

Arqueología //**Ensayo de biolimpiezas bacterianas sobre material arqueológico diverso: cerámica, hueso y pintura mural**

El presente artículo es una selección parcial del trabajo final efectuado durante el curso de adaptación a la nueva titulación de conservador-restaurador en la especialidad de Conservación y Restauración de Bienes Arqueológicos de la ESCRBC. El trabajo, titulado *Neteges raonades: experimentació amb nous tractaments de neteja aplicats sobre 6 peces de material arqueològic divers*, tenía como objetivo establecer una metodología de limpiezas enfocada a material arqueológico, efectuando un examen profundo de las piezas que nos permitiera establecer un protocolo razonado, lo más científico posible, en el que la propuesta de limpieza surgiera de los resultados del examen analítico. Además, este protocolo pretendía escoger siempre, de entre los sistemas de limpieza posibles, el más adecuado, eficaz e inocuo, tanto para la pieza como para el restaurador, de modo que los sistemas acuosos tamponados, gelificados y bacterianos fueron algunos de los métodos sugeridos. Este artículo se centrará únicamente en la parte experimental de las biolimpiezas bacterianas porque, de entre los temas estudiados en el trabajo final, es uno de los más innovadores y presenta un campo de estudio amplio todavía por explorar.

Silvia Marín Ortega. Profesora de Conservación y Restauración de Bienes Arqueológicos de la ESCRBC. Licenciada en Historia por la Universidad de Barcelona. Titulada Superior en Conservación y Restauración de Bienes Culturales en la especialidad de Arqueología por la ESCRBC. Postgraduada en Restauración Arquitectónica por la UPC y en Conservación Preventiva por la Universidad de Alcalá de Henares.

silviamarinortega@yahoo.es

Palabras Clave: biolimpieza, bacterias, *Pseudomonas stutzeri*, nitratos, colas orgánicas, material arqueológico.

Fecha de recepción: 11-12-15 > **Fecha de aceptación:** 19-12-15

INTRODUCCIÓN Y METODOLOGÍA

A menudo, los restauradores de materiales arqueológicos nos encontramos ante objetos absolutamente destruidos, susceptibles a cualquier intervención y muy sensibles incluso a la acción del agua, por el hecho de que el medio soterrado en el que han permanecido durante siglos, ha activado algunas reacciones químicas como la hidrólisis y la solubilidad de muchos de sus componentes. Así pues, nos encontramos con materiales que a menudo necesitarían un tratamiento acuoso para eliminar residuos fangosos, terrosos o salinos, pero que no se pueden mojar porque se ablandan, se descomponen o incluso se pueden activar diversas reacciones químicas nocivas para las piezas, con facilidad. Ejemplo de esto es el material óseo, el material fósil paleontológico, el marfil, el cuero y los metales, entre otros. De esta manera, nos planteamos examinar previamente y a conciencia las piezas, para establecer un protocolo razonado en el que la propuesta de limpieza surja de los resultados de un examen lo más científico posible, a partir de los medios con los que puede contar cualquier restaurador. De entre los sistemas de limpieza posibles, siempre intentaremos utilizar el más adecuado, el más eficaz y el más inocuo tanto para la pieza como para el restaurador. Concretamente, en los casos que presentamos en este artículo, los métodos escogidos fueron los biológicos (limpieza con bacterias), por su eficacia de remoción, selectividad, respeto al soporte y nula toxicidad.

La metodología empleada en esta investigación comenzó con una fase de estudio tanto de los materiales constitutivos de cada pieza, como de las capas de superficie susceptibles de eliminar durante la limpieza. Este primer estudio abarcaba la investigación histórica, la revisión de referencias bibliográficas y fichas de restauración, la observación macroscópica de las superficies con microscopio digital de mano (50-200x), la herramienta informática de gran detalle fotogramétrico 3D RTI¹ y la observación de las superficies con lámpara de Wood, para descartar, detectar o incluso reconocer materiales filmógenos en superficie a partir de su reflexión característica.



ángulo resultante entre la luz y el objeto en una serie de fotografías. Cabe destacar, que los cálculos del RTI aportan nueva información de gran detalle imposible de revelar a partir de un examen visual físico directo. A diferencia de una fotografía típica, la información de reflectancia deriva de la forma tridimensional del objeto, dando como resultado final un juego de luces y sombras que revela los relieves e irregularidades de la superficie, generando una imagen 3D de gran detalle de la superficie en cuestión.

¹ Reflectance Transformation Imaging (RTI): método fotográfico digital computacional creado para capturar la superficie de los objetos facilitando, a través de un software, una re-iluminación interactiva de las superficies desde cualquier dirección. La información de las imágenes respecto a su iluminación se sintetiza matemáticamente para generar un modelo numérico de la superficie, lo que permite examinar la imagen generada en profundidad. El RTI mejora, a partir de los cálculos matemáticos, la visualización de la superficie fotografiada, enfatizando el color y el relieve de forma evidente. El RTI no sólo registra datos sobre el color de la superficie en cada píxel sino que también almacena información sobre la tridimensionalidad de la superficie al tomar un valor para la Normal en cada píxel. De esta manera, el software calcula unos valores teniendo en cuenta el

² Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier.

³ A partir del triángulo de TEAS y el test de disolventes Wolbers-Cremonesi podemos conocer de manera aproximada qué material filmógeno de superficie tenemos sobre la superficie original.

⁴ A partir de un análisis a la gota, calculamos el ángulo de contacto entre la gota de agua y la superficie. El resultado será más o menos hidrófilo y nos puede dar pistas en cuanto a la constitución del material, si se trata o no de un material filmógeno, etc. Posteriormente observamos con microscopio digital si la zona de la gota se ha inflado o alterado para estipular si la superficie es más o menos sensible al agua.

⁵ Con tiras indicadoras de pH. El sistema de limpieza utilizado deberá tener un pH que esté en el rango de seguridad de la pieza (cada material tiene un rango de pH de seguridad característico).

⁶ Se mide la conductividad de la superficie del objeto con una pequeña plancha de agar-agar que posteriormente se introduce en un conductímetro de sólidos. De esta manera no es necesario sumergir la pieza para poder medir su conductividad. El sistema de limpieza utilizado deberá tener una conductividad similar a la de la superficie a tratar (solución isotónica) para poder actuar eficazmente y sin perjudicar el sustrato.

⁷ Las células vivas necesitan energía para sobrevivir, y ésta es almacenada por las bacterias en un elemento llamado ATP (adenosín trifosfato: una molécula energética presente en todos los organismos vivos) que, gracias a la bioluminiscencia, nos sirve de indicador de la presencia de bacterias vivas sobre las superficies patrimoniales. La bioluminiscencia es una tecnología basada en la detección del ATP a través de la enzima presente en las luciérnagas (luciferasa) que, al combinarse con el ATP de las bacterias, produce luz.

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

⁹ Ver BOSCH, M.P.; REGIDOR, J.L.; SORIANO, P.; DOMÈNECH, M.T.; MONTES, R. "Ensayos de Biolimpieza con bacterias en pinturas murales". *Arché*, (2010), nº 4 y 5, p. 117. Bacterias que no implican ningún riesgo ni para el restaurador ni para la obra, ya que al secarse mueren al no ser capaces de producir formas de resistencia (esporas).

¹⁰ Ver MONTES, R. M. *La Biología y la Restauración. 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. 23 y 33.

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

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

¹³ Ver GAURI, L. K.; PARKS, L.; JAYNES, J.; ATLAS, R. "Removal of sulphated-crust from marble using sulphate-reducing bacteria", en: 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*. Edimburgo: Donhead Publishing Ltd., 1992, p. 160-165.

Después de la primera fase de estudio, procedimos a una fase analítica, efectuando desde sencillos test hasta técnicas analíticas instrumentales, según la necesidad. En algunos casos se utilizó la técnica instrumental FT-IR,² realizada en los Centros Científicos y Tecnológicos de la UB, para identificar materiales constitutivos y de superficie y, en otros casos, sencillos test como el de polaridad y solubilidad³ para obtener un valor *Fd* concreto de las capas de superficie. En todos los casos, además, se efectuaron los test de hidrofili-dad-hidrofobicidad,⁴ de pH⁵ y de conductividad.⁶ En conclusión, todas estas pruebas debían servir para conocer mejor qué teníamos y qué queríamos eliminar de manera selectiva (sin afectar al soporte original), los rangos de pH seguros para las preparaciones acuosas tamponadas, la influencia del pH sobre la acción de los quelantes en las preparaciones, qué quelantes serían los más apropiados, qué conductividad sería necesaria para cada limpieza, y cómo utilizaríamos limpiezas de base acuosa haciendo las preparaciones suficientemente seguras para limpiar superficies especialmente sensibles a este medio.

