADN és en el mateix citoplasma i no a l'interior d'una membrana. Poden ser autòtrofs (es nodreixen de matèria inorgànica) o heteròtrofs (es nodreixen de matèria orgànica).⁸

En relació amb el patrimoni, els bacteris poden ser responsables d'alteracions indesitjables per biodeteriorament quan actuen de forma lliure o, per contra, poden ser-nos de gran ajuda en actuacions de conservació-restauració, si els fem de forma dirigida. Quan fem servir els bacteris de manera controlada i, amb els mitjans necessaris, el poder de desagregació que tenen, per nutrició i assimilació durant els seus processos metabòlics, poden ser-nos molt útils per a remoure productes superficials aliens en una peça patrimonial, i per tant, podem fer-los servir per a neteges selectives i complexes. Sempre es tracta de microorganismes no patògens i no esporulants⁹ que no tenen cap risc per a l'ésser humà i tampoc poden propagar-se a l'obra.

Els bacteris necessiten energia per sobreviure, i poden aconseguir-la per mitjà de la llum (fototròfia) o per l'oxidació de diversos compostos (quimiotròfia) tant orgànics (glucoses, acetats, etc.) com inorgànics (H₂, H₂S, Fe²⁺, NH₄⁺, etc.) que, combinats amb l'O₂ ambiental, s'oxiden i es transformen en aigua i nutrients (fonts de carboni i electrons) que els donen energia.¹⁰ Com que la composició química de cada bacteri indica quins són els nutrients requerits per a la seva supervivència, podem escollir un tipus de bacteri o un altre, selectivament, segons el material que desitgem remoure. Els bacteris adequats podran processar, assimilar o descompondre una substància concreta i, així, ajudar-nos amb la seva remoció, que pot ser completada amb acció mecànica i un esbandit posterior a l'activitat biòtica.

Les bioneteges bacterianes, hereves de les neteges enzimàtiques, sorgeixen durant els anys 80, quan apareixen els primers estudis sobre la capacitat dels bacteris per reduir sulfats sobre obres patrimonials. Els primers estudis són de Gauri i Gwinn,¹¹ l'any 1983 i 1989,¹² quan van fer proves de laboratori amb provetes de marbre exposades a 10 ppm de SO₂ al 100% d'humitat i a 20 °C

de temperatura, per després intentar eliminar les crostes negres amb bacteris *Desulfovibrio desulfuricans*. En efecte, van aconseguir reduir les crostes negres (el sulfat de calci dihidratat: guix) en un 80% després d'una immersió de 60 hores. Posteriorment, Gauri traslladaria les proves a una escultura real amb crosta negra, l'any 1992.¹³ Va submergir la peça en un medi de cultiu amb els bacteris, durant 84 hores, obtenint uns resultats només analitzats visualment, sense poder estimar un percentatge aproximat. L'any 1996, Ranalli i Cappitelli prendrien el relleu de Gauri, també tractant escultures de marbre i fins i tot la façana de la catedral de Milà, amb *Desulfovibrio desulfuricans* i *Desulfovibrio vulgaris*, per mitjà d'aplicacions que anaven de 30 a 45 hores.¹⁴ Com a novetats, aquests autors substituïren la immersió com a medi d'aplicació, pels apòsits de cotó i sepiolita¹⁵ i, ja l'any 2006, de Carbogel®.¹⁶ Amb aplicacions més puntuals i concentrades, els temps d'actuació podien reduir-se favorablement i, a més a més, s'evitaven els desavantatges de la immersió¹⁷ que, per una banda, pot dissoldre molts components de les peces que no voldríem dissoldre i, d'altra banda, no tots els objectes poden submergir-se a causa de la seva mida. Així doncs, Ranalli, l'any 1997¹⁸ va desenvolupar l'eliminació dels sulfats presents a una columna i a una escultura amb bacteris sulfat-reductors, però barrejant les soques *Desulfovibrio desulfuricans* i *vulgaris* i en cultiu pur i mixt per millorar el potencial sulfat-reductor. També el va aplicar en condicions anaeròbiques, i amb sepiolita com a suport. Els resultats, a partir de la cromatografia d'intercanvi iònic, van ser de 81% de remoció després de 36 hores d'aplicació. Com a inconvenients, el sulfur d'hidrogen va reaccionar amb el ferro present en el substrat de les peces i va formar precipitats de sulfur de ferro (taques fosques sobre la pedra). Posteriorment, l'any 2006 arribarien noves aportacions i millores de la mà de Cappitelli.¹⁹ El mètode es basà en l'ús de bacteris igualment sulfat-reductors, però aquest cop aplicats a partir de Carbogel® i amb un sistema que evités la formació de sulfurs de ferro. Es tractava, doncs, d'una metodologia millorada per eliminar crostes negres fent servir *Desulfovibrio vulgaris* ATCC 29579, que elimina el guix de nova formació (dissocia el sulfat càlcic en ions calci i sulfats) en el que s'havia transformat el carbonat càlcic en presència de SO₂ (àcid sulfúric procedent de la contaminació ambiental) i, d'altra banda, els ions calci reaccionen amb el CO₂ ambiental generant nova calcita. D'aquesta manera, els bacteris emprats eliminen el guix de les crostes i, a la vegada, consoliden parcialment el material. Aquestes proves van aconseguir eliminar el 98% dels sulfats en 45 hores de tractament i l'ús del Carbogel® va demostrar ser superior tant a la sepiolita com a l'Hydrobiogel-97® i el cotó, ja que va permetre que els bacteris estiguessin en un medi sempre humit, mantenint correctament la seva activitat fins al final del tractament.

Després d'aquesta primera experiència, Cappitelli va voler aprofundir d'una manera més comparativa i l'any 2007 va efectuar, sobre el mateix suport, un estudi que comparava la bioneteja d'un fragment de marbre de la catedral de Milà amb una neteja tradicional química de les crostes negres.²⁰ La neteja química es va fer mitjançant apòsits de carbonat d'amoni i EDTA, i la biològica, del mateix mode que en els estudis de l'any 2006. En contrast amb el mètode de neteja química, el procediment biològic va donar un resultat d'eliminació més homogeni i no perjudicava el substrat sota la crosta. A més a més, el tractament químic va formar sulfats de sodi com a residus indesitjables.

Els últims avenços en la matèria de la bioneteja de crostes negres han estat publicats l'any 2013, de la mà de Federica Troiano.²¹ En aquest estudi, encara que es destaca l'eficàcia de les bionetejes amb bacteris reductors de sulfats, es parla dels inconvenients, com la llarga durada dels tractaments quan les crostes són gruixudes, o la dificultat d'emprar aquesta tècnica en la realitat d'una restauració complexa i de grans dimensions (el la qual no es pugui treballar en un laboratori de microbiologia on les condicions són ideals, on el material es pot esterilitzar, els tractaments poden mantenir-se a temperatures estables durant moltes hores, i les tasques es poden desenvolupar en ambients anaeròbics). Per a fer front a aquestes dificultats, van experimentar efectuant un pretractament amb tensioactiu no iònic i després van aplicar els bacteris *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* ATCC 29579. L'acoblament d'ambdós tractaments va eliminar la crosta sense afectar el marbre original, reduint un 70% el temps de neteja. El detergent només elimina algunes capes superficials, adherides sobre la crosta negra, i permet que després els bacteris actuïn millor i més ràpid sobre les crostes. També es van estalviar aplicacions biològiques, ja que s'acostumen a canviar els bacteris cada 15 hores.²²

No és fins a l'any 1996, amb Ranalli, quan es comença a explorar l'eliminació de nitrats i coles orgàniques amb bionetejes bacterianes. L'any 2000 va publicar un article en què les inoculacions es van fer amb apòsits de sepioli-

¹³ Vegeu GAURI, L. K.; PARKS, L.; JAYNES, J.; ATLAS, R. "Removal of sulphated-crust from marble using sulphate-reducing bacteria", a: ROBIN, G.M. (ed.). *Stone cleaning and the nature, soiling and decay mechanisms of stone. Proceedings of the International Conference, 14 to 16 April 1992*. Edimburg: Donhead Publishing Ltd., 1992, p. 160-165.

¹⁴ Vegeu MONTES, R. M. *Primeras experiencias de Biolimpeza y Bioconsolidación de Bienes Culturales. II Seminario Formativo: Biolimpeza de Obras de Arte. Apuntes del curso del 31 de mayo al 1 de junio de 2013*. Jaca: Museo Diocesano de Jaca, 2013, p. 21.

¹⁵ Vegeu RANALLI, G.; CHIAVARINI, M.; GUIDETTI, V.; MARSALA, F.; MATTEINI, M.; ZANARDINI, E.; SORLINI, C. "The use of microorganisms for the removal of sulphates on artistic stoneworks." *International Biodeterioration & Biodegradation, The III International Symposium on Biodeterioration and Biodegradation*. Volum 40, 1997, p. 255.

¹⁶ Vegeu CAPPITELLI, F.; ZANARDINI, E.; RANALLI, G.; MELLO, E.; DAFFONCHIO, D.; SORLINI, C. "Improved Methodology for Bioremoval of Black Crusts on Historical Stone Artworks by Use of Sulfate-Reducing Bacteria". *Applied and environmental microbiology*. Vol. 72 (maig de 2006), núm. 5, p. 3.733.

¹⁷ Vegeu CAPPITELLI, F.; ZANARDINI, E.; RANALLI, G.; MELLO, E.; DAFFONCHIO, D.;

SORLINI, C. "Improved Methodology for Bioremoval of Black Crusts...", p. 3.733.

