

## REVISIÓN

### Biodeterioro de monumentos y biorremediación: estado actual y perspectivas futuras

Gonzalo Gómez Alarcón<sup>1\*</sup>, Cesáreo Sáiz Jiménez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia. <sup>2</sup>Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (IRNAS-CSIC), Sevilla.

\*e-mail: gongomez@yahoo.es

Recibido el 7 de noviembre de 2013

An. Real Acad. Farm. Vol 79, Nº 4 (2013), pag. 562-579

#### RESUMEN

Durante siglos se ha intentado detener el proceso natural de destrucción de la piedra en construcciones y monumentos mediante obras de mantenimiento y reparación, usando técnicas y materiales tradicionales en siglos pasados como los morteros de cal y arena. A partir de la segunda mitad del siglo XX, se introducen los materiales poliméricos y sintéticos. En las últimas décadas, con el desarrollo de la biotecnología, las propuestas de restauración han cambiado drásticamente y se suponen superiores a los métodos tradicionales. Sin embargo, en algunos casos, los resultados no parecen convincentes. En la primera década del siglo XXI se está prestando una especial atención a la producción de calcita por bacterias en relación con un proceso de consolidación de la piedra deteriorada. La limpieza de frescos y pinturas con enzimas o mediante tratamiento con bacterias es otro de los temas que despierta una especial atención en la restauración y conservación de monumentos. La biotecnología tiene mucho que ofrecer pero debe superar las barreras que actualmente la convierten en una técnica prometedora en el campo de la conservación del patrimonio aunque, aún, de difícil aplicación a monumentos. Su utilización se efectúa en ensayos u objetos de dimensiones abarcables, mientras que su aplicación a escala industrial está aún por desarrollar.

**Palabras clave:** Deterioro; Biodeterioro; Consolidación; Calcita; Enzimas; Bacterias sulfato-reductoras; Biotecnología.

#### ABSTRACT

*Monuments biodeterioration and bioremediación: current condition and future perspectives*

For centuries the man has tried to stop the natural process of deterioration of the

building stones and monuments through maintenance and repairing works, using traditional techniques and materials such as mortar of lime and sand. From the second half of the 20th century, polymer and synthetic materials were introduced in conservation. In recent decades, with the application of biotechnology, the restoration proposals have changed dramatically and are supposed to be superior to traditional methods. However, in some cases, the results do not seem convincing. In the first decade of the 21st century a special attention is being paid to the production of calcite by bacteria as a process of consolidation of deteriorated stone. Cleaning of frescoes and paintings by enzymes or bacterial treatments are another issues that arouses a special attention in the restoration and conservation of monuments. Biotechnology has much to offer but must overcome the barriers that currently make it a promising technique in the field of cultural heritage conservation though, even, of difficult application to monuments. Currently, their use is restricted to test on object of manageable size, while its implementation on an industrial scale is yet to be developed.

**Keywords:** Deterioration; Biodeterioration; Consolidation; Calcite; Enzymes; Sulfate-reducing Bacteria; Biotechnology.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El hombre, desde tiempo inmemorial, ha utilizado la piedra como material de construcción o como soporte de sus obras de arte. Sin embargo, este material es efímero y los monumentos, esculturas y objetos de arte expuestos a la intemperie están sometidos, por acción de los agentes atmosféricos, a un proceso de deterioro. Este fenómeno ya era conocido en la antigüedad hasta el punto que Herodoto de Halicarnaso, en *Los Nueve Libros de la Historia*, se refería al deterioro de las pirámides, e indicaba que “el salitre revienta de tal modo sobre la superficie de la tierra, que hasta las pirámides va consumiendo”. En la antigüedad las construcciones estaban sometidas a labores de restauración para paliar los efectos del deterioro, como se puede comprobar en el Coliseo de Roma, donde existe una lápida del siglo V con una inscripción en la que se agradece al prefecto de Roma su contribución económica para su restauración, necesaria tras un terremoto.