Al finalizar todas las pruebas de las fases 1 y 2, establecimos unas conclusiones que nos permitieron escoger un sistema de limpieza coherente con los resultados y que podía eliminar el material ajeno respetando el material constitutivo de cada pieza. Seguidamente, durante la fase experimental, hicimos varias pruebas de limpieza con los sistemas escogidos y con diversos modos de aplicación para, finalmente, valorar la efectividad de las limpiezas y las ventajas e inconvenientes respecto a los sistemas de limpieza tradicionales: compatibilidad material, coherencia, efectividad, selectividad, aportación de residuos bacterianos y de los geles de aplicación, toxicidad, inocuidad, valoración económica, rapidez de acción, etc. La valoración final se hizo gracias a una segunda fase analítica de comprobación, en la que observamos el sistema poroso y superficial de las piezas con microscopio digital y lámpara de Wood para comprobar tanto la incidencia de los residuos aportados por los sistemas gelificados como el nivel de limpieza conseguido. Por otro lado, se constató con un luminómetro medidor de ATP,⁷ que no quedaban bacterias vivas en las superficies limpiadas biológicamente, y se volvió a medir el pH, la conductividad y la hidrofili-dad para valorar los cambios sufridos después de las limpiezas.

El instrumental utilizado para el estudio de este artículo es el siguiente: conductímetro de sólidos Horiba CE B-711®, pH-metro EcoTestr pH2®, tiras indicadoras de pH, luminómetro medidor de ATP Hygiene System Sure Plus® con hisopos Ultra Snap®, balanza de precisión, termómetro de superficies Testo®, tiras indicadoras de presencia de nitratos y nitritos Quantofix®, lámpara de Wood, lámpara de infrarrojos, cámara fotográfica Nikon D-70® con objetivo macro, software RTI Builder y microscopio Digital DinoLite Pro®.

BIOIMPIEZAS BACTERIANAS: ESTADO DE LA CUESTIÓN

Las bacterias son seres vivos sencillos, microorganismos de 0,5-5,5 µm. de tamaño,

formados normalmente por una sola célula procariota, que sólo es visible al microscopio. Las bacterias no disponen de un núcleo celular diferenciado, sino que su ADN está en el mismo citoplasma y no en el interior de una membrana. Pueden ser autótrofas (se nutren de materia inorgánica) o heterótrofas (se nutren de materia orgánica).⁸

En relación con el patrimonio, las bacterias pueden ser responsables de alteraciones indeseables por biodeterioro cuando actúan de forma libre o, al contrario, pueden ser de gran ayuda en actuaciones de conservación-restauración, si las usamos de forma dirigida. Cuando utilizamos las bacterias de manera controlada y, con los medios necesarios, el poder de desagregación que tienen, por nutrición y asimilación durante sus procesos metabólicos, pueden ser muy útiles para remover productos superficiales ajenos en una pieza patrimonial, y por lo tanto, podemos utilizarlas para limpiezas selectivas y complejas. Siempre se trata de microorganismos no patógenos y no esporulantes⁹ que no tienen ningún riesgo para el ser humano ni tampoco pueden propagarse en la obra.

Las bacterias necesitan energía para sobrevivir, y pueden conseguirla por medio de la luz (fototrofia) o por la oxidación de diversos compuestos (quimiotrofia) tanto orgánicos (glucosas, acetatos, etc.) como inorgánicos (H₂, H₂S, Fe²⁺, NH₄⁺, etc.) que, combinados con el O₂ ambiental, se oxidan y se transforman en agua y nutrientes (fuentes de carbono y electrones) que les dan energía.¹⁰ Como la composición química de cada bacteria indica cuáles son los nutrientes requeridos para su supervivencia, podemos escoger un tipo de bacteria u otra, selectivamente, según el material que deseemos eliminar. Las bacterias adecuadas podrán procesar, asimilar o descomponer una sustancia concreta y, así, ayudarnos en su remoción, que puede ser completada con acción mecánica y un posterior lavado tras la actividad biótica.

Las biolimpiezas bacterianas, herederas de las limpiezas enzimáticas, surgen en los años 80, cuando aparecen los primeros estudios sobre la capacidad de las bacterias para reducir sulfatos sobre obras patrimoniales. Los primeros estudios son de Gauri y Gwinn,¹¹ de 1983 y 1989,¹² en los que hicieron pruebas de laboratorio con probetas de mármol expuestas a 10 ppm de SO₂ al 100% de humedad y a 20 °C de temperatura, para después intentar eliminar las costras negras con bacterias *Desulfovibrio desulfuricans*. En efecto, consiguieron reducir las costras negras (el sulfato de calcio dihidratado: yeso) en un 80% después de una inmersión de 60 horas. Posteriormente, Gauri trasladaría las pruebas a una escultura real con costra negra, en 1992.¹³ Sumergió la pieza en un medio de cultivo con las bacterias, durante 84 horas, obteniendo unos resultados sólo analizados visualmente, sin poder estimar un porcentaje aproximado. En 1996, Ranalli y Cappitelli tomarían el relevo de Gauri, también tratando esculturas de mármol e incluso

la fachada de la catedral de Milán, con *Desulfovibrio desulfuricans* y *Desulfovibrio vulgaris*, mediante aplicaciones que iban de 30 a 45 horas.¹⁴ Como novedades, estos autores substituyeron la inmersión como medio de aplicación, por los apósitos de algodón y sepiolita,¹⁵ y, ya en 2006, de Carbogel®.¹⁶ Con aplicaciones más puntuales y concentradas, los tiempos de actuación podían reducirse favorablemente y, además, se evitaban los inconvenientes de la inmersión¹⁷ que, por un lado, puede disolver muchos componentes de las piezas que no querríamos disolver y, por otro, no todos los objetos pueden sumergirse debido a su tamaño. Así pues, Ranalli, en 1997¹⁸ desarrolló la eliminación de los sulfatos presentes en una columna y en una escultura con bacterias sulfato-reductoras, pero mezclando las cepas *Desulfovibrio desulfuricans* y *vulgaris* y en cultivo puro y mixto para mejorar el potencial sulfato-reductor. También lo aplicó en condiciones anaeróbicas, y con sepiolita como soporte. Los resultados, a partir de la cromatografía de intercambio iónico, fueron de 81% de remoción después de 36 horas de aplicación. Como inconvenientes, el sulfuro de hidrógeno reaccionó con el hierro presente en el sustrato de las piezas y formó precipitados de sulfuro de hierro (manchas oscuras sobre la piedra). Posteriormente, en 2006 llegarían nuevas aportaciones y mejoras de la mano de Cappitelli.¹⁹ El método se basó en el uso de bacterias igualmente sulfato-reductoras, pero esta vez aplicadas a partir de Carbogel® y con un sistema que evitara la formación de sulfuros de hierro. Se trataba pues, de una metodología mejorada para eliminar costras negras utilizando *Desulfovibrio vulgaris* ATCC 29579, que elimina el yeso de nueva formación (disocia el sulfato cálcico en iones calcio y sulfatos) en el que se había transformado el carbonato cálcico en presencia de SO₂ (ácido sulfúrico procedente de la contaminación ambiental) y, por otro lado, los iones calcio reaccionan con el CO₂ ambiental generando nueva calcita. De esta manera, las bacterias utilizadas eliminan el yeso de las costras y, a la vez, consolidan parcialmente el material. Estas pruebas consiguieron eliminar el 98% de los sulfatos en 45 horas de tratamiento y el uso del Carbogel® demostró ser superior tanto a la sepiolita como al Hydrobiogel-97® y el algodón, ya que permitió que las bacterias estuvieran en un medio siempre húmedo, manteniendo correctamente su actividad hasta el final del tratamiento.

Después de esta primera experiencia, Cappitelli quiso profundizar de una manera más comparativa y en 2007 efectuó, sobre el mismo soporte, un estudio que comparaba la biolimpieza de un fragmento de mármol de la catedral de Milán con una limpieza tradicional química de las costras negras.²⁰ La limpieza química se hizo mediante apósitos de carbonato de amonio y EDTA, y la biológica, del mismo modo que en los estudios de 2006. En contraste con el método de limpieza química,

el procedimiento biológico dio un resultado de eliminación más homogénea y no perjudicaba el sustrato bajo la costra. Además, el tratamiento químico formó sulfatos de sodio como residuos indeseables.