¹⁸ Vegeu RANALLI, G.; CHIAVARINI, M.; GUIDETTI, V.; MARSALA, F.; MATTEINI, M.; ZANARDINI, E.; SORLINI, C. "The use of microorganisms for the removal of sulphates...", p. 255.

¹⁹ Vegeu CAPPITELLI, F.; ZANARDINI, E.; RANALLI, G.; MELLO, E.; DAFFONCHIO, D.; SORLINI, C. "Improved Methodology for Bioremoval of Black Crusts...", p. 3.733.

²⁰ Vegeu CAPPITELLI, F.; TONIOLO, L.; SANSONETTI, A.; GULOTTA, D.; RANALLI, G.; ZANARDINI, E.; SORLINI, C. "Advantages of Using Microbial Technology over Traditional Chemical Technology in Removal of Black Crusts from Stone Surfaces of Historical Monuments". *Applied and environmental microbiology*. Vol. 73 (setembre de 2007), núm. 17, p. 5.671-5.675.

²¹ Vegeu TROIANO, F.; GULOTTA, D.; BALLOI, A.; POLO, A.; TONIOLO, L.; LOMBARDI, E.; DAFFONCHIO, D.; SORLINI, C.; CAPPITELLI, F. "Successful combination of chemical and biological treatments for the cleaning of stone artworks". *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 85, (novembre de 2013), p. 294-304.

²² Vegeu TROIANO, F.; GULOTTA, D.; BALLOI, A.; POLO, A.; TONIOLO, L.; LOMBARDI, E.; DAFFONCHIO, D.; SORLINI, C.; CAPPITELLI, F. "Successful combination of chemical and biological...", p. 294.

²³ Vegeu RANALLI, G.; MATTEINI, M.; TOSINI, I.; ZANARDINI, E.; SORLINI, C. "Bioremediation of Cultural Heritage: Removal of Sulphates, Nitrates and Organic Substances". A: CIFERRI, O.; TIANO, P.; MASTROMEI, G. *Of Microbes and Art: The role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage*. Nova York: Kluwer Academic, Plenum Publishers, 2000. ISBN: 0306463776, p. 231.

²⁴ Vegeu RANALLI, G.; MATTEINI, M.; TOSINI, I.; ZANARDINI, E.; SORLINI, C. "Bioremediation of Cultural Heritage: Removal of Sulphates...", p. 232.

²⁵ Vegeu ALFANO, G.; LUSTRATO, G.; BELLI, C.; ZANARDINI, E.; CAPPITELLI, F.; MELLO, E.; SORLINI, C.; RANALLI, G. "The bioremoval of nitrate and sulfate alterations on artistic stonework: The case-study of Matera Cathedral after six years from the treatment". *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol. 65 (octubre de 2011), núm. 7, p. 1.004-1.011.

²⁶ Vegeu ALFANO, G.; LUSTRATO, G.; BELLI, C.; ZANARDINI, E.; CAPPITELLI, F.; MELLO, E.; SORLINI, C.; RANALLI, G. "The bioremoval of nitrate and sulfate alterations...", p. 1.004.

²⁷ Vegeu ANTONIOLI, P.; ZAPPAROLI, G.; ABBRUCATO, P.; SORLINI, C.; RANALLI, G.; RIGHETTI, P.G. "Art-Loving Bugs: The resurrection of Spinello Aretino from Pisa's cemetery". *Proteomics* (2005), núm. 5, p. 2.453-2.459.

²⁸ Vegeu ANTONIOLI, P.; ZAPPAROLI, G.; ABBRUCATO, P.; SORLINI, C.; RANALLI, G.; RIGHETTI, P.G. "Art-Loving Bugs: The resurrection of Spinello...", p. 2.454.

²⁹ Vegeu ANTONIOLI, P.; ZAPPAROLI, G.; ABBRUCATO, P.; SORLINI, C.; RANALLI, G.; RIGHETTI, P.G. "Art-Loving Bugs: The resurrection of Spinello...", p. 2.456.

³⁰ Vegeu SORLINI, C.; CAPPITELLI, F. "The application of viable bacteria for the biocleaning of cultural heritage surfaces". *Coalition*, núm. 15 (gener de 2008), p. 18-20. ISSN 1579-8410 18.

³¹ Vegeu BOSCH, M.P.; REGIDOR, J.L.; SORIANO, P.; DOMÈNECH, M.T.; MONTES, R. "Ensayos de Biolimpieza con bacterias...", núm. 4 i 5, p. 117-124.

³² Vegeu BOSCH, M.P. *Caracterización del biodeterioro y desarrollo...*

³³ Vegeu BOSCH, M.P.; REGIDOR, J.L.; SORIANO, P.; DOMÈNECH, M.T.; MONTES, R. "Ensayos de Biolimpieza con bacterias...", núm. 4 i 5, p. 118.

³⁴ Vegeu BOSCH, M.P.; REGIDOR, J.L.; SORIANO, P.; DOMÈNECH, M.T.; MONTES, R. "Ensayos de Biolimpieza con bacterias...", núm. 4 i 5, p. 118.

³⁵ Formades per deposició de contaminants atmosfèrics que amb l'aigua produeixen àcids que reaccionen amb el carbonat, produint sulfats i nitrats. Durant la cristallització del guix (sulfat càlcic), altres contaminants de l'aire, com per exemple les partícules carbonoses, s'incrusten en la matriu mineral generant l'ennegritament típic de les crostes negres.

³⁶ Formades per deposició de contaminants atmosfèrics o per filtració-acumulació de detritus.

³⁷ Capes formades per deposició de partícules atmosfèriques, per colonització de microorganismes o per aportacions de processos de restauració.

ta. Per a la remoció de nitrats, van fer servir *Pseudomonas stutzeri* i *Pseudomonas aeruginosa*. Després de 30 hores d'actuació, el 90% dels nitrats havia desaparegut.²³ Per a la matèria orgànica (restes de cola animal d'una antiga restauració sobre una pintura mural), van emprar *Pseudomonas stutzeri*, durant 8 hores, aconseguint eliminar el 100% de les restes de col·lagen²⁴. El 2005 Cappitelli aplicà aquestes tècniques que fins ara no havien sortit del laboratori, sobre una gran superfície com els murs de la catedral de Matera (Itàlia), on es va eliminar el 90% dels nitrats mitjançant l'aplicació de *Pseudomonas pseudoaeruginosa* Kf707 i *Desulfovibrio vulgaris* ATCC 29579. Es va aplicar la solució bacteriana gelificada amb Carbo-gel®. Es van emprar els bacteris tan individualment, com combinats. En 24 hores, s'havien remogut ja el 55% dels nitrats i el 85% dels sulfats dels murs²⁵. Sis anys després, el 2011 es va fer un estudi de control dels efectes de la neteja dels murs de Matera, i les conclusions van ser que no hi havia hagut variacions de color apreciables, i que els efectes eren encara satisfactoris.²⁶

Antonoli²⁷, l'any 2005, va eliminar amb èxit restes de cola animal procedents de l'arrencament d'unes pintures murals d'Spinello Aretino a Pisa, amb *Pseudomonas stutzeri* i enzims en aplicacions de 2 a 17 hores. La principal dificultat d'aquest cas va ser que la cola animal amb la que s'havia fet l'estrappo, havia estat barrejada amb formaldehid com a antimicrobià²⁸ i, per tant, els enzims aplicats per eliminar la cola no eren capaços d'actuar, però ho feren els bacteris. Els van aplicar amb cotó com a sustentant, eliminant el 100% de les restes de cola.²⁹

L'any 2008, Sorlini i Cappitelli³⁰ van realitzar un estudi comparatiu entre neteges biològiques i químiques, arribant a la conclusió que la neteja química no és homogènia, ataca la superfície original de la pedra i forma cristalls

de sulfat de sodi indesitjables. Al contrari, la neteja biològica és molt homogènia, no ataca la patina original i no genera subproductes aliens, només la calcita en alguns casos que, a més a més, serveix de consolidant natural.

Cal destacar que la Universitat Politècnica de València va publicar l'any 2010 uns estudis³¹ que es van dur a terme a l'Institut Universitario de Restauración del Patrimonio de la Universidad Politécnica de Valencia, per a la tesi doctoral de Maria del Pilar Bosch, que es publicà posteriorment, l'any 2012.³² Tant a la tesi com als articles, l'equip valencià desenvolupà l'ús dels bacteris *Pseudomonas stutzeri* DSMZ 5190 per a la bioneteja de pintures murals amb restes de matèria orgànica d'arrencament i traspàs, així com d'eflorescències salines de nitrats, que ja havien intentat eliminar mitjançant tècniques fisicoquímiques sense obtenir bons resultats, com les resines d'intercanvi iònic, per exemple.³³ Com a novetat, adoptaren els gels rígids d'agar com a manera d'aplicació dels bacteris, però només com a suport humectant dels mateixos. Les conclusions dels estudis són que els bacteris DSMZ 5190 eliminen molt eficientment cola orgànica i eflorescències de nitrats i sulfats sobre pintures murals reals en condicions aeròbies reals i in situ.³⁴

A tall de conclusió, podríem dir que les neteges bacterianes s'han emprat fins ara per eliminar crostes negres en material petri³⁵ (sulfats i nitrats majoritàriament), eflorescències salines³⁶ (nitrats principalment) i matèria orgànica aliena³⁷ (restes orgàniques de deposició i coles aportades). Evidentment, per remoure aquestes capes alienes cal emprar bacteris específics segons la seva capacitat metabòlica: bacteris reductors de sulfats per eliminar crostes negres i sulfats, bacteris reductors de nitrats per eliminar eflorescències de detritus, i bacteris heteròtrofs per eliminar matèria orgànica diversa.