El proceso de alteración de una roca comienza tan pronto como se extrae de la cantera y entra en contacto con los agentes atmosféricos (viento, lluvia, heladas, etc.). Esta alteración inicialmente física y química, facilita la colonización por microorganismos y plantas produciendo un biodeterioro, fenómeno que implica el proceso de destrucción de un material de interés para el hombre por organismos vivos o por productos de su metabolismo. El biodeterioro tiene una connotación negativa (destrucción de construcciones, pinturas murales, libros, objetos de madera, etc.), en oposición a la biodegradación.

La biodegradación es una descomposición orgánica por microorganismos, en la que los materiales pueden transformarse en sustancias más simples, caso de contribuir al reciclaje de nutrientes o a la eliminación de contaminantes en la naturaleza (pesticidas, plásticos, etc.).

Biodegradación y biodeterioro son términos que se confunden fácilmente y son utilizados indistintamente, tanto en la literatura científica como en el lenguaje coloquial, y que se deben utilizar en su propio contexto.

Recientemente, se está prestando atención al concepto bio-receptividad (1), que se define como "la capacidad de un material para ser colonizado por uno o varios grupos de organismos vivos sin sufrir necesariamente un biodeterioro", o como "la totalidad de las propiedades de los materiales que contribuyen al establecimiento, colonización y desarrollo de fauna y flora. Según Guillitte (2) se pueden distinguir tres tipos de bio-receptividad: primaria, que corresponde al potencial intrínseco de un material para ser colonizado; secundaria, que es la habilidad de un material alterado por el efecto de los agentes atmosféricos para ser colonizado; y terciaria, que es la colonización de un material ya alterado por el hombre, como por ejemplo, después de un tratamiento de conservación. Recientemente se ha descrito un caso de bio-receptividad terciaria en la iglesia de San Roque, Campeche, México (3). Con todo, los casos más frecuentes son los de bio-receptividad secundaria, ya que la alteración de una roca expuesta a la intemperie cuyos elementos minerales han sido movilizados por los agentes atmosféricos, facilita la colonización de microorganismos y organismos fototróficos.

Prácticamente la totalidad de grupos de microorganismos, sean quimiosintéticos, heterótrofos o fotótrofos intervienen en el deterioro de la piedra y materiales de construcción (calizas, areniscas, morteros, adobe, ladrillos), mientras que otros grupos de organismos son selectivos en la alteración de determinados tipos de materiales (basidiomicetos especializados en la degradación de la madera, bacterias celulolíticas que deterioran el papel, etc.).

Los organismos implicados en los procesos de biodeterioro de monumentos abarcan desde las bacterias, arqueas, hongos, algas, líquenes y musgos hasta las plantas superiores (4). En muchos casos aparece una colonización inicial por organismos pioneros (bacterias, algas, líquenes) que abren el camino a otros, pudiéndose observar sucesiones de distintas comunidades. Así, tenemos como ejemplos la colonización bacteriana de pinturas rupestres (5), los ataques de hongos en pinturas murales modernas (6) o monumentos (7-9), la colonización de algas en ambientes subterráneos, favorecidas por la humedad y la iluminación artificial (10, 11), o a la intemperie (12) y la destrucción de mosaicos por líquenes, musgos y plantas superiores (13). En ciertos casos estos procesos de biodeterioro pueden controlarse o evitarse con un mantenimiento adecuado y la aplicación de

estrategias preventivas. Más drástica es la utilización de biocidas, no siempre recomendada (14, 15), y cuyo empleo está determinado por la propia naturaleza del monumento u obra de arte a conservar.