Los últimos avances en la materia de la biolimpieza de costras negras han sido publicados en 2013, de la mano de Federica Troiano.²¹ En este estudio, aunque se destaca la eficacia de las biolimpiezas con bacterias reductoras de sulfatos, se habla de los inconvenientes, como la larga duración de los tratamientos cuando las costras son gruesas, o la dificultad de utilizar esta técnica en la realidad de una restauración compleja y de grandes dimensiones (en la que no se pueda trabajar en un laboratorio de microbiología donde las condiciones son ideales, donde el material se puede esterilizar, los tratamientos pueden mantenerse a temperaturas estables durante muchas horas y las tareas se pueden desarrollar en ambientes anaeróbicos). Para hacer frente a estas dificultades, experimentaron efectuando un pre-tratamiento con tensioactivo no iónico y después aplicaron las bacterias *Desulfovibrio vulgaris subsp. vulgaris* ATCC 29579. La combinación de ambos tratamientos eliminó la costra sin afectar al mármol original, reduciendo un 70% el tiempo de limpieza. El detergente sólo elimina algunas capas superficiales, adheridas sobre la costra negra, y permite después que las bacterias actúen mejor y más rápido sobre las costras. También se ahorró en aplicaciones biológicas, ya que se suelen cambiar las bacterias cada 15 horas.²²

No es hasta 1996, con Ranalli, cuando se empieza a explorar la eliminación de nitratos y colas orgánicas con biolimpiezas bacterianas. En el año 2000 publicó un artículo en el que las inoculaciones se hicieron con apósitos de sepiolita. Para la remoción de nitratos, utilizaron *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas aeruginosa*. Después de 30 horas de actuación, el 90% de los nitratos había desaparecido.²³ Para la materia orgánica (restos de cola animal de una antigua restauración sobre una pintura mural), usaron *Pseudomonas stutzeri*, durante 8 horas, consiguiendo eliminar el 100% de los restos de colágeno.²⁴ En 2005, Cappitelli aplicó estas técnicas que hasta ahora no habían salido del laboratorio, sobre una gran superficie como los muros de la catedral de Matera (Italia), donde se eliminó el 90% de los nitratos mediante la aplicación de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 y *Desulfovibrio vulgaris* ATCC 29579. Se aplicó la solución bacteriana gelificada con Carbogel®. Se emplearon las bacterias tanto individualmente, como combinadas. En 24 horas, se habían eliminado ya el 55% de los nitratos y el 85% de los sulfatos de los muros.²⁵ Seis años después, en 2011 se hizo un estudio de control de los efectos de la limpieza de los muros de Matera, y las conclusiones fueron que no había habido variaciones de color apreciables, y que los efectos eran todavía satisfactorios.²⁶

¹⁴ Ver MONTES, R. M. *Primeras experiencias de Biolimpieza y Bioconsolidación de Bienes Culturales. 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. 21.

¹⁵ Ver 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*. Volumen 40, 1997, p. 255.

¹⁶ Ver CAPPITELLI, F.; ZANARDINI, E.; RANALLI, G.; MELLO, E.; DAF-FONCHIO, 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 (mayo de 2006), nº 5, p. 3.733.

¹⁷ Ver CAPPITELLI, F.; ZANARDINI, E.; RANALLI, G.; MELLO, E.; DAF-FONCHIO, D.; SORLINI, C. "Improved Methodology for Bioremoval of Black Crusts..." p. 3.733.

¹⁸ Ver 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 Ver CAPPITELLI, F.; ZANARDINI, E.; RANALLI, G.; MELLO, E.; DAF-FONCHIO, D.; SORLINI, C. "Improved Methodology for Bioremoval of Black Crusts..." p. 3.733.

²⁰ Ver 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 (septiembre de 2007), nº 17, p. 5.671-5.675.

²¹ Ver 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, (noviembre de 2013), p. 294-304.

²² Ver 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 Ver RANALLI, G.; MATTEINI, M.; TOSINI, I.; ZANARDINI, E.; SORLINI, C. "Bioremediation of Cultural Heritage: Removal of Sulphates, Nitrates and Organic Substances". En: CIFERRI, O.; TIANO, P.; MASTROMEI, G. *Of Microbes and Art: The role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage*. Nueva York: Kluwer Academic, Plenum Publishers, 2000. ISBN: 0306463776, p. 231.

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

²⁵ Ver 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), nº 7, p. 1.004-1.011.

²⁶ Ver 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.

Antonioli²⁷, en 2005, eliminó con éxito restos de cola animal procedentes del arranque de unas pinturas murales de Spinello Aretino en Pisa, mediante *Pseudomonas stutzeri* y enzimas en aplicaciones de 2 a 17 horas. La principal dificultad de este caso fue que la cola animal con la que se había hecho el *strappo*, se había mezclado con formaldehído como antimicrobiano²⁸ y, por lo tanto, las enzimas aplicadas para

eliminar la cola no eran capaces de actuar, pero lo hicieron las bacterias. Las aplicaron con algodón como sustentante, eliminando el 100% de los restos de cola.²⁹

En 2008, Sorlini y Cappitelli³⁰ realizaron un estudio comparativo entre limpiezas biológicas y químicas, llegando a la conclusión de que la limpieza química no es homogénea, ataca la superficie original de la piedra y forma cristales de sulfato de sodio indeseables. Al contrario, la limpieza biológica es muy homogénea, no ataca la pátina original y no genera subproductos ajenos, tan sólo la calcita en algunos casos que, además, sirve de consolidante natural.

Cabe destacar que la Universidad Politécnica de Valencia publicó en 2010 unos estudios³¹ que se llevaron a término en el Instituto Universitario de Restauración del Patrimonio de la Universidad Politécnica de Valencia, para la tesis doctoral de María del Pilar Bosch, que se publicó posteriormente, en 2012.³² Tanto en la tesis como en los artículos, el equipo valenciano desarrolló el uso de las bacterias *Pseudomonas stutzeri* DSMZ 5190 para la biolimpieza de pinturas murales con restos de materia orgánica de arranque y traspaso, así como de eflorescencias salinas de nitratos, que ya habían intentado eliminar mediante técnicas fisicoquímicas sin obtener buenos resultados, como las resinas de intercambio iónico, por ejemplo.³³ Como novedad, adoptaron los geles rígidos de agar-agar como modo de aplicación de las bacterias, pero sólo como soporte humectante de las mismas. Las conclusiones de los estudios son que las bacterias DSMZ 5190 eliminan muy eficientemente cola orgánica y eflorescencias de nitratos y sulfatos sobre pinturas murales reales en condiciones aeróbicas reales e *in situ*.³⁴

Como conclusión, podríamos decir que las limpiezas bacterianas se han utilizado hasta ahora para eliminar costras negras en material pétreo³⁵ (sulfatos y nitratos mayoritariamente), eflorescencias salinas³⁶ (nitratos principalmente) y materia orgánica³⁷ (restos orgánicos de deposición y colas aportadas). Evidentemente, para remover estas capas ajenas se deben

utilizar bacterias específicas según su capacidad metabólica: bacterias reductoras de sulfatos para eliminar costras negras y sulfatos, bacterias reductoras de nitratos para eliminar eflorescencias de detritus, y bacterias heterótrofas para eliminar materia orgánica diversa.

LAS BIOLIMPIEZAS BACTERIANAS EN CONTRAPOSICIÓN A LAS LIMPIEZAS TRADICIONALES

Según los estudios científicos antes explicados, las limpiezas bacterianas pueden solucionar con gran efectividad unos problemas de conservación hasta ahora muy complejos. Las sales y las colas animales polimerizadas y envejecidas son dos de los grandes problemas de la restauración, por su gran dificultad de remoción. Hasta ahora, los sistemas tradicionales fisicoquímicos lo han intentado con fuerza pero, o bien no remueven con eficacia las sustancias en cuestión, o bien aportan más y mayores problemas a corto y largo plazo sobre las piezas.