LES BIONETEGES BACTERIANES EN CONTRAPOSICIÓ A LES NETEGES TRADICIONALS

Segons els estudis científics abans esmentats, les neteges bacterianes poden solucionar amb gran efectivitat uns problemes de conservació fins ara molt complexos. Les sals i les coles animals polimeritzades i envellides són dos dels grans problemes de la restauració, per la seva gran dificultat de remoció. Fins ara, els sistemes tradicionals fisicoquímics ho han intentat amb força però, o bé no remouen amb eficàcia les substàncies esmentades, o bé aporten més i majors problemes a curt i llarg termini sobre les peces.

Tant els apòsits de carbonat d'amoni i d'EDTA com les resines d'intercanvi iònic aporten molta humitat i sals alienes als suports, que cal esbandir molt bé, aportant de nou molta humitat i eliminant els sulfats només parcialment. A més a més, són mètodes poc selectius, agressius, invasius,

tòxics per al restaurador i que poden afectar també el suport original. Per contra, els tractaments amb bacteris són molt selectius, molt eficaços, no tòxics per al restaurador i innocus per a l'obra patrimonial.³⁸ També, els microorganismes bacterians presenten avantatges sobre els tractaments enzimàtics, ja que els bacteris poden metabolitzar millor substàncies complexes i incrustades. Els enzims són massa selectius i febles per a remoure matèries tan complexes com els sulfats o els nitrats. En canvi, els bacteris, gràcies als mecanismes d'inducció gènica, s'adapten a diversos nutrients, sintetitzant els enzims necessaris per degradar un rang més ampli de substàncies.³⁹ Un altre avantatge és el preu: els enzims són de 3 a 10 vegades més cars que els bacteris.

EL PROBLEMA DE L'AIGUA I L'ELECCIÓ DELS SUPORTS D'APLICACIÓ

Com ja sabem, l'aigua és un agent netejador molt important, però cal controlar-ne els inconvenients. Té un poder d'humectació sovint limitat a causa de la seva elevada tensió superficial, mentre que manifesta una elevada difusió vertical per capilaritat en els materials porosos. En el cas de les bionetesges, normalment necessitem una difusió més limitada, per concentrar el poder dels bacteris a la superfície de l'obra patrimonial. A més a més, la difusió vertical de l'aigua, amb la posterior evaporació superficial, fa precipitar les sals dissoltes en l'aigua, recristal·litzant-les i generant disrupció mecànica en superfície. D'altra banda, atès el seu poder dissolvent, l'aigua és incompatible amb els suports artístics més hidròfils, com ara tremps magres, tèxtils i fustes degradades entre altres, a més a més que pot arribar a desenvolupar altres agents de biodeteriorament no controlats, accelerant la degradació de l'obra.⁴⁰ Tot i això, l'aigua és absolutament necessària en el procés de la bioneteja, ja que els bacteris han de romandre dins d'un medi aquós per mantenir-se vius, així doncs, calia idear un mètode per aconseguir un ambient humit de llarga durada sobre les obres, però que romangués en superfície. La solució no és altra que fer servir medis gelificats, perquè a més a més de localitzar l'acció i disminuir l'evaporació de la solució aquosa-bacteriana, el sistema gelificat redueix la penetració i millora l'acció del mullat superficial.⁴¹ Fins ara, com ja hem explicat a l'apartat anterior, els apòsits havien estat de sepiolita o cotó, amb Ranalli i Cappitelli⁴² des de 1996, i de Carbogel® a partir de 2006, en els estudis de Cappitelli i Zanardini.⁴³ Els gels van aportar millores significatives, permetent als bacteris romandre vius i més actius durant moltes més hores. Els bacteris atrapats en el gel actuen de manera més gradual i prolongada en el temps, i amb una penetració vertical de l'aigua, molt inferior als apòsits. El cotó i la sepiolita, per contra, generen cicles d'absorció i desorció periòdics, que fan circular dintre del sistema porós tant les capes que desitjàvem eliminar, com les sals presents en el substrat. A més a més, l'assecatge de

l'apòsit és més ràpid i els bacteris comencen a morir en un temps bastant accelerat. Els gels, no obstant això, tenen el problema de la remoció i els residus, ja que segons de quin tipus de gelificant es tracta, és més o menys adhesion i, per tant, més o menys difícil de remoure. Els residus sòlids del material gelificant no evaporen ni se sublimen, sinó que poden romandre per sempre en el sistema porós de la superfície netejada. D'una banda, els gelificants (Colles, cel·luloses o gomes) són solubles en aigua, per tant, haurien de poder-se remoure o eliminar completament a base d'esbandits. No obstant això, un esbandit repetit i insistent no sempre és compatible amb les superfícies tractades, on precisament hem fet servir un sistema gelificat per limitar-ne l'acció mullant del tractament escollit. El restaurador ha de procurar reduir al màxim els residus sobre l'obra, així que cal evitar l'ús de gels líquids en superfícies molt poroses, texturades o amb esquerdes, perquè la remoció dels residus es faria molt més complexa en aquests casos. D'altra banda, es poden prendre altres precaucions, com interposar un paper japonès com a barrera. Tot i així, si el gel és molt dens, els bacteris no poden moure's amb llibertat i poden restar pràcticament encapsulats dins, per exemple, d'un gel rígid d'agar-agar, sense poder efectuar correctament la seva funció. A més a més, en un gel d'agar-agar els bacteris que no quedin en la zona de contacte directe amb la superfície patrimonial, no seran útils, perquè no podran arribar a la superfície a tractar. D'altra banda, els gels líquids, afegeixen el gran problema de la remoció i dels residus, així que la solució més adient ha estat trobada per l'equip de la UPV:⁴⁴ aplicar a pinzell la solució bacteriana sobre el suport i immediatament aplicar a sobre un gel rígid d'agar-agar que només conté aigua. El gel manté humectats els bacteris i, alhora, controla la seva penetració i actuació, ja que té un alt poder d'absorció d'aigua, retenint-la i alliberant-la de manera progressiva i uniforme, en petits cicles.

Paral·lelament a l'estudi bibliogràfic sobre gels, vam efectuar proves d'humectació i remoció amb diversos gels i sustentants⁴⁵ com agar-agar al 2%, agar-agar al 4%, Carbogel® a l'1,5%, Klucel G® al 4%, Carboximetilcel·lulosa al 4% i el sustentant de polpa de paper Arboce®⁴⁶, arribant a les mateixes conclusions que la UPV.

FASE EXPERIMENTAL: ELECCIÓ DEL BACTERI

Iniciem les proves sobre quatre peces escollides pel material constitutiu. Es tracta de quatre peces provinents d'excavació: un fragment ceràmic, un os de bòvid i dos fragments pertanyents a una mateixa pintura mural.⁴⁶

Com ja hem esmentat anteriorment, abans d'iniciar una neteja hem de conèixer al màxim la tècnica i els materials de l'obra patrimonial que tractarem. A més a més de la informació històrica i tècnica, que ja ens dona moltes pistes, cal sumar-hi l'experiència del restaurador i sobretot,

³⁸ Vegeu BOSCH, M.P.; REGIDOR, J.L.; SORIANO, P.; DOMÈNECH, M.T.; MONTES, R. "Ensayos de Biolimpieza con bacterias...", núm. 4 i 5, p. 117.

³⁹ Vegeu BOSCH, M.P.; REGIDOR, J.L.; SORIANO, P.; DOMÈNECH, M.T.; MONTES, R. "Ensayos de Biolimpieza con bacterias...", núm. 4 i 5, p. 118.

⁴⁰ Vegeu REGIDOR, J. L. *Limpieza con bacterias. Un sistema acuoso: metodologías de aplicación. II Seminario Formativo: Biolimpieza de Obras de Arte. Apuntes del curso del 31 de mayo al 1 de junio de 2013*. Jaca: Museo Diocesano de Jaca, 2013, p. 5.

⁴¹ Vegeu REGIDOR, J. L. *Limpieza con bacterias. Un sistema acuoso...*, p. 11.

⁴² Vegeu RANALLI, G.; CHIAVARINI, M.; GUIDETTI, V.; MARSALA, F.; MATTEINI, M.; ZANARDINI, E.; SORLINI, C. "The use of microorganisms for the removal...", p. 255.

⁴³ Vegeu CAPPITELLI, F.; ZANARDINI, E.; RANALLI, G.; MELLO, E.; DAFFONCHIO, D.; SORLINI, C. "Improved Methodology for Bioremoval of Black Crusts...", p. 3.734.

⁴⁴ Vegeu BOSCH, M.P.; REGIDOR, J.L.; SORIANO, P.; DOMÈNECH, M.T.; MONTES, R. "Ensayos de Biolimpieza con bacterias...", p. 117-124.

⁴⁵ Vam efectuar proves d'humectació i remoció, a més a més de proves d'envelliment dins d'un armari estufa a 28° C simulant l'incubació dels bacteris.

⁴⁶ Al treball complet es van tractar set peces escollides tant pel seu material constitutiu com per la seva problemàtica i capes de superfície: d'una banda, peces museïtzades des de fa molts anys, que combinaven la problemàtica pròpiament arqueològica amb actuacions de restauració successives; d'altra banda, peces provinents directament d'excavació. Les peces: un socarrat medieval, una peça d'ivori del segle XVIII, un os de bòvid tardoantig, dos fragments de pintura mural romana, un fragment de ceràmica tardoantiga i un segell de cera romànic.