En los últimos años se han estudiado una serie de casos de biodeterioro en distintos monumentos que aportaron, junto al diagnóstico del proceso, medidas de conservación (3, 16, 17). Uno de los casos más frecuentes en cuevas visitables es la colonización de cianobacterias y algas, que suelen desarrollarse en el suelo, las estalactitas y estalagmitas, y en las paredes en aquellos lugares donde existen puntos de iluminación para la visita turística, como la cueva Tito Bustillo, en Ribadesella (18) o la cueva del Tesoro, en el Rincón de la Victoria (Figura 1). En posteriores visitas a estas cuevas se observó que la eliminación de algunos de estos focos condujo a la desaparición de la comunidad fotosintética. Sin embargo, el aporte de materia orgánica proporcionada por los polisacáridos extracelulares de las cianobacterias puede dar lugar a la proliferación de comunidades de bacterias y hongos, capaces de utilizarlos como fuente de carbono, si no se eliminan adecuadamente (19). Recientemente se ha efectuado un estudio sobre la eliminación de microorganismos fotosintéticos en cuevas catalanas combinando biocidas y modificando el sistema de iluminación (20).



**Figura 1.-** Crecimiento de cianobacterias y algas sobre las paredes de la Cueva del Tesoro, Rincón de la Victoria, Málaga, debido a la iluminación.

En España se han estudiado las comunidades microbianas de las pinturas

murales de la necrópolis de Carmona habiéndose encontrado una interesante asociación entre cianobacterias y arqueas (21), mientras que en la cueva de Altamira y Tito Bustillo se demostró la presencia de acidobacterias (5). Su función metabólica en esos ecosistemas es actualmente desconocida y su estudio constituye una línea actual de investigación.

Hace treinta años se estudió el deterioro de las pinturas murales del monasterio de La Rábida (Huelva), por la contaminación ambiental de un Polo Industrial (6). Se demostró que esta contaminación afectaba a las pinturas y que la deposición de los gases y aerosoles orgánicos e inorgánicos sobre los murales, así como la filtración de agua a través de los muros condujeron a su deterioro y posterior colonización por bacterias y hongos. En dichas pinturas la presencia del hongo *Cladosporium sphaerospermum* representó un importante factor de biodeterioro. La restauración de las pinturas, el control de los parámetros ambientales, entre ellos evitar la entrada de aire del exterior, la impermeabilización de los muros exteriores y la perforación de estos e introducción de una barrera de resina epoxídica para evitar el ascenso por capilaridad del agua del subsuelo, permiten hoy contemplar los murales en todo su esplendor.

Cuando se estudia la conservación de los monumentos, uno de los aspectos más dramáticos es comprobar, bien mediante observaciones a lo largo de los años o mediante documentación fotográfica, el acelerado proceso de biodeterioro y cómo las plantas son capaces de invadir y deteriorar pirámides mayas (22), mosaicos romanos excavados y expuestos a la intemperie (23), o invadir y fracturar estatuas, debido a la presión ejercida por sus raíces (Figura 2).



**Figura 2.-** Daños producidos por plantas en una estatua de terracota de la Puerta del Perdón, Catedral de Sevilla, en el año 1990.

En la ciudad romana de Itálica, España, tenemos ejemplos de mosaicos

exhumados en 1912, que tras su descubrimiento se encontraban en buen estado de conservación, y que en 75 años habían desaparecido completamente, debido a la ausencia de mantenimiento y protección (Figura 3). La acción destructiva de las plantas vasculares puede observarse en cualquier edificio histórico o monumento carente de mantenimiento y limpieza y es particularmente importante en climas tropicales. Su invasión representa la etapa final del proceso de biodeterioro y conduce a la larga a su ruina total. Este tipo de biodeterioro es común en todos los monumentos y países.



**Figura 3.-** Mosaico del Pasillo de la Casa de Neptuno, Itálica. Descubierta en 1912 (izquierda), y aspecto en 1987 (derecha).