Tanto los apósitos de carbonato de amonio y EDTA como las resinas de intercambio iónico aportan mucha humedad y sales ajenas a los soportes, que hay que aclarar muy bien, aportando de nuevo mucha humedad y eliminando los sulfatos sólo parcialmente. Además, son métodos poco selectivos, agresivos, invasivos, tóxicos para el restaurador y que pueden afectar también al soporte original. Contrariamente, los tratamientos con bacterias son muy selectivos, muy eficaces, no tóxicos para el restaurador e inocuos para la obra patrimonial.³⁸ También, los microorganismos bacterianos presentan ventajas sobre los tratamientos enzimáticos, ya que las bacterias pueden metabolizar mejor sustancias complejas e incrustadas. Las enzimas son demasiado selectivas y débiles para remover materias tan complejas como los sulfatos o los nitratos. En cambio, las bacterias, gracias a los mecanismos de inducción génica, se adaptan a diversos nutrientes, sintetizando las enzimas necesarias para degradar un rango más amplio de sustancias.³⁹ Otra ventaja es el precio: las enzimas son de 3 a 10 veces más caras que las bacterias.

EL PROBLEMA DEL AGUA Y LA ELECCIÓN DE LOS SOPORTES DE APLICACIÓN

Como sabemos, el agua es un agente limpiador muy importante, pero se deben controlar sus inconvenientes. Tiene un poder de humectación a menudo limitado a causa de su elevada tensión superficial, mientras que manifiesta una elevada difusión vertical por capilaridad en los materiales porosos. En el caso de las biolimpiezas, normalmente necesitamos una difusión más limitada, para concentrar el poder de las bacterias en la superficie de la obra patrimonial. Además, la difusión vertical del agua, con la posterior evaporación superficial, hace precipitar las sales disueltas en el agua, recristalizándolas y generando disrupción mecánica en superficie. Por otro lado, dado su poder disolvente, el agua es incompatible con los soportes artísticos más hidrófilos, como temple magros, textiles y maderas degradadas entre otros, además de que puede fomentar el desarrollo de otros agentes de biodeterioro no controlados, acelerando la degradación de la obra.⁴⁰ Aun así, el agua es absolutamente necesaria en el proceso de la biolimpieza ya que las bacterias deben permanecer en un medio acuoso para mantenerse vivas, por lo tanto, había que idear un método para conseguir un ambiente húmedo de larga duración sobre las obras, pero que permaneciera en superficie. La solución no es otra que utilizar medios gelificados, porque además de localizar la acción y disminuir la evaporación de la solución acuosa-bacteriana, el sistema gelificado reduce la penetración y mejora la acción del mojado superficial.⁴¹ Hasta ahora, como hemos explicado en el apartado anterior, los apósitos habían sido de sepiolita o algodón, con Ranalli y Cappitelli⁴² desde 1996, y de Carbogel® a partir de 2006, en los estudios de Cappitelli y Zanardini.⁴³ Los geles aportaron mejoras sig-

²⁷ Ver 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), nº 5, p. 2.453-2.459.

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

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

³⁰ Ver SORLINI, C.; CAPPITELLI, F. "The application of viable bacteria for the biocleaning of cultural heritage surfaces". *Coalition*, nº 15 (enero de 2008), p. 18-20. ISSN 1579-8410.

³¹ Ver BOSCH, M.P.; REGIDOR, J.L.; SORIANO, P.; DOMÈNECH, M.T.; MONTES, R. "Ensayos de Biolimpieza con bacterias...", nº 4 y 5, p. 117-124.

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

³³ Ver BOSCH, M.P.; REGIDOR, J.L.; SORIANO, P.; DOMÈNECH, M.T.; MONTES, R. "Ensayos de Biolimpieza con bacterias...", nº 4 y 5, p. 118.

³⁴ Ver BOSCH, M.P.; REGIDOR, J.L.; SORIANO, P.; DOMÈNECH, M.T.; MONTES, R. "Ensayos de Biolimpieza con bacterias...", nº 4 y 5, p. 118.

³⁵ Formadas por deposición de contaminantes atmosféricos que con el agua producen ácidos que reaccionan con el carbonato, produciendo sulfatos y nitratos. Durante la cristalización del yeso (sulfato cálcico), otros contaminantes del aire, como por ejemplo las partículas carbonosas, se incrustan en la matriz mineral generando el ennegrecimiento típico de las costras negras.

³⁶ Formadas por deposición de contaminantes atmosféricos o por filtración-acumulación de detritus.

³⁷ Capas formadas por deposición de partículas atmosféricas, por colonización de microorganismos o por aportaciones de procesos de restauración.

³⁸ Ver BOSCH, M.P.; REGIDOR, J.L.; SORIANO, P.; DOMÈNECH, M.T.; MONTES, R. "Ensayos de Biolimpieza con bacterias...", nº 4 y 5, p. 117.

³⁹ Ver BOSCH, M.P.; REGIDOR, J.L.; SORIANO, P.; DOMÈNECH, M.T.; MONTES, R. "Ensayos de Biolimpieza con bacterias...", nº 4 y 5, p. 118.

⁴⁰ Ver 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 Ver REGIDOR, J. L. *Limpieza con bacterias. Un sistema acuoso...*, p. 11.

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

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

nificativas, permitiendo a las bacterias permanecer vivas y más activas durante muchas más horas. Las bacterias atrapadas en el gel actúan de manera más gradual y prolongada en el tiempo, y con una penetración vertical del agua, muy inferior a los apósitos. El algodón y la sepiolita, por contra, generan ciclos de absorción y desorción periódicos, que hacen circular dentro del sistema poroso tanto las capas que deseábamos eliminar, como las sales presentes en el sustrato. Además, el secado del apósito es más rápido y las bacterias comienzan a morir en un tiempo bastante acelerado. Los geles, no obstante, tienen el problema de la remoción y los residuos, ya que según qué tipo de gelificante se trate, es más o menos adhesivo y, por lo tanto, más o menos difícil de remover. Los residuos sólidos del material gelificante no evaporan ni se subliman, sino que pueden permanecer para siempre en el sistema poroso de la superficie tratada. Por un lado, los gelificantes (colas, celulosas o gomas) son solubles en agua, por lo tanto, se deberían de poder eliminar completamente mediante aclarados. No obstante, un aclarado repetido e insistente no siempre es compatible con las superficies tratadas, donde precisamente hemos utilizado un sistema gelificado para limitar la acción humectante del tratamiento escogido. El restaurador ha de procurar reducir al máximo los residuos sobre la obra, así que hay que evitar el uso de geles fluidos en superficies muy porosas, texturadas o con grietas, porque la remoción de los residuos se haría mucho más compleja en estos casos. Por otro lado, se pueden tomar otras precauciones, como interponer un papel japonés como barrera. Aun así, si el gel es muy denso, las bacterias no pueden moverse con libertad y pueden permanecer prácticamente encapsuladas dentro, por ejemplo, de un gel rígido de agar-agar, sin poder efectuar correctamente su función. Además, en un gel de agar-agar las bacterias que no quedaran en la zona de contacto directo con la superficie patrimonial, no serían útiles, porque no podrían llegar a la superficie a tratar. Por otro lado, los geles fluidos, añaden el gran problema de la remoción y de los residuos, así que la solución más adecuada ha sido encontrada por el equipo de la UPV:⁴⁴ aplicar a pincel la solución bacteriana sobre el soporte e inmediatamente aplicar encima un gel rígido de agar-agar que sólo contiene agua. El gel mantiene humectadas las bacterias y, al mismo tiempo, controla su penetración y actuación, ya que tiene un alto poder de absorción de agua, reteniéndola y liberándola de manera progresiva y uniforme, en pequeños ciclos.

Paralelamente al estudio bibliográfico sobre geles, efectuamos pruebas de humectación y remoción con diversos geles y sustentantes⁴⁵ como agar-agar al 2%, agar-agar al 4%, Carbogel® al 1,5%, Klucel G® al 4%, Carboximetilcelulosa al 4% y el sustentante de pulpa de papel Arbocel®, llegando a las mismas conclusiones que la UPV.