⁴⁷ Vegeu WOLBERS, R. *Le nettoyage des surfaces peintes. Méthodes aqueuses*. París: Institut National du Patrimoine, Eyrolles, 2013, p. 172.

⁴⁸ En altres casos del treball es van incloure tècniques instrumentals com el FT-IR.

⁴⁹ La resta de peces estudiades durant el treball van ser peces reals amb problemàtiques reals.

⁵⁰ Vegeu RANALLI, G.; MATTEINI, M.; TOSINI, I.; ZANARDINI, E.; SORLINI, C. "Bioremediation of Cultural Heritage: Removal of Sulphates, Nitrates and Organic Substances". A: CIFERRI, O.; TIANO, P.; MASTROMEI, G. *Of Microbes and Art: The role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage*. Nova York: Kluwer Academic, Plenum Publishers, 2000, p. 231-245. ISBN: 0306463776.

⁵¹ Vegeu ANTONIOLI, P.; ZAPPAROLI, G.; ABBRUCCATO, P.; SORLINI, C.; RANALLI, G.; RIGHETTI, P.G. "Art-Loving Bugs: The resurrection of Spinello Aretino from Pisa's cemetery". *Proteomics* (2005), núm. 5, p. 2.453-2.459.

⁵² Vegeu BOSCH, M.P. *Caracterización del biodeterioro y desarrollo...*, p. 198.

⁵³ Dos fragments descontextualitzats (sense punt d'unió amb la resta de fragments) de pintura mural corresponents a un conjunt de 162 fragments, recuperats durant l'excavació (ja estaven despresos del mur). La pintura correspon al tercer estil pompeïà, que destaca pels fons de colors plans amb petites decoracions en miniatura i garlandes. Destaquen en aquest cas els colors vermell, verd, groc, malva i blanc. La pintura ha estat realitzada al fresc amb detalls al sec. El MAC Empúries va efectuar una neteja superficial i un muntatge previ a l'adhesió. Actualment està sent restaurat a l'ESCRBCC.

⁵⁴ Existeixen límits en les tècniques analítiques que poden no reconèixer elements complexos com, per exemple, aglutinants alterats. No obstant això, hi ha sospites, per tradició i analítiques, que es pugui tractar d'un tremp d'ou.

i sempre que sigui possible, informació contrastada per mitjà d'anàlisis instrumentals que ens ajudin no només a comprendre les tècniques i les capes de superfície, sinó també les proporcions i presència de cada substància estudiada, així com l'estat de degradació de les mateixes.⁴⁷

En els casos presentats, per les seves característiques, vam fer observació macroscòpica amb microscopi digital, fotografia UV amb làmpada de Wood i tests de pH, conductivitat i hidrofilitat.⁴⁸

Finalment, com que no vam poder aconseguir per al treball mostres reals amb restes destacables de coles orgàniques i nitrats (els elements amb els quals volíem testar les bioneteges), vam fer provetes amb fragments descontextualitzats,⁴⁹ induint cola i nitrats sobre els fragments, simulant atacs greus de sals en el cas de la ceràmica i l'os, i una intervenció de traspàs inadequat amb cola de conill en el cas dels fragments de pintura mural.

Una vegada conegudes les substàncies que volíem remoure, calia escollir el bacteri per eliminar-les. En el nostre cas, volíem eliminar tant nitrats com cola animal. Com ja hem vist abans, segons la bibliografia, en bioneteges s'han emprat bacteris desnitrificants com la *Pseudomonas aeruginosa* (descartada per ser patògena), la *Pseudomonas stutzeri* o la *Pseudomonas desnitrificans*, sobre murs i material petri.⁵⁰ En canvi, en relació a l'ús de bacteris per eliminar cola animal, hem trobat menys bibliografia, però concretament aplicada a pintura mural.⁵¹

El bacteri emprat amb èxit per eliminar coles animals és la *Pseudomonas stutzeri* que, com acabem d'esmentar, també és desnitrificant, per això, amb una sola soca de bacteri podríem fer les dues proves d'aquest treball i, per tant, fou el bacteri escollit.

Els bacteris es van comprar en cultiu liofilitzat a la col·lecció alemanya de cultius tipus *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* i es va escollir la soca DMSZ 5190 pels bons resultats obtinguts durant les proves de la

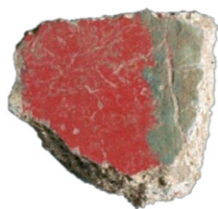
UPV per a la investigació de Doctorat de Maria del Pilar Bosch.⁵² La *Pseudomonas stutzeri* DMSZ 5190 es va desenvolupar bé entre 25 ° i 30 °C i en ambient tant aeròbic com anaeròbic. També es va desenvolupar bé en medis de cultiu amb nitrats i amb coles, i va eliminar favorablement ambdues substàncies. Com que no disposem d'un labora-

tori de microbiologia, des de la Universitat Politècnica de València, ens van permetre molt amablement fer les proves allà als seus laboratoris, amb el doctor i professor José Luis Regidor i la post-doctoranda Pilar Bosch. Els bacteris escollits es van preparar abans d'iniciar les tasques de neteja, fent-los créixer durant cinc dies en dos medis de cultiu: d'una banda, en medi M9 diluït al 50% (3 grams de Na₂HPO₄, 1,5 grams de KH₂PO₄, 0,5 grams de NH₄Cl i 0,25 grams de NaCl en 1 litre d'aigua destil·lada) amb un 1% de cola animal, i d'altra banda, en medi nitrat. Després de cinc dies de cultiu i creixement, els bacteris es van plantar en matrassos en agitació a 28 °C, 24 hores per obtenir el punt màxim de creixement exponencial. Finalment es van rentar i centrifugar en tres cicles de 10 minuts a 4.200 rpm per a finalment suspendre'ls en aigua destil·lada estèril. D'aquesta manera, no s'aplica sobre l'obra cap element que no siguin bacteris i aigua estèril.

FASE EXPERIMENTAL: REMOCIÓ DE COLA ANIMAL AMB *PSEUDOMONAS STUTZERI*

Per a les proves de remoció de cola animal, preparam dues provetes a partir de material real arqueològic. El MAC Empúries i l'ESCRBCC ens cedeixen temporalment per a l'assaig dos petits fragments descontextualitzats de pintura mural romana, provinents de la unitat estratigràfica 2209 del jaciment arqueològic d'Empúries, i datats entre els segles I aC-I dC.⁵³ Els fragments estan conformats per morter natural de calç, pigments aplicats al fresc i detalls al sec (tremp).¹

1



[1] Mostres de pintura mural abans de la intervenció (Fotografia: Silvia Marín).

Abans de tractar les peces vam fer l'estudi analític previ per saber si podríem aplicar la neteja bacteriana sense ocasionar problemes als fragments. La pintura presenta uns detalls al sec que, segons els estudis realitzats fins ara, semblen ser un tremp del qual es desconeix l'aglutinant.⁵⁴ Si es tractés d'un tremp d'ou, seria bastant inalterable i, si fos de cola, podria ser

alterat per la bioneteja, però si la cola està molt polimeritzada (ja que ha arribat als nostres dies en bon estat de conservació), serà molt difícil que el bacteri pugui atacar-lo, i en tot cas, realitzaríem proves per comprovar-ho. D'altra banda, a partir de l'observació d'una microgota d'aigua aplicada sobre la superfície amb un tub capil·lar, constatem com la superfície absorbeix l'aigua absolutament, és a dir, que es tracta d'una superfície molt hidròfila. Posteriorment, amb microscopi digital, vam observar que els pigments no s'havien mogut ni alterat amb l'acció de l'aigua. Tot seguit fem unes proves de neteja aquosa en estat lliure i, en efectuar la fricció típica d'una neteja aquosa lliure ordinària, es va apreciar un cert alliberament de partícules de pigment. Així doncs, després d'aquestes primeres proves, observem que les mostres suporten l'acció de l'aigua en quantitats moderades i creiem que la neteja efectuada podrà contenir un mitjà bacterià-aquós però gel·lificat i que no necessiti passades o esbandides successives ni d'una acció mecànica destacable.

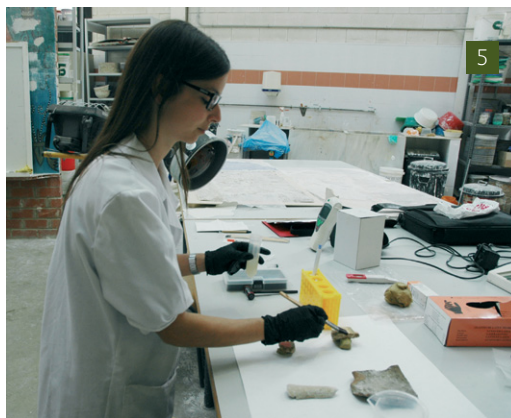
Amb la mesura del pH vam obtenir un pH de 8 en ambdues superfícies i, per tant, la solució bacteriana, que té un pH 7, és prou coherent amb el suport que volfem tractar.