## **2. CONTROL DEL DETERIORO**

Durante siglos se ha intentado detener el proceso natural de destrucción de la piedra mediante obras de mantenimiento y reparación, usando técnicas y materiales tradicionales en siglos pasados como los morteros de cal y arena y, a partir de la segunda mitad del siglo XX, mediante materiales poliméricos y sintéticos. Mientras que este tipo de reparaciones encuentran buena acogida en los casos de deterioro por efecto de los agentes atmosféricos, en los casos de biodeterioro el problema es mucho más complicado, ya que requiere una previa, y efectiva, eliminación del agente biológico que causa el problema. Desgraciadamente ello no suele ser así en la mayoría de los casos, y los arquitectos y conservadores habitualmente no tienen en cuenta ni toman medidas adecuadas para controlar el biodeterioro. Algunos ejemplos dan buena prueba de ello, como en los casos de la ciudad romana de Baelo Claudia (24) o la iglesia de San Roque en Campeche, México (3).

Desde tiempo inmemorial se ha utilizado la lechada de cal para consolidar la superficie de la piedra debido a que el hidróxido cálcico se carbonata fácilmente en presencia del dióxido de carbono atmosférico originando la formación de calcita. La lechada conduce a la formación de una capa superficial de cristales de calcita, de espesor micrométrico, que se considera confiere una protección o consolidación insuficiente, ya que no penetra profundamente en la piedra deteriorada. Sin embargo, en las últimas décadas ha sido frecuente la utilización de polímeros sintéticos como consolidantes y protectores de la piedra y de pinturas murales, pero estos compuestos orgánicos se descomponen por su exposición a los agentes atmosféricos y también pueden ser utilizados por microorganismos como fuentes de carbono.

En el último tercio del siglo XX se incrementó el uso de polímeros sintéticos como consolidantes. Entre ellos destaca el frecuente empleo de la resina acrílica Paraloid B72. En 1996 Ariño y Saiz-Jimenez (24) detectaron que los capiteles de columnas de la ciudad romana de Baelo Claudia, consolidados con resina acrílica, mostraban un crecimiento endolítico de líquenes. En efecto, en la superficie de la capa de resina aplicada a los capiteles estucados aparecían estructuras liquénicas, que emergían al exterior destruyendo la resina. La observación al microscopio electrónico de barrido mostró claramente tales evidencias.

Por otra parte, Kigawa et al. (25) comprobaron que los hongos aislados del interior de túmulos japoneses del siglo VII y IX eran capaces de crecer sobre muestras de Paraloid B72, mientras que Capitelli et al. (26) mostraron que los mármoles de la catedral de Milán, tratados en 1972 con resinas acrílicas, presentaban un ennegrecimiento atribuible a la colonización por hongos dematiáceos, entre los que destacaban *Cladosporium* spp. y levaduras negras. El envejecimiento natural del polímero por exposición a los agentes atmosféricos puede facilitar su posterior colonización y utilización como fuente de carbono por los microorganismos (27).

En los últimos años, con el desarrollo de la biotecnología, las propuestas de restauración han cambiado drásticamente y se suponen superiores a los métodos tradicionales. Sin embargo, en algunos casos los resultados no parecen convencer a los especialistas en el tema. Así, a finales del siglo XX y en primera década del XXI, se ha prestado una especial atención a la producción de calcita por bacterias en relación con un supuesto proceso de consolidación de la piedra deteriorada. La precipitación de calcita era un proceso común en bacterias del suelo cultivadas en el laboratorio en un medio de acetato cálcico como fuente de carbono (28). Le Métayer-Levrel et al. (29) consideraron que este proceso de biomineralización de la calcita era de interés para la consolidación de los materiales pétreos. Estos autores utilizaron *Bacillus cereus* para el tratamiento de consolidación, mientras que De Muyneck et al. (30) emplearon *Bacillus sphaericus* en la consolidación de

cinco calizas utilizadas en monumentos franceses y belgas. A tal fin, sumergieron durante 24 horas diferentes probetas en un medio de cultivo donde se inoculó previamente la bacteria y se incubó durante 24 horas. Después las probetas se secaron con papel de filtro y se sumergieron nuevamente, durante cuatro días, en un medio con urea y cloruro cálcico, que los autores denominaron medio de biodeposición. La profundidad de la biodeposición dependió de la porosidad de la piedra, y aquellas con macroporos presentaron una mayor deposición de calcita y resistencia al ensayo de congelación-descongelación y de resistencia a las sales. Obviamente este ensayo tiene difícil aplicación en el campo real.