FASE EXPERIMENTAL: ELECCIÓN DE LA BACTERIA

Iniciamos las pruebas sobre cuatro piezas escogidas por el material constitutivo. Se trata de cuatro piezas provenientes de excavación: un fragmento cerámico, un hueso de bóvido y dos fragmentos pertenecientes a una misma pintura mural.⁴⁶

Como ya hemos comentado anteriormente, antes de iniciar una limpieza hemos de conocer al máximo la técnica y los materiales de la obra patrimonial que trataremos. Además de la información histórica y técnica, que ya nos da muchas pistas, hay que sumar la experiencia del restaurador y sobre todo, y siempre que sea posible, información contrastada por medio de análisis instrumentales que nos ayuden no sólo a comprender las técnicas y las capas de superficie, sino también las proporciones y presencia de cada sustancia estudiada, así como el estado de degradación de las mismas.⁴⁷ En los casos presentados, por sus características, hicimos observación macroscópica con microscopio digital, fotografía UV con

lámpara de Wood y test de pH, conductividad e hidrofiliad.⁴⁸ Finalmente, como no pudimos conseguir para el trabajo muestras reales con restos destacables de colas orgánicas y nitratos (los elementos con los que queríamos testar las biolimpiezas), hicimos probetas con fragmentos descontextualizados,⁴⁹ induciendo cola y nitratos sobre los fragmentos, simulando ataques graves de sales en el caso de la cerámica y el hueso, y una intervención de traspaso inadecuado con cola de conejo en el caso de los fragmentos de pintura mural.

Una vez conocidas las sustancias que queríamos remover, había que escoger la bacteria para eliminarlas. En nuestro caso, queríamos eliminar tanto nitratos como cola animal. Como ya hemos visto antes, según la bibliografía, en biolimpiezas se han usado bacterias desnitrificantes como la *Pseudomonas aeruginosa* (descartada por ser patógena), la *Pseudomonas stutzeri* o la *Pseudomonas desnitrificans*, sobre muros y material pétreo.⁵⁰ En cambio, en relación al uso de bacterias para eliminar cola animal, hemos encontrado menos bibliografía, pero concretamente aplicada a pintura mural.⁵¹ La bacteria empleada con éxito para eliminar colas animales es la *Pseudomonas stutzeri* que, como acabamos de comentar, también es desnitrificante, por ello, con una sola cepa de bacteria podríamos hacer las dos pruebas de este trabajo y, por lo tanto, fue la bacteria escogida.

Las bacterias se compraron en cultivo liofilizado en la colección alemana de cultivos tipo *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* y se escogió la cepa DMSZ 5190 por los buenos resultados obtenidos durante las pruebas de la UPV para la investigación de Doctorado de María del Pilar Bosch.⁵² La *Pseudomonas stutzeri* DMSZ 5190 se desarrolló bien entre 25 y 30 °C y en ambiente tanto aeróbico como anaeróbico. También se desarrolló bien en medios de cultivo con nitratos y con colas, y eliminó favorablemente ambas sustancias. Como no disponemos de un laboratorio de microbiología, desde la Universidad Politécnica de Valencia, nos permitieron muy amablemente hacer las pruebas en sus laboratorios, con el doctor y profesor José Luis Regidor y la postdoctoranda Pilar Bosch. Las bacterias escogidas se prepararon antes de iniciar los procesos de limpieza, haciéndolas crecer durante cinco días en dos medios de cultivo: por un lado, en medio M9 diluido al 50% (3 gramos de Na₂HPO₄, 1,5 gramos de KH₂PO₄, 0,5 gramos de NH₄Cl y 0,25 gramos de NaCl en 1 litro de agua destilada) con un 1% de cola animal, y por otro lado, en medio nitrato. Después de cinco días de cultivo y crecimiento, las bacterias se plantaron en matraces en agitación a 28 °C, 24 horas para obtener el punto máximo de crecimiento exponencial. Finalmente se lavaron y centrifugaron en tres ciclos de 10 minutos a 4.200 rpm para finalmente suspenderlos en agua destilada estéril. De esta manera, no se aplica sobre la obra ningún elemento que no sean bacterias y agua estéril.

FASE EXPERIMENTAL: REMOCIÓN DE COLA ANIMAL CON PSEUDOMONAS STUTZERI

Para las pruebas de remoción de cola animal, preparamos dos probetas a partir de material real arqueológico.

El MAC Empúries y la ES-CRBCC nos cedieron temporalmente para el ensayo dos pequeños fragmentos descontextualizados de pintura mural romana, provenientes de la unidad estratigráfica 2209 del yacimiento arqueológico de Ampurias, y datados entre los siglos I a.C.-I d.C.⁵³ Los fragmentos están conformados por

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

⁴⁵ Efectuamos pruebas de humectación y remoción, además de pruebas de envejecimiento dentro de un armario estufa a 28 °C simulando el incubado de las bacterias.

⁴⁶ En el trabajo completo se trataron siete piezas escogidas tanto por su material constitutivo como por su problemática y capas de superficie: por un lado, piezas musealizadas desde hace muchos años, que combinaban la problemática propiamente arqueológica con actuaciones de restauración sucesivas; por otro lado, piezas provenientes directamente de excavación. Las piezas: un socarrat medieval, una pieza de marfil del siglo XVIII, un hueso de bóvido tardoantiguo, dos fragmentos de pintura mural romana, un fragmento de cerámica tardoantigua y un sello de cera románico.

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

⁴⁸ En otros casos del trabajo se incluyeron técnicas instrumentales como el FT-IR.

⁴⁹ El resto de piezas estudiadas durante el trabajo fueron piezas reales con problemáticas reales.

⁵⁰ Ver RANALLI, G.; MATTEINI, M.; TOSINI, I.; ZANARDINI, E.; SORLINI, C. "Bioremediation of Cultural Heritage: Removal of Sulphates, Nitrates and Organic Substances". En: CIFERRI, O.; TIANO, P.; MASTROMEI, G. *Of Microbes and Art: The role of microbial communities*

in the degradation and protection of cultural heritage. Nueva York: Kluwer Academic, Plenum Publishers, 2000, p. 231-245. ISBN: 0306463776.

⁵¹ Ver 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), nº 5, p. 2453-2459.

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

⁵³ Dos fragmentos descontextualizados (sin punto de unión con el resto de fragmentos) de pintura mural correspondientes a un conjunto de 162 fragmentos, recuperados durante la excavación

(ya estaban desprendidos del muro). La pintura corresponde al tercer estilo pompeyano, que destaca por los fondos de colores planos con pequeñas decoraciones en miniatura y guirnalda. Destacan en este caso los colores rojo, verde, amarillo, malva y blanco. La pintura ha sido realizada al fresco con detalles al seco. El MAC Empúries efectuó una limpieza superficial y un montaje previo a la adhesión. Actualmente se está restaurando en la ESCRBC.

⁵⁴ Existen límites en las técnicas analíticas que pueden no reconocer elementos complejos como, por ejemplo, aglutinantes alterados. No obstante, hay sospechas, por tradición y análisis, de que se pueda tratar de un temple de huevo.

⁵⁵ Ver BOSCH, M.P. *Caracterización del biodeterioro y desarrollo...*, p. 200. La temperatura idónea para este tipo de bacteria es de 25 a 30 °C, preferiblemente 28 °C. Para poder conseguir esta temperatura, tanto en la superficie pictórica como en la solución bacteriana, usamos una lámpara de luz infrarroja y un termómetro de superficie.

⁵⁶ Unidades Relativas de Luz.

⁵⁷ Los pequeños restos de bacterias acaban siendo cero una vez se seca la superficie completamente.

⁵⁸ Ánfora bética ALT'07 UE 400. Posiblemente se trata de un ánfora bética Dressel 23, que contenía aceite para su transporte y comercialización.

mortero natural de cal, pigmentos aplicados al fresco y detalles al seco (temple). **1** [pág. 64]

Antes de tratar las piezas hicimos el estudio analítico previo para saber si podíamos aplicar la limpieza bacteriana sin ocasionar problemas a los fragmentos. La pintura presenta unos detalles al seco que, según los estudios realizados hasta ahora, parecen ser un temple del que se desconoce el aglutinante.⁵⁴ Si se tratara de un temple al huevo sería bastante inalterable y, si fuera de cola, podría ser alterado por la biolimpieza, pero si la cola está muy polimerizada (ya que ha llegado a nuestros días en buen estado de conservación), será muy difícil que la bacteria pueda atacarlo, y en todo caso, realizaríamos pruebas para comprobarlo. Por otro lado, a partir de la observación de una microgota de agua aplicada sobre la superficie con un tubo capilar, constatamos cómo la superficie absorbe el agua absolutamente, es decir, que se trata de una superficie muy hidrófila. Posteriormente, con microscopio digital, observamos que los pigmentos no se habían movido ni alterado con la acción del agua. Seguidamente, realizamos unas pruebas de limpieza acuosa en estado libre y, al efectuar la fricción típica de una limpieza moderada con torunda de algodón (la acción mecánica de una limpieza acuosa libre ordinaria), se apreció una cierta liberación de partículas de pigmento. Así pues, después de estas primeras pruebas, observamos que las muestras soportan la acción del agua en cantidades moderadas y creemos que la limpieza efectuada podrá contener un medio bacteriano-acuoso pero gelificado y que no necesite pasadas o aclarados sucesivos ni una acción mecánica destacable.