Finalment, procedim a mesurar la conductivitat de les restes murals. A partir de l'aplicació d'un gel rígid d'agar-agar sobre la superfície de la peça, i deixant-lo actuar durant 20 minuts, podem conèixer la conductivitat de la seva superfície. Un cop passats els 20 minuts, ens dona un resultat final de 940 μS el fragment vermell, i 920 μS el fragment blanc. ²

[2] Mesura de conductivitat superficial amb gel rígid d'agar-agar (Fotografia: Silvia Marín).



Preparem les provetes: apliquem cola de conill en proporció 1:3 a pinzell sobre els fragments de pintura mural per simular restes d'una antiga intervenció. ³ Es va iniciar el cultiu dels bacteris una setmana abans de començar la remoció de la cola. Com ja hem explicat a la primera part de l'article, la *Pseudomonas stutzeri* DMSZ 5190 es fa créixer durant 5 dies en un medi de cultiu al qual se li afegeix un 1% de cola i nitrats. Després de cinc dies de cultiu i creixement, els bacteris es planten en matrassos en agitació a 28 °C, 24 hores per obtenir el punt màxim de creixement exponencial. Final-



[3] Elaboració de les provetes a partir de l'aplicació de cola de conill sobre les mostres.

[4] Escalfament de les mostres a 28 °C per tal de generar un ambient ideal per als bacteris. Departament de pintura mural de la UPV (Fotografies: Silvia Marín).

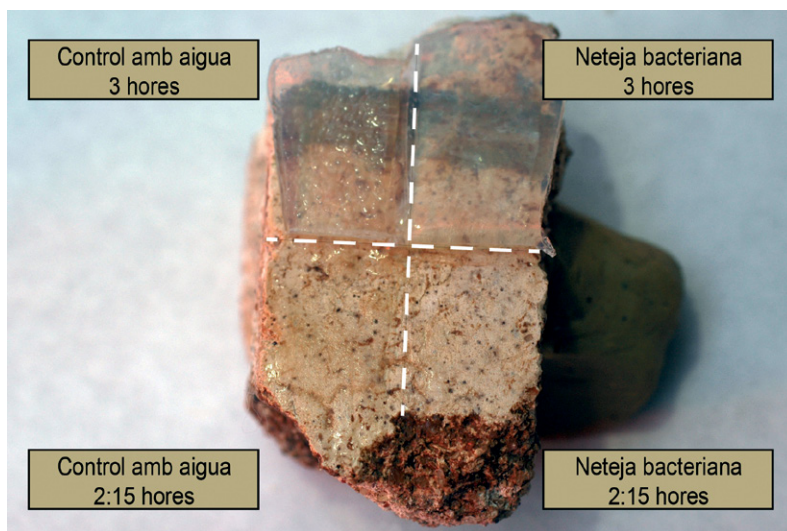
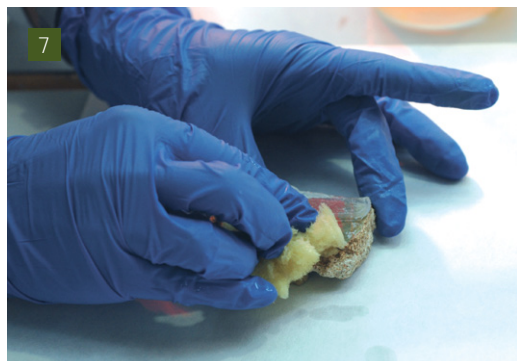
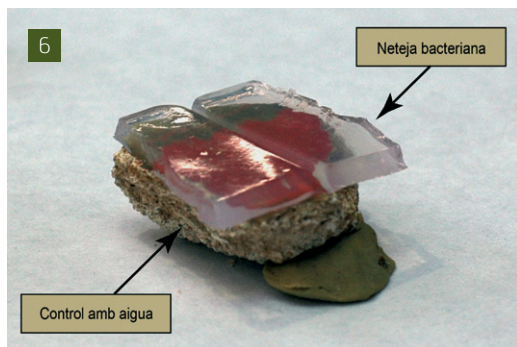
[5] Aplicació de la solució bacteriana sobre els fragments de pintura mural. Departament de pintura mural de la UPV (Fotografia: Pilar Bosch).

ment es renten i centrifuguen en tres cicles de 10 minuts a 4200 rpm per suspendre'ls en aigua destil·lada estèril. El dia de la inoculació es van escalfar els bacteris i les superfícies de la pintura mural entre 28 i 30 °C amb l'ajuda d'una làmpada d'infrarojos i d'un termòmetre de superfície. ⁵⁵ ⁴ Vam mantenir la temperatura estable durant les proves. Just abans d'aplicar els bacteris comprovem que aquests es troben vius i en concentració suficient. Amb l'ajuda del luminòmetre mesurador d'ATP, vam obtenir una mesura de 7.517 URL ⁵⁶ en 10 μl de solució.

Apliquem els bacteris a pinzell ⁵ i, just a sobre, afegim una planxa de gel rígid d'agar-agar al 2% capaç d'aportar una

⁵⁵ Vegeu BOSCH, M.P. *Caracterización del biodeterioro y desarrollo...*, p. 200. La temperatura idònia per a aquests tipus de bacteri és de 25 a 30° C, preferiblement 28° C. Per poder aconseguir aquesta temperatura, tant en la superfície pictòrica com en la solució bacteriana, fem servir una làmpada de llum infraroja i un termòmetre de superfície.

⁵⁶ Unitats Relatives de Llum.



ment, es va esbandir amb aigua desionitzada a esponja, limitant-ne la humitat. ⁷

Després d'aquesta primera aplicació de 2 h 15 min, vam observar els resultats, que van ser molt similars en ambdós fragments. Només a simple vista ja s'observava que la part netejada amb bacteris havien remogut molt millor la cola. ⁸

A les 3 hores vam procedir a remoure els bacteris que quedaven i els resultats van ser encara millors, ⁹ ¹⁰ i ¹¹ tot i que es podria ampliar el temps d'actuació perfectament fins a 4 hores per aconseguir una remoció de la cola més completa. De seguida advertim que la remoció de la cola és molt més senzilla a la zona tractada amb bacteris. Sobre els retocs al sec, vam fer les mateixes proves i fins i tot insistim amb certa acció mecànica, obtenint uns resultats igual de bons i sense advertir cap canvi, remoció ni alteració en la policromia.

Per acabar, mesurem l'ATP sobre les superfícies tractades per comprovar que havíem esbandit correctament i

que no quedaven bacteris vius a la superfície patrimonial: de 7.517 URL que hi havia en 10 µl de solució bacteriana en inocular les mostres de pintura, un cop acabat el tractament, només en queden 32 URL que és una quantitat no apreciable.⁵⁷

També vam tornar a prendre les mesures de conductivitat i pH, que van ser, en el cas de la pintura vermella, 300 µS i un pH de 7,5 i, en el cas de la pintura blanca, 250 i un pH de 7,5. Observàrem que els nivells de pH havien variat molt poc però que, a més a més de les coles, la neteja havia rebaixat destacablement la presència d'ions lliures, potser a causa que

els bacteris havien processat algunes sals, o potser per l'acció solvent de l'aigua.

FASE EXPERIMENTAL: REMOCIÓ DE NITRATS AMB PSEUDOMONAS STUTZERI

Per iniciar les proves de remoció de nitrats, preparem dues provetes a partir de material real arqueològic. El Laboratori d'Arqueologia Medieval de la UB ens cedí material de les excavacions de Sant Martí de les Tombetes

⁵⁷ Les petites restes de bacteris acaben sent zero un cop s'asseca la superfície completament.

[6] Imatge on s'aprecia el control d'aigua i la neteja bacteriana sobre una de les mostres de pintura mural. Departament de pintura mural de la UPV (Fotografia: Silvia Marín).

[7] Enretirat dels bacteris a les 2 h 15 min. Departament de pintura mural de la UPV (Fotografia: Pilar Bosch).

[8] Imatge comparativa un cop retirades les aplicacions que han actuat durant 2 h 15 min. Departament de pintura mural de la UPV (Fotografia: Silvia Marín).

humitat constant per mantenir vius els bacteris, però controlada quant a la penetració per capilaritat en el suport. A la vegada, efectuem controls comparatius d'aigua gelificada amb agar-agar, per tal d'establir un control de neteja sense bacteris. ⁶ Deixem actuar tant el control com la solució de bacteris durant dos períodes diferents de 2 h 15 min i 3 hores.