Rodríguez-Navarro et al. (31) consideraron que los *Bacillus* no eran adecuados para este tipo de tratamiento debido a una serie de inconvenientes, entre los que destacaban una inefectiva consolidación debida a la deposición superficial de calcita, así como a la formación de biopelículas que taponaban los poros o de endosporas que pueden germinar de forma incontrolada en condiciones favorables. Estos autores propusieron como alternativa el empleo de *Myxococcus xanthus*, que produce cristales de calcita y vaterita en el sistema poroso de la piedra, haciéndola más resistente a los test mecánicos (sonicación) y más resistente a los ataques ácidos. La deposición de calcita ocurre en el laboratorio entre los primeros cinco y diez días. Por otra parte, esta bacteria no completa su ciclo biológico en cultivo y la falta de humedad en la piedra conduce a su muerte, lo que evita posteriores crecimientos indeseables. Sin embargo, estos y otros experimentos en el laboratorio tienen difícil extrapolación a la consolidación de paramentos monumentales por su gran extensión y parecen restringidos a pequeñas piezas más manejables (esculturas, objetos en piedra).

Recientemente, Daskalaki et al. (32) propusieron el uso de especies de *Pseudomonas*, *Pantoea* y *Cupriavidus* como candidatas para la bioconsolidación de materiales pétreos. El experimento resultó ambiguo, ya que utilizaban probetas de mármol directamente extraído de la cantera y es conocida la escasa porosidad de este material. Los autores reconocieron la deposición de calcita y vaterita biogénicas sobre la superficie del mármol utilizando una modificación del método de Boquet et al. (28), conocido por favorecer de forma prácticamente universal la formación de calcita por bacterias.

Otra de las recientes innovaciones biotecnológicas es el empleo de enzimas para la limpieza de pinturas murales y eliminación de pátinas de suciedad en la superficie de los monumentos. Se suelen emplear lipasas, proteasas, etc. Estas enzimas se han mostrado efectivas en la eliminación de materiales orgánicos habitualmente utilizados en la consolidación y restauración de pinturas (colas animales y caseína), pero tienen la desventaja de su deterioro con el tiempo debido al envejecimiento y pérdida de sus propiedades, junto a, en otros casos, la utilización por microorganismos de las proteínas como fuentes nutritivas. Ello da



lugar al deterioro de las pinturas y la necesidad de la eliminación de las proteínas por sus efectos bien nocivos o antiestéticos.

Beutel et al. (33) propusieron un método efectivo para eliminar de forma controlada las capas de caseína deteriorada de la superficie de pinturas murales. La caseína se utiliza para consolidar las pinturas, pero a lo largo del tiempo, esta se vuelve dura y termina por despegarse de la superficie pictórica. Así, en los frescos medievales de dos iglesias alemanas se encontraron capas de caseína aplicadas en los últimos 60 años para consolidar los pigmentos y evitar su caída. Estos frescos se encontraban en un alarmante estado de deterioro debido al envejecimiento de la proteína. Los autores aplicaron Alcalase 2.5 DX L, conocida por su efecto proteolítico, inmovilizada en una membrana de celulosa y observaron una digestión proteolítica controlada, procediendo a la eliminación de los restos de caseína mediante lavado a través de una membrana de celulosa, en un proceso de 30 minutos de duración. Los métodos habituales de eliminación de la caseína incluyen la remoción mecánica y utilización de solventes orgánicos y el método propuesto por Beutel et al. (33) competía ventajosamente y parecía más controlable.