Con la medida del pH obtuvimos un pH de 8 en ambas superficies y, por lo tanto, la solución bacteriana, que tiene un pH 7, es suficientemente coherente con el soporte que queríamos tratar.

Finalmente, procedimos a medir la conductividad de los restos murales. A partir de la aplicación de un gel rígido de agar-agar sobre la superficie de la pieza, y dejándolo actuar durante 20 minutos, podemos conocer la conductividad de su superficie. Una vez pasados los 20 minutos, nos da un resultado final de 940 μ S el fragmento rojo, y 920 μ S el fragmento blanco. **2** [pág. 65]

Preparamos las probetas: aplicamos cola de conejo en proporción 1:3 a pincel sobre los fragmentos de pintura mural para simular restos de una antigua intervención. **3** [pág. 65] Se inició el cultivo de las bacterias una semana antes de comenzar la remoción de la cola. Como ya hemos explicado en la primera parte del artículo, la *Pseudomonas stutzeri* DMSZ 5190 se hace crecer durante 5 días en un medio de cultivo al que se le añaden un 1% de cola y nitratos. Después, las bacterias se plantan en matraces en agitación a 28 °C, 24 horas para obtener el punto máximo de crecimiento exponencial. Finalmente se lavan y centrifugan en tres ciclos de 10 minutos a 4200 rpm para suspenderlas en agua destilada estéril. El día de la inoculación se calentaron las bacterias y las superficies de la pintura mural entre 28 y 30 °C con la ayuda de una lámpara de infrarrojos y un termómetro de superficie.⁵⁵ **4** [pág. 65] Mantuvimos la temperatura estable durante las pruebas. Justo antes de aplicar las bacterias comprobamos que éstas se hallan vivas y en concentración suficiente. Con la ayuda del luminómetro medidor de ATP, obtuvimos una medición de 7.517 URL⁵⁶ en 10 μ l de solución.

Aplicamos las bacterias a pincel **5** [pág. 65] y, justo encima, añadimos una plancha de gel rígido de agar-agar al 2% capaz de aportar una humedad constante para mantener vivas las bacterias, pero controlada en cuanto a la penetración

por capilaridad en el soporte. A la vez, efectuamos controles comparativos de agua gelificada con agar-agar, para establecer un control de limpieza sin bacterias. **6** [pág. 66] Dejamos actuar tanto el control como la solución de bacterias durante dos periodos diferentes de 2 h 15 min y 3 horas.

El primer aclarado se hizo con esponja prácticamente seca para remover el máximo de cola y bacterias. Posteriormente, se aclaró con agua desionizada a esponja, limitando la humedad. **7** [pág. 66]

Después de esta primera aplicación de 2 h 15 min, observamos los resultados, que fueron muy similares en ambos fragmentos. Sólo a simple vista ya se observaba que la parte limpiada con bacterias ha removido mucho mejor la cola. **8** [pág. 66]

A las 3 horas procedimos a remover las bacterias que quedaban y los resultados fueron todavía mejores. **9**, **10** y **11** [pág. 67] aunque se podría ampliar el tiempo de actuación perfectamente hasta 4 horas para conseguir una remoción de la cola más completa. En seguida advertimos que la remoción de la cola es mucho más sencilla en la zona tratada con bacterias. Sobre los retoques al seco, hicimos las mismas pruebas e incluso insistimos con cierta acción mecánica, obteniendo unos resultados igual de buenos y sin advertir ningún cambio, remoción ni alteración en la policromía.

Para acabar, medimos el ATP sobre las superficies tratadas para comprobar que habíamos aclarado correctamente y que no quedaban bacterias vivas en la superficie patrimonial: de 7.517 URL que había en 10 μ l de solución bacteriana al inocular las muestras de pintura, una vez acabado el tratamiento, sólo quedaban 32 URL que es una cantidad no apreciable.⁵⁷

También volvimos a tomar las mediciones de conductividad y pH, que fueron, en el caso de la pintura roja, 300 μ S y un pH de 7,5 y, en el caso de la pintura blanca, 250 y un pH de 7,5. Observamos que los niveles de pH habían variado muy poco porque, además de las colas, la limpieza había rebajado de forma destacada la presencia de iones libres, posiblemente a causa de que las bacterias habían procesado algunas sales, o posiblemente por la acción solvente del agua.

FASE EXPERIMENTAL: REMOCIÓN DE NITRATOS CON *PSEUDOMONAS STUTZERI*

Para iniciar las pruebas de remoción de nitratos, preparamos dos probetas a partir de material real arqueológico. El Laboratorio de Arqueología Medieval de la UB nos cedió material de las excavaciones de Sant Martí de les Tombetes y Els Altmiris (ambas en el Pallars Jussá, Lérida). Se trata de un fragmento de hueso largo de bóvido del siglo VII, con unas dimensiones de 9,8 x 4,1 cm y de un fragmento de ánfora⁵⁸ bética Dressel 23 del siglo V, con unas dimensiones de 11,8 x 9,1 cm. **12** y **13** [pág. 67]

Comenzamos por hacer el control previo de las piezas antes de añadir los nitratos. El estudio previo es clave para saber si podemos aplicar la limpieza bacteriana sin ocasionar problemas a los fragmentos. Como en el caso anterior, a partir de la observación de una microgota de agua aplicada sobre la superficie, podemos constatar que ambas superficies son muy hidrófilas. Posteriormente, con microscopio digital, observamos que la superficie no se ha alterado con la acción del agua. Seguidamente hacemos unas pruebas de limpieza acuosa en estado libre y, al efectuar la fricción típica de una limpieza moderada con hisopo, se aprecia una cierta liberación de partículas en el caso de la cerámica. Así pues, después de estas primeras pruebas, observamos que las muestras sopor-

tan la acción del agua en cantidades moderadas y creemos que la limpieza podrá contener un medio bacteriano-acuoso, pero gelificado, y que no necesite aclarados sucesivos ni una acción mecánica destacable, sobre todo en el caso de la cerámica. El tema de la eliminación de sales en materiales porosos es un problema muy usual con el que el restaurador especialista ha de enfrentarse con muchas dificultades. La migración y cristalización de las sales es un problema muy grave para el patrimonio, y a menudo, en el desalado tradicional con apósitos, se arrastran las sales interiores hacia la superficie para solubilizarlas y absorberlas, generando a veces más daños en el sistema poroso y favoreciendo la aparición de una mayor cantidad de sales en superficie. Contrariamente, con las limpiezas bacterianas gelificadas, el flujo de agua puede limitarse mucho más que con los apósitos absorbentes y, como no se trata de solubilizar las sales sino de procesarlas y transformarlas, la eliminación de las sales puede ser más rápida y eficaz, y menos contraproducente, ya que no las hace migrar. De la misma manera, les biolimpiezas, al tener un índice de humedad más controlado y poderse aplicar superficialmente, permiten desalar piezas que por su naturaleza no podrían tratarse por inmersión. Cuando procedemos a medir el pH, obtenemos como resultado un pH de 8 en el hueso y un pH de 7 en el ánfora.

Finalmente, medimos la conductividad a partir de la aplicación de un gel rígido de agar-agar sobre la superficie de los artefactos. Dejándolo actuar durante 20 minutos, podemos conocer la conductividad de las superficies. Una vez pasados los 20 minutos, nos da un resultado final de 480 μS el fragmento cerámico, y 550 μS el hueso. Con la observación en la lámpara UV no se observa ninguna capa de protección, sólo una pequeña franja de Paraloid® correspondiente al siglado de la cerámica.

Preparación de las probetas: en este caso, añadimos nitrato potásico al hueso y a la cerámica para simular una considerable capa de nitratos como la que podríamos encontrar en piezas procedentes de un yacimiento rico en nitratos. Preparamos una solución saturada de nitrato potásico en agua desmineralizada, hasta saturar la solución. Efectuamos un baño por inmersión total de las piezas, durante dos horas, con su posterior secado en un armario estufa, a 50 °C. Una vez secas las piezas, repetimos la operación hasta haber efectuado cuatro baños y cuatro secados. De este modo conseguimos una costra de sales en la superficie de ambos artefactos.