El primer esbandit es va fer amb esponja pràcticament seca per remoure el màxim de cola i bacteris. Posterior-

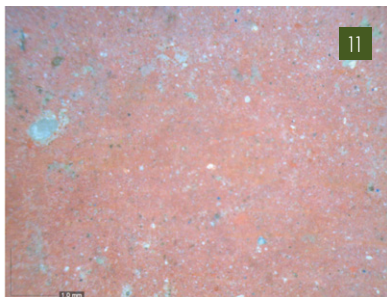
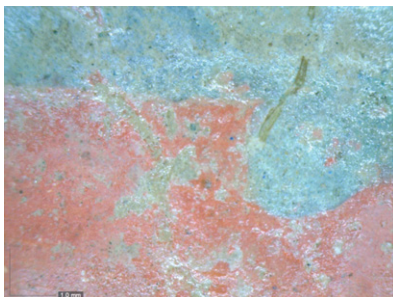
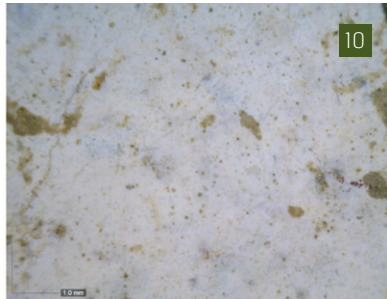
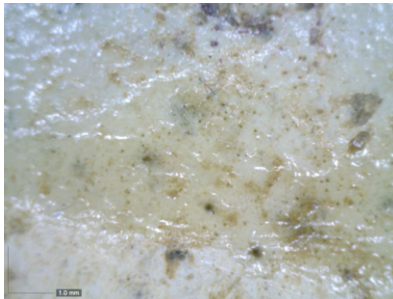


i Els Altimiris (ambdues al Pallars Jussà, Lleida). Es tracta d'un fragment d'os llarg de bòvid del segle VII, amb unes dimensions de 9,8 x 4,1 cm i d'un fragment d'àmfora⁵⁸ bètica Dressel 23 del segle V, amb unes dimensions d'11,8 x 9,1 cm. [12] i [13]

Comencem per fer el control previ de les peces abans d'afegir els nitrats. L'estudi previ és clau per saber si podem aplicar la neteja bacteriana sense ocasionar problemes als fragments. Com en el cas anterior, a partir de l'observació d'una microgota d'aigua aplicada sobre la superfície, podem constatar que ambdues superfícies són molt hidròfiles. Posteriorment, amb microscopi digital, observem que la superfície no s'ha alterat amb l'acció de l'aigua. Tot seguit fem unes proves de neteja aquosa en estat lliure i, en efectuar la fricció típica d'una neteja moderada amb hisop, s'aprecia un cert alliberament de partícules en el cas de la ceràmica. Així, doncs, després

⁵⁸ Àmfora bètica ALT'07 UE 400. Possiblement es tracta d'una àmfora bètica Dressel 23, que contenia oli per al seu transport i comercialització.

d'aquestes primeres proves, observem que les mostres suporten l'acció de l'aigua en quantitats moderades i creiem que la neteja podrà contenir un mitjà bacterià-aquós,



[9] Estat final d'una de les mostres. La meitat dreta, netejada amb bacteris, presenta una remoció pràcticament completa, mentre que la meitat esquerra, netejada només amb aigua, presenta encara moltes restes de cola. Departament de pintura mural de la UPV.

[10] Imatges de microscopi DinoLite (60x): comparativa entre zones netejades amb aigua (esquerra) que encara presenten restes de cola i zones netejades amb bacteris (dreta).

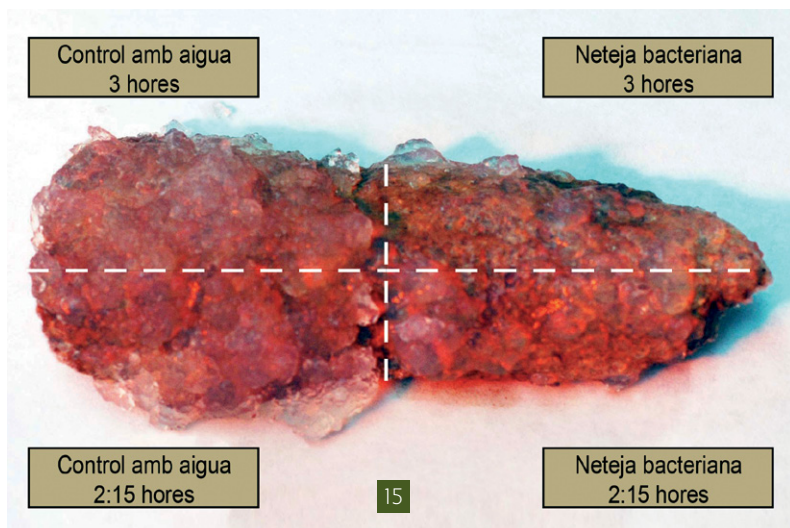
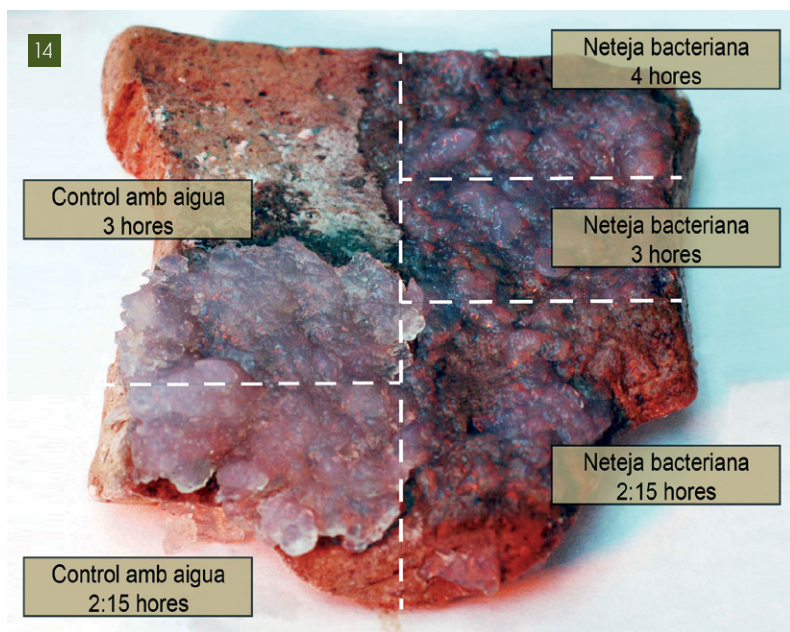
[11] Imatges de microscopi DinoLite (60x): comparativa entre zones netejades amb aigua (esquerra) que encara presenten restes de cola i zones netejades amb bacteris (dreta) (Fotografies: Silvia Marín).



[12] Mostra d'os abans de la intervenció.



[13] Mostra ceràmica abans de la intervenció (Fotografies: Silvia Marín).



[14] Controls i neteges bacterianes sobre la ceràmica. Departament de pintura mural de la UPV.

[15] Controls i neteges bacterianes sobre l'os. Departament de pintura mural de la UPV (Fotografies: Silvia Marín).

però gelificat, i que no necessiti passades o esbandides successives ni d'una acció mecànica destacable, sobretot en el cas de la ceràmica. El tema de l'eliminació de sals en materials porosos és un problema molt usual amb què el restaurador especialista ha d'enfrontar-se amb moltes dificultats. La migració i cristallització de les sals és un problema molt greu per al patrimoni, i sovint, en el desalut tradicional amb apòsits, s'arrossegueu les sals interiors cap a la superfície per solubilitzar-les i absorbir-les, generant sovint més danys en el sistema porós i afavorint l'aparició d'una major quantitat de sals en superfície. Contràriament, amb les neteges bacterianes gelificades, el flux d'aigua pot limitar-se molt més que amb els apòsits

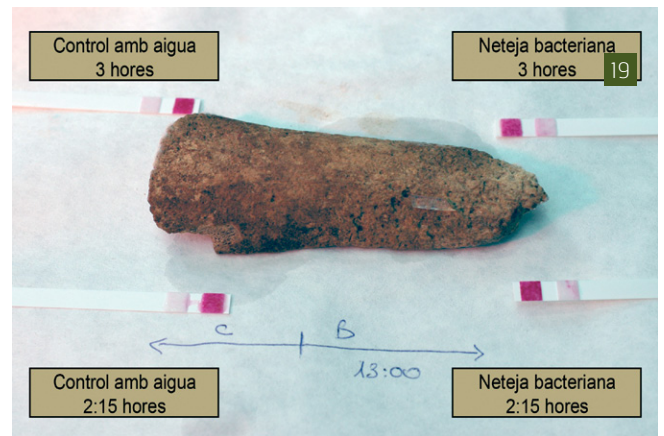
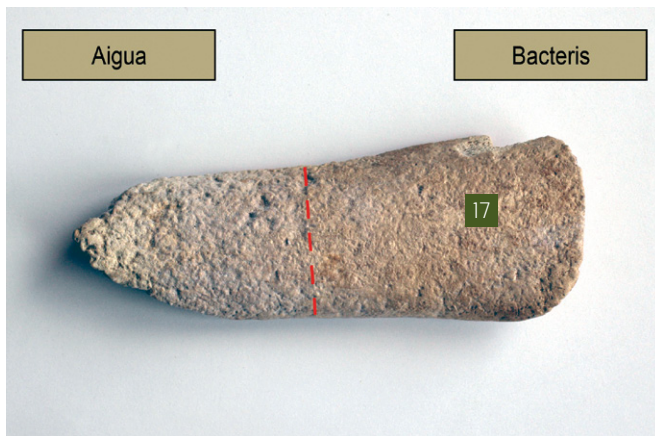
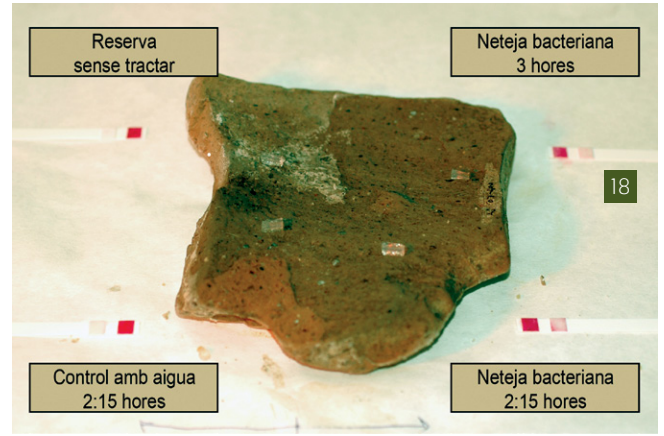
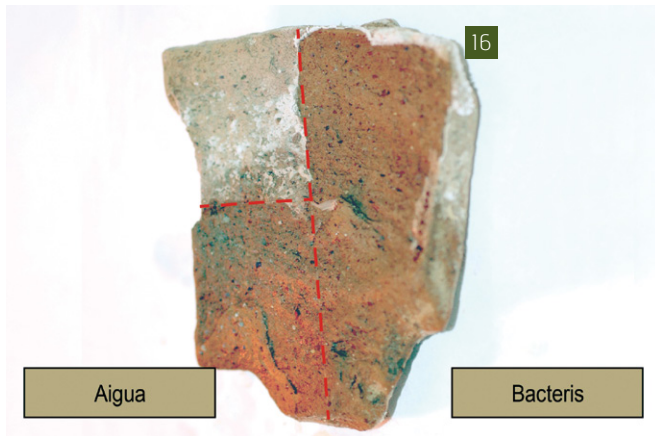
absorbents i, com no es tracta de solubilitzar les sals sinó de processar-les i transformar-les, l'eliminació de les sals pot ser més ràpida i eficaç, i menys contraproductiu, ja que no les fa migrar. De la mateixa manera, les bioneteges, en tenir un índex d'humiditat més controlat i poder-se aplicar superficialment, permeten dessalar peces que per la seva naturalesa no podrien tractar-se per immersió. Quan procedim a mesurar el pH, obtenim com a resultat un pH de 8 en l'os i un pH de 7 en l'àmfora.

Finalment, mesurem la conductivitat a partir de l'aplicació d'un gel rígid d'agar-agar sobre la superfície dels artefactes. Deixant-lo actuar durant 20 minuts, podem conèixer la conductivitat de les superfícies. Un cop passats els 20 minuts, ens dona un resultat final de 480 μS el fragment ceràmic, i 550 μS l'os. Amb l'observació a la làmpada UV no s'observa cap capa de protecció, només una petita franja de Paraloid® corresponent al siglat de la ceràmica.

Preparació de les provetes: en aquest cas, afegim nitrat potàssic a l'os i a la ceràmica per tal de simular una considerable capa de nitrats com la que podríem trobar a peces procedents d'un jaciment ric en nitrats. Preparam una solució saturada de nitrat potàssic en aigua desmineralitzada, fins a saturar la solució. Efectuem un bany per immersió total de les peces, durant dues hores, amb el seu posterior assecat en un armari estufa, a 50 °C. Un cop seques les peces, repetim l'operació fins a haver efectuat quatre banys i quatre assecatges. D'aquesta manera aconseguim una crosta de sals en la superfície d'ambdós artefactes.

S'inicia el cultiu dels bacteris una setmana abans, de la mateixa manera que en el cas anterior. El dia de la inoculació escalfem els bacteris i les superfícies a tractar entre 28 i 30 °C amb l'ajuda d'una làmpada d'infrarojos i d'un termòmetre de superfície. Mantindrem la temperatura estable durant les proves. Just abans d'aplicar els bacteris comprovem que aquests es troben vius i en concentració suficient. Amb l'ajuda del luminòmetre mesurador d'ATP obtenim una mesura de 7.517 URL en 10 μl de solució.

Apliquem els bacteris a pinzell i, a sobre, afegim el gel d'agar-agar per mantenir una humitat constant però controlada, ja que no volem generar migracions internes de sals. L'agar-agar és aplicat aquest cop en calent (just abans que solidifiqui, sobre els 40 °C) perquè, com que no es tracten, l'os i la ceràmica (de superfícies llises), les planxes d'agar-agar no farien bon contacte. A la vegada, fem la comparació amb una aplicació d'aigua gelificada amb agar-agar, per efectuar un control de neteja sense bacteris. Vam realitzar tres proves amb diferents temps d'aplicació: 2 h 15 min, 3 hores i 4 hores i els respectius controls amb aigua sense bacteris. [14](#) i [15](#)



[16] Estat final de la ceràmica. S'indiquen les zones netejades amb bacteris i les zones netejades amb aigua. La bioneteja ha eliminat amb més profunditat les sals. Departament de pintura mural de la UPV.

[17] Estat final de l'os. S'indiquen les zones netejades amb bacteris i les zones netejades amb aigua. La bioneteja ha eliminat amb més profunditat les sals. Departament de pintura mural de la UPV.

[18] Control de nitrats i nitrits a la ceràmica, després del tractament. Departament de pintura mural de la UPV.

[19] Control de nitrats i nitrits a l'os, després del tractament. Departament de pintura mural de la UPV (Fotografies: Silvia Marín).

El primer esbandit es fa amb esponja pràcticament seca per remoure el màxim de nitrats i bacteris. Posteriorment, s'esbandeix amb aigua desionitzada i esponja, limitant-ne la humitat. Només a simple vista ja s'observa que la part netejada amb bacteris ha remogut molt millor les sals que la part netejada amb control d'aigua. A les 2 h 15 mins'aprecia una bona remoció de les sals, però s'observen resultats més satisfactoris després de 3 i 4 hores d'aplicació. [16] i [17]

Finalment tornem a prendre les mesures inicials de conductivitat i pH, i fem una observació macroscòpica per valorar el nivell de neteja. Prenem la conductivitat a les 4 zones de les proves. Hem reservat una zona sense tractar i, la resta, han estat tractades amb control o bacteris, i amb diversos temps d'aplicació. A més a més, fem una mesura de nitrats i nitrits,⁵⁹ ja que els bacteris han eliminat nitrats però, en canvi, generen alguns nitrits. Com podem observar a les imatges [18] i [19], la zona de 2 h 15 min presenta més nitrats (quadrat rosa fosc), que la de 4 hores, però no més que les de control amb aigua i reser-

va sense netejar. A més a més, el bon efecte dels bacteris queda palès quan observem el segon quadrat de la tira indicadora: a les zones on s'han eliminat més nitrats també apareix una certa presència de nitrits.

En relació a la conductivitat, la zona de la ceràmica on hem aplicat els bacteris durant 2 h 15 min, té una conductivitat de 630 μS , quan la ceràmica en origen tenia 480 μS . Els bacteris han eliminat moltes sals, ja que la concentració d'ions en la zona sense tractar dóna error al conductímetre (supera els límits de lectura de l'aparell). En el control amb aigua de 2 h 15 min tenim una conductivitat menor, però les sals han migrat a la part posterior de la ceràmica, no essent aquest l'efecte desitjat per a cap restauració patrimonial. La conductivitat de la superfície en aquesta zona és de 450 μS . La zona tractada amb bacteris durant 4 hores dóna una conductivitat de 610 μS , així que podem pensar que els bacteris encara continuaven removent sals i que caldria més temps d'aplicació per a aquestes quantitats tan elevades de nitrats.

⁵⁹ Tires indicadores de presència de nitrats i nitrits Quantofix®.

En referència a l'os, el control de nitrats és similar al cas anterior: queden menys nitrats a les zones tractades amb bacteris i apareixen subtilment nitrats. Respecte a la conductivitat de les quatre zones de l'os, és de 3230 μS a la zona tractada durant 2 h 15 min, de 2830 μS al control d'aigua de 2 h 15 min, de 2730 μS a la zona tractada durant 3 hores, i de 2530 μS al control d'aigua de 3 hores. Com en el cas anterior, l'aigua sola ha fet migrar més sals cap a la part posterior de l'os, i encara queda molta concentració iònica, en general, sobre la superfície de l'os. El pH tant de l'os com de la ceràmica es manté idèntic a l'inicial: ceràmica pH 7 i os pH 8.

Finalment, i per tal de comprovar que hem esbandit suficientment els bacteris de la superfície dels artefactes, mesurem l'ATP tant de l'os com de la ceràmica. De 7.517 URL inicials en 10 μl de solució bacteriana, un cop acabat el tractament, la ceràmica queda totalment lliure de bacteris: 0 URL, i l'os presenta una petita quantitat no apreciable: 184 URL. Podem tornar a esbandir l'os si ho creiem necessari tot i que, un cop s'asseca completament, no hauria de restar cap *Pseudomonas stutzeri* viu.

Amb microscopi digital comprovem com a les zones on s'ha aplicat la neteja bacteriana, s'ha aconseguit una neteja molt més profunda que a la zona on hem fet una neteja tradicional de control amb aigua, i que no s'aprecien residus de gel. ²⁰ i ²¹

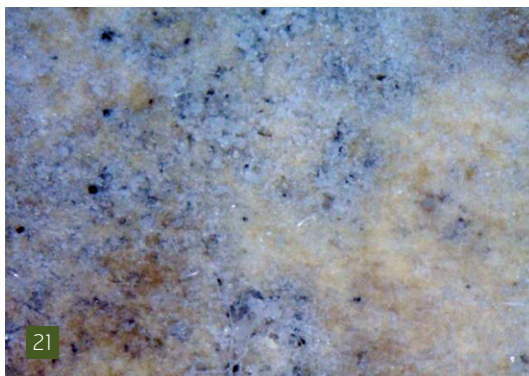
CONCLUSIONS

Durant les proves en els fragments de pintura mural, hem observat clarament que la neteja bacteriana ha aconseguit un nivell de remoció de la cola molt profunda, en contraposició a l'assaig de neteja tradicional amb aigua sola, que ha mostrat molta dificultat en eliminar una capa tan gruixuda de cola. Cal afegir que les mostres aguantaven l'acció de l'aigua, si no es tractava d'una humectació massiva ni insistent, però en cap cas suportaven l'acció mecànica ni l'aigua calenta, que és com es faria una neteja tradicional de cola sobre un antic traspàs mural. A més a més, els bacteris actuen més ràpidament que els apòsits d'aigua, i no necessiten passades successives, com acostuma a passar en el tractament tradicional.