Se inicia el cultivo de las bacterias una semana antes, del mismo modo que en el caso anterior. El día de la inoculación calentamos las bacterias y las superficies a tratar entre 28 y 30 °C con la ayuda de una lámpara de infrarrojos y de un termómetro de superficie. Mantendremos la temperatura estable durante las pruebas. Justo antes de aplicar las bacterias comprobamos que éstas se encuentran vivas y en concentración suficiente. Con la ayuda del luminómetro medidor de ATP obtenemos una medición de 7.517 URL en 10 μl de solución.

Aplicamos las bacterias a pincel y, encima, añadimos el gel de agar-agar para mantener una humedad constante pero controlada, ya que no queremos generar migraciones internas de sales. El agar-agar se aplica esta vez en caliente (justo antes de que solidifique, sobre los 40 °C) porque, al no tratarse, el hueso y la cerámica (de superficies lisas), las planchas de agar-agar no harían buen contacto. A la vez, hacemos la comparación con una aplicación de agua gelificada con agar-agar, para efectuar un control de limpieza sin bacterias. Realizamos tres pruebas con diferentes tiempos de aplicación: 2 h 15 min, 3 horas y 4 horas y los respectivos controles con agua sin bacterias. 14 y 15 [pág. 68]

El primer aclarado se hace con esponja prácticamente seca para remover el máximo de nitratos y bacterias. Posteriormente, se aclara con agua desionizada y esponja, limitando la humedad. Sólo a simple vista ya se observa que la parte tratada con bacterias ha removido mucho mejor las sales que la parte tratada con control de agua. A las 2 h 15 min se aprecia una buena remoción de las sales, pero se observan resultados más satisfactorios después de 3 y 4 horas de aplicación 16 y 17 [pág. 69].

Finalmente volvemos a tomar los datos iniciales de conductividad y pH, y hacemos una observación macroscópica para valorar el nivel de limpieza. Tomamos la conductividad en las cuatro zonas de las pruebas. Hemos reservado una zona sin tratar y, el resto, han sido tratadas con control o bacterias, y con diversos tiempos de aplicación. Además, hacemos una medición de nitratos y nitritos,⁵⁹ ya que las bacterias han eliminado nitratos pero, en cambio, generan algunos nitritos. Como podemos observar en las imágenes 18 y 19 [pág. 69], la zona de 2 h 15 min presenta más nitratos (cuadrado rosa oscuro), que la de 4 horas, pero no más que las de control con agua y reserva sin limpiar. Además, el buen efecto de las bacterias queda en evidencia cuando observamos el segundo cuadrado de la tira indicadora: en las zonas donde se han eliminado más nitratos también aparece una cierta presencia de nitritos.

En relación a la conductividad, la zona de la cerámica en la que hemos aplicado las bacterias durante 2 h 15 min, tiene una conductividad de 630 μS , cuando la cerámica en origen tenía 480 μS . Las bacterias han eliminado muchas sales, ya que la concentración de iones en la zona sin tratar da error en el conductímetro (supera los límites de lectura del aparato). En el control con agua de 2 h 15 min tenemos una conductividad menor, pero las sales han migrado a la parte posterior de la cerámica, no siendo éste el efecto deseado para ninguna restauración patrimonial. La conductividad de la superficie en esta zona es de 450 μS . La zona tratada con bacterias durante 4 horas da una conductividad de 610 μS , así que podemos pensar que las bacterias todavía continuaban removiendo sales y que se necesitaría más tiempo de aplicación para estas cantidades tan elevadas de nitratos.

En referencia al hueso, el control de nitratos es similar al caso anterior: quedan menos nitratos en las zonas tratadas con bacterias y aparecen sutilmente nitritos. Respecto a la conductividad de las cuatro zonas del hueso, es de 3230 μS en la zona tratada durante 2 h 15 min, de 2830 μS en el control de agua de 2 h 15 min, de 2730 μS en la zona tratada durante 3 horas, y de 2530 μS en el control de agua de 3 horas. Como en el caso anterior, el agua sola ha hecho migrar más sales hacia la parte posterior del hueso, y todavía queda mucha concentración iónica, en general, sobre la superficie del hueso.

El pH tanto del hueso como de la cerámica se mantiene idéntico al inicial: cerámica pH 7 y hueso pH 8.

Finalmente, y con intención de comprobar que hemos aclarado suficientemente las bacterias de la superficie de los artefactos, medimos el ATP tanto del hueso como de la cerámica. De 7.517 URL iniciales en 10 μl de solución bacteriana, una vez terminado el tratamiento, la cerámica queda totalmente libre de bacterias: 0 URL, y el hueso presenta una pequeña cantidad no apreciable: 184 URL. Podemos volver a aclarar el hueso si lo creemos necesario aunque, una vez completamente seco, no debería quedar ninguna *Pseudomona stutzeri* viva.

⁵⁹ Tiras indicadoras de presencia de nitratos y nitritos Quantofix®.

Con microscopio digital comprobamos cómo en las zonas en las que se ha aplicado la limpieza bacteriana, se ha conseguido una limpieza mucho más profunda que en la zona en la que hemos hecho una limpieza tradicional de control con agua, y que no se aprecian residuos de gel. [20](#) y [21](#) [pág. 70]

CONCLUSIONES

Durante las pruebas en los fragmentos de pintura mural, hemos observado claramente que la limpieza bacteriana ha conseguido un nivel de remoción de la cola muy profunda, en contraposición al ensayo de limpieza tradicional con agua sola, que ha mostrado mucha dificultad en eliminar una capa tan gruesa de cola. Hay que tener en cuenta que las muestras aguantaban la acción del agua, si no se trataba de una humectación masiva e insistente, pero en ningún caso soportaban la acción mecánica ni el agua caliente, que es como se haría una limpieza tradicional de cola sobre un antiguo traspaso mural. Además, las bacterias actúan más rápidamente que los apósitos de agua, y no necesitan repeticiones sucesivas, como acostumbra a pasar en el tratamiento tradicional.

A causa de que los fragmentos soportaban la acción del agua necesaria para la limpieza bacteriana, la única preocupación que teníamos era si las bacterias respetarían el aglutinante que compone el temple de los detalles al seco. Durante las pruebas el temple no ha sufrido ningún daño y la limpieza ha sido muy correcta, hecho que nos hace pensar que se pueda tratar de un temple al huevo.

En relación a la aportación de residuos, el gel de agar-agar no deja residuos detectables, ni siquiera por cromatografía de gases, a causa de su bajísima adhesividad, así que no hay que preocuparse por ellos. Por otro lado, los residuos bacterianos podrían ser un problema si quedasen en superficie y proliferasen generando un ataque biológico severo, pero esto no puede pasar porque hemos realizado un correcto aclarado, las bacterias utilizadas no son esporulantes y, además, hemos llevado a cabo un control final de células ATP que ha confirmado que no quedaban prácticamente bacterias vivas en las superficies tratadas.

Otro sistema que se podría haber utilizado para eliminar la cola, si no hubiéramos decidido usar bacterias, podría haber sido un *buffer* de pH 9-9,5, que no atacaría el sustrato calcáreo ni los pigmentos y, en cambio solubilizaría la cola proteica por encontrarse fuera de su rango de seguridad. No obstante, nos decidimos por las bacterias porque un pH tan alcalino habría atacado los detalles al seco de este mural de Ampurias. Tampoco sería recomendable la adición de quelantes al *buffer*, ya que atacarían la técnica seca ionizando el aglutinante.⁶⁰

Durante las pruebas en los fragmentos de hueso y cerámica hemos observado claramente cómo la limpieza bacteriana ha conseguido un nivel de remoción de nitratos bastante aceptable, en contraposición al ensayo de limpieza tradicional con agua sola, que ha mostrado una mayor dificultad en eliminar una costra tan gruesa de nitratos y, además, ha generado una migración grave de sales hacia otras zonas de las muestras. Como los fragmentos aguantaban la acción del agua, hemos podido hacer esta prueba con limpiezas bacterianas, pero hemos advertido que se deberían hacer varias aplicaciones, ya que con una sola aplicación no ha sido suficiente.⁶¹ Después de la intervención, el pH de los fragmentos ha quedado intacto, pero la conductividad era todavía muy elevada. Las piezas presentaban sales internas que se deberían eliminar con nuevas aplicaciones bacterianas, incluso por medio de una biolimpieza por inmersión.