A causa que els fragments suportaven l'acció de l'aigua necessària per a la neteja bacteriana, l'única preocupació que teníem era si els bacteris respectarien l'aglutinant que compon el tremp dels detalls al sec. Durant les proves, el tremp no ha patit cap dany i la neteja ha estat molt correcta, fet que ens fa pensar que es pot tractar d'un tremp d'ou.

En relació a l'aportació de residus, el gel d'agar-agar no deixa residus detectables, ni tan sols per cromatografia de gasos, a causa de la seva baixíssima adhesivitat, així que no cal preocupar-se per ells. D'altra banda, els residus bacterians podrien ser un problema si quedessin en superfície i proliferessin generant un atac biològic sever, però això no pot passar per-

què hem realitzat un correcte esbandit, els bacteris emprats no són esporulants i, a més a més, hem dut a terme un control final de cèl·lules ATP que ha confirmat que no quedaven pràcticament bacteris vius a les superfícies tractades.



[20] Imatges de microscopi DinoLite (60x). Ceràmica: zona tractada amb aigua (esquerra) en contraposició a la zona tractada amb bacteris (dreta). La zona tractada amb bacteris no té sals visibles a microscopi.

[21] Imatges de microscopi DinoLite (60x). Os: zona tractada amb aigua (esquerra) en contraposició a la zona tractada amb bacteris (dreta). La zona tractada amb bacteris presenta menys quantitat de sals visibles a microscopi (Fotografies: Silvia Marín).

Un altre sistema que es podia haver fet servir per eliminar la cola, si no haguéssim decidit emprar bacteris, podria haver estat un *buffer* de pH 9-9,5, que no atacaria el substrat calcari ni els pigments i, en canvi solubilitzaria la cola proteica per trobar-se fora del seu rang de seguretat. No obstant això, vam decidir-nos pels bacteris perquè un pH tan alcalí hauria atacat els detalls al sec d'aquest mural d'Empúries. Tampoc seria recomanable l'addició de quelants al *buffer*, ja que atacarien la tècnica seca ionitzant l'aglutinant.⁶⁰

Durant les proves en els fragments d'os i ceràmica hem observat clarament com la neteja bacteriana ha aconseguit un nivell de remoció de nitrats bastant acceptable, en contraposició a l'assaig de neteja tradicional amb aigua sola, que ha mostrat una major dificultat en eliminar una crosta tan gruixuda de nitrats i, a més a més, ha generat una migració greu de sals cap a altres zones de les mostres. Com que els fragments aguantaven l'acció de l'aigua, hem pogut fer aquesta prova amb neteges bacterianes, però hem advertit que caldria fer diverses aplicacions, ja que amb una sola aplicació no ha estat suficient.⁶¹ Després de la intervenció, el pH dels fragments ha quedat intacte, però la conductivitat era encara molt elevada. Les peces presentaven sals internes que caldria eliminar amb noves aplicacions bacterianes, fins i tot per mitjà d'una bioneteja per immersió.

A tall de conclusió final, cal dir que abans de plantejar-nos una neteja bacteriana, cal tenir en compte:

- quin material conforma la peça a tractar i quin material aliè volem eliminar
- la selecció del bacteri a aplicar
- la selecció del mode d'aplicació: sustentants, pH i conductivitat de la solució bacteriana, etc.
- rangs de seguretat per a l'obra i per al restaurador
- el control de l'aplicació i de les condicions ambientals
- la correcta eliminació dels bacteris en finalitzar el tractament
- el control de la correcta eliminació dels bacteris amb el pas del temps
- els bacteris necessiten un medi humit per desenvolupar els seus processos metabòlics, així que les obres que tractem amb bacteris han de poder suportar un tractament aquós, almenys puntual i, per apòsit o gels, durant unes hores.

Com a inconvenients n'hem trobat pocs. En el cas de la ceràmica, l'aplicació de l'agar-agar va generar una lleu agressió superficial sobre la ceràmica. Cal dir que la peça presentava certa descohesió en el seu estat inicial i que, llavors, la lleugera adhesivitat del gel va generar una petita remoció de partícules superficials. Aquest inconvenient, no obstant això, no és greu, ja que s'hauria evitat fàcilment emprant un paper japonès com a barrera. Un altre inconvenient és que les superfícies tractades han de poder suportar l'aplicació d'aigua, per tant, existiran materials que no podran netejar-se amb aquest mitjà. Una possible solució seria comprovar si una aplicació molt controlada de l'aigua a través de gels permetria finalment la seva aplicació, no obstant això, caldria fer proves. El darrer inconvenient és que, per poder realitzar les bioneteges, es requereix un laboratori de microbiologia i un microbiòleg en l'equip. Potser algun dia es comercialitzen kits de creixement bacterià fàcils d'emprar per al restaurador, però encara no és el cas.

Pel que fa a la resta, tot ens semblen avantatges: compatibilitat material, coherència, efectivitat, selectivitat, baixa toxicitat, innocuïtat, no aportació de residus, rapidesa d'acció, valoració econòmica no gaire més elevada que les neteges tradicionals⁶² i uns boníssims resultats en les proves aquí presentades.

Com a millores a treballar en el futur, cal dir que aquest estudi és només una primera aproximació experimental sobre alguns materials arqueològics però, evidentment, no tots i no suficientment representatius. Esperem, pròximament, poder fer proves sobre nous suports, amb diversos temps d'aplicació dels bacteris, amb l'aplicació de nous gels encara molt desconeguts al nostre país, amb l'aplicació de barreres, etc., tot efectuant proves sistemàtiques i múltiples sobre aquests i altres materials arqueològics per poder establir estadístiques i resultats més concloents.

AGRAÏMENTS

Agraeixo a la investigadora i doctora Pilar Bosch, al doctor i professor José Luis Regidor i a la Universitat Politècnica de València la seva ajuda amb les proves de bioneteja bacteriana. Sense ells aquest treball no hauria estat possible. També agraeixo al MAC Empúries, a l'ESCRBCC i a la UB la seva ajuda, havent cedit les peces emprades en les proves.

⁶⁰ Vegeu CREMONESI, P. "Rigid gels and Enzym cleaning". *Cleaning 2010. New insights in the cleaning of paintings*. València: Universidad Politècnica de Valencia, Smithsonian Museum Conservation Institute, 2010 (b), p. 16.

⁶¹ Cal dir que, per fer els assaigs, la concentració de nitrats induïda era massiva.

⁶² Evidentment, incloure gelífics i bacteris al nostre laboratori és més car que treballar només amb dissolvents, però no és tanta la diferència real si tenim en compte que són productes que es fan servir en ínfimes quantitats.

BIBLIOGRAFIA

CREMONESI, P.; SIGNORINI, E.: *Materiales y métodos para la limpieza de pinturas nivel avanzado*. Apunts del curs del 23 y 24 de marzo de 2010. Osca: Escuela Superior de Conservación y Restauración de Bienes Culturales de Aragón, 2010.

CREMONESI, P.; SIGNORINI, E. *Sistemes de neteja aplicats a la Conservació Restauració. Recull del curs impartit per Paolo Cremonesi i Erminio Signorini*. Pautes per seguir el protocol de neteges adoptat al CRBMC seguint el sistema de Paolo Cremonesi. Valldoreix: Document Intern del CRBMC, 2010.

CREMONESI, P. *Introducció dels Enzims en el Protocol de Neteges*. Pautes per seguir el protocol de neteges amb Enzims adoptat al CRBMC seguint el sistema de Paolo Cremonesi. Valldoreix: Document intern del CRBMC, 2012.

CREMONESI, P.; WOLBERS, R. C. *Diálogo 4- Métodos acuosos: pros y contras. Posibilidades y límites de la limpieza superficial*. Apunts del curs del 30 de juny de 2014. València: Universidad Politécnica de Valencia, 2014.

CREMONESI, P. *Actualització de materials i mètodes per a la neteja de superfícies policromades*. Apunts del curs del 26-28 de gener de 2015. Barcelona: ESCRBC, 2015.

LUSTRATO, G.; ALFANO, G.; ANDREOTTI, A.; COLOMBINI, M.P.; RANALLI, G. "Fast biocleaning of medieval frescoes using viable bacterial cells". *International Biodeterioration & Biodegradation*. Volum 69, abril de 2012, p. 51-61.

MOREIRA, A. T. "A problemática dos resíduos em sistemas gelificados para a limpeza de pinturas". *Ge-Conservação*, núm. 3 (2012), p. 44-52. ISSN 1989-8568.

RANALLI, G.; ALFANO, G.; BELLI, C.; LUSTRATO, G.; COLOMBINI, M. P.; BONADUCE, I.; ZANARDINI, E.; ABBRUSCATO, P.; CAPPITELLI, F.; SORLINI, C. "Biotechnology applied to cultural heritage: biorestitution of frescoes using viable bacterial cells and enzymes". *Applied and environmental microbiology*. Vol. 96 (2005), p. 73-83.

REGIDOR, J. L. *Limpieza con bacterias. Un sistema acuoso: metodologías de aplicación. II Seminario Formativo: Bio-limpieza de Obras de Arte*. Apunts del curs del 31 de maig a l'1 de juny de 2013. Jaca: Museo Diocesano de Jaca, 2013.