Como conclusión final, hay que decir que antes de plantearnos una limpieza bacteriana, se debe tener en cuenta:

- qué material conforma la pieza a tratar y qué material ajeno queremos eliminar
- la selección de la bacteria a aplicar
- la selección del modo de aplicación: sustentantes, pH y conductividad de la solución bacteriana, etc.
- rangos de seguridad para la obra y para el restaurador
- el control de la aplicación y de las condiciones ambientales
- la correcta eliminación de las bacterias al finalizar el tratamiento
- el control de la correcta eliminación de las bacterias con el paso del tiempo
- las bacterias necesitan un medio húmedo para desarrollar sus procesos metabólicos, así que las obras que tratemos con bacterias han de poder soportar un tratamiento acuoso, al menos puntual y, por apósito o geles, durante unas horas.

Como inconvenientes hemos encontrado pocos. En el caso de la cerámica, la aplicación del agar-agar generó una leve agresión superficial sobre la cerámica. Cabe decir que la pieza presentaba cierta descohesión en su estado inicial y que, entonces, la ligera adhesividad del gel generó una pequeña remoción de partículas superficiales. Este inconveniente, no obstante, no es grave, ya que se habría evitado fácilmente utilizando un papel japonés como barrera. Otro inconveniente es que las superficies tratadas deben poder soportar la aplicación de agua, por lo tanto, existirán materiales que no podrán tratarse con este medio. Una posible solución sería comprobar si una aplicación muy controlada del agua a través de geles permitiría finalmente su aplicación, no obstante, habría que hacer pruebas. El último inconveniente es que, para poder realizar las biolimpiezas, se requiere un laboratorio de microbiología y un microbiólogo en el equipo. Quizá algún día se comercialicen kits de crecimiento bacteriano fáciles de usar para el restaurador, pero todavía ése no es el caso.

Por lo demás, todo nos parecen ventajas: compatibilidad material, coherencia, efectividad, selectividad, baja toxicidad, inocuidad, no aportación de residuos, rapidez de acción, valoración económica no mucho más elevada que las limpiezas tradicionales⁶² y unos buenísimos resultados en las pruebas aquí presentadas.

Como mejoras a trabajar en el futuro, hay que decir que este estudio es sólo una primera aproximación experimental sobre algunos materiales arqueológicos pero, evidentemente, no todos y no suficientemente representativos. Esperamos, próximamente, poder hacer pruebas sobre nuevos soportes, con varios tiempos de aplicación de las bacterias, con la aplicación de nuevos geles todavía muy desconocidos en nuestro país, con la aplicación de barreras, etc., efectuando pruebas sistemáticas y múltiples sobre éstos y otros materiales arqueológicos para poder establecer estadísticas y resultados más concluyentes.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la investigadora y doctora Pilar Bosch, al doctor y profesor José Luis Regidor y a la Universidad Politécnica de Valencia su ayuda con las pruebas de biolimpieza bacteriana. Sin ellos este trabajo no habría sido posible. También agradezco al MAC Empúries, a la ESCRBCB y a la UB su ayuda, habiendo cedido las piezas utilizadas en las pruebas.

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

⁶¹ Cabe decir que, para hacer los ensayos, la concentración de nitratos inducida era masiva.

⁶² Evidentemente, incluir gelificantes y bacterias en nuestro laboratorio es más caro que trabajar sólo con disolventes, pero no es tanta la diferencia real si tenemos en cuenta que son productos que se utilizan en ínfimas cantidades.

FOTOGRAFÍAS

- 1** Muestras de pintura mural antes de la intervención (Fotografía: Silvia Marín).
- 2** Medición de conductividad superficial con gel rígido de agar-agar (Fotografía: Silvia Marín).
- 3** Elaboración de las probetas a partir de la aplicación de cola de conejo sobre las muestras (Fotografía: Silvia Marín).
- 4** Calentamiento de las muestras a 28 °C para generar un ambiente ideal para las bacterias. Departamento de pintura mural de la UPV (Fotografía: Silvia Marín).
- 5** Aplicación de la solución bacteriana sobre los fragmentos de pintura mural. Departamento de pintura mural de la UPV (Fotografía: Pilar Bosch).
- 6** Imagen en la que se aprecia el control de agua y la limpieza bacteriana sobre una de las muestras de pintura mural. Departamento de pintura mural de la UPV (Fotografía: Silvia Marín).
- 7** Aclarado de las bacterias a las 2 h 15 min. Departamento de pintura mural de la UPV (Fotografía: Pilar Bosch).
- 8** Imagen comparativa una vez retiradas las aplicaciones que han actuado durante 2 h 15 min. Departamento de pintura mural de la UPV (Fotografía: Silvia Marín).
- 9** Estado final de una de las muestras. La mitad derecha, tratada con bacterias, presenta una remoción prácticamente completa, mientras que la mitad izquierda, tratada sólo con agua, presenta todavía muchos restos de cola. Departamento de pintura mural de la UPV (Fotografía: Silvia Marín).
- 10** Imágenes de microscopio DinoLite (60x): comparativa entre zonas limpiadas con agua (izquierda) que todavía presentan restos de cola y zonas limpiadas con bacterias (derecha) (Fotografía: Silvia Marín).
- 11** Imágenes de microscopio DinoLite (60x): comparativa entre zonas limpiadas con agua (izquierda) que todavía presentan restos de cola y zonas limpiadas con bacterias (derecha) (Fotografía: Silvia Marín).
- 12** Muestra de hueso antes de la intervención (Fotografía: Silvia Marín).
- 13** Muestra cerámica antes de la intervención (Fotografía: Silvia Marín).
- 14** Controles y limpiezas bacterianas sobre la cerámica. Departamento de pintura mural de la UPV (Fotografía: Silvia Marín).
- 15** Controles y limpiezas bacterianas sobre el hueso. Departamento de pintura mural de la UPV (Fotografía: Silvia Marín).
- 16** Estado final de la cerámica. Se indican las zonas limpiadas con bacterias y las zonas limpiadas con agua. La biolimpieza ha eliminado con más profundidad las sales. Departamento de pintura mural de la UPV (Fotografía: Silvia Marín).
- 17** Estado final del hueso. Se indican las zonas limpiadas con bacterias y las zonas limpiadas con agua. La biolimpieza ha eliminado con más profundidad las sales. Departamento de pintura mural de la UPV (Fotografía: Silvia Marín).
- 18** Control de nitratos y nitritos en la cerámica, después del tratamiento. Departamento de pintura mural de la UPV (Fotografía: Silvia Marín).
- 19** Control de nitratos y nitritos en el hueso, después del tratamiento. Departamento de pintura mural de la UPV (Fotografía: Silvia Marín).
- 20** Imágenes de microscopio DinoLite (60x). Cerámica: zona tratada con agua (izquierda) en contraposición a la zona tratada con bacterias (derecha). La zona tratada con bacterias no tiene sales visibles a microscopio (Fotografía: Silvia Marín).
- 21** Imágenes de microscopio DinoLite (60x). Hueso: zona tratada con agua (izquierda) en contraposición a la zona tratada con bacterias (derecha). La zona tratada con bacterias presenta menos cantidad de sales visibles a microscopio (Fotografía: Silvia Marín).

BIBLIOGRAFÍA

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*. Huesca: 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. Pautas para seguir el protocolo de limpiezas adoptado en el CRBMC siguiendo el sistema de Paolo Cremonesi*. Valldoreix: Documento Interno del CRBMC, 2010.

CREMONESI, P. *Introducció dels Enzims en el Protocol de Netejes. Pautas para seguir el protocolo de limpiezas con Enzimas adoptado en el CRBMC siguiendo el sistema de Paolo Cremonesi*. Valldoreix: Documento interno del CRBMC, 2012.

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

CREMONESI, P. *Actualización de materiales y métodos para la limpieza de superficies policromadas. Apuntes del curso del 26-28 de enero de 2015*. Barcelona: ESCRBCC, 2015.

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

MOREIRA, A. T. "A problemática dos resíduos em sistemas gelificados para a limpeza de pinturas". *Ge-Conservação*, nº 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: Biolimpieza de Obras de Arte. Apuntes del curso del 31 de mayo al 1 de junio de 2013*. Jaca: Museo Diocesano de Jaca, 2013.