Ranalli et al. (34) combinaron el empleo de bacterias y enzimas en la restauración de un fresco muy deteriorado en Pisa, a fin de eliminar la cola animal usada en su consolidación. El procedimiento consistió en la aplicación de *Pseudomonas stutzeri*, siendo el método más efectivo la utilización de una capa de algodón empapada con una suspensión de bacterias sobre la superficie del fresco, durante un periodo de 8-12 horas frente a otras aplicación mediante spray o pincel. Sin embargo, la completa eliminación de la cola dependió del grosor de la capa y, en los casos en que esta no resultó totalmente efectiva, se llevó a cabo una etapa final que implicaba la aplicación de enzimas: proteasa y colagenasa, con lo que se consiguió la completa eliminación de la cola. El coste del proceso, comparado con los métodos tradicionales, resultó mucho menor.

Valentini et al. (12) presentaron un nuevo procedimiento de limpieza biológica para eliminar la pátina biológica de la piedra, consistente en el uso de glucosa oxidasa capaz de producir in situ peróxido de hidrógeno (agente de limpieza con propiedades oxidantes). El éxito dependió de la porosidad de la piedra y de la profundidad de la pátina. La validación del método, que resultó ventajoso, se efectuó frente a procedimientos tradicionales (solución tampón de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  y EDTA y tratamientos con lipasa.

Uno de los principales efectos de la contaminación atmosférica en ambientes urbanos es el ennegrecimiento de las fachadas de edificios y monumentos. Ello se debe a la formación de costras negras sulfatadas originadas por el dióxido de azufre, hidrocarburos y materia particulada (hollín) emitidos por los tubos de escape de los vehículos. En esas condiciones se forma ácido sulfúrico

que ataca la caliza formando yeso (sulfato cálcico dihidratado), que suele cristalizar englobando el hollín y toda la materia depositada sobre la superficie de los monumentos (35).

Las costras negras se pueden eliminar mediante limpieza mecánica (Figura 4) o utilizando bacterias. Los pioneros en este tipo de tratamientos fueron Atlas et al. (36) y Gauri et al. (37) quienes aplicaron *Desulfovibrio desulfuricans* a piezas de mármol y a una estatua recubierta de costras negras sulfatadas a fin de eliminar la pátina de deterioro. La estatua se sumergió en el medio de cultivo y, después de 24 horas, las costras negras se eliminaron casi completamente. Esta metodología presenta obviamente dificultades en su aplicación más extensiva a fachadas de monumentos.



**Figura 4.-** Fachada del Rectorado de la Universidad de Sevilla durante su primera limpieza mecánica hace unos 25 años. Con posterioridad se han efectuado nuevas limpiezas en los últimos años.

Tras estas investigaciones iniciales, Ranalli et al. (38) emplearon *Desulfovibrio desulfuricans* y *Desulfovibrio vulgaris* para la limpieza de mármol con costras negras sulfatadas. En vez de sumergir los objetos en el medio de cultivo,

estos autores utilizaron sepiolita como vector de las bacterias, ya que las bacterias colonizaron la sepiolita y permitieron un mejor contacto con la superficie a tratar. Tras 36 horas de tratamiento se eliminó un 80% del sulfato inicial. El inconveniente de este método fue el tiempo requerido para la colonización efectiva de la sepiolita (de diez a catorce días) y que el sulfuro de hidrógeno producido reaccionaba con el hierro del medio de cultivo formando precipitados de sulfuro de hierro. Posteriormente, Capitelli et al. (39) utilizaron *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* para la limpieza de costras negras, demostrando que se eliminaba un 98% de sulfato en 45 horas de tratamiento y evitando la precipitación de sulfuro de hierro al utilizar un medio de cultivo sin este elemento. Capitelli et al. (40) compararon la efectividad de una limpieza química con EDTA frente a la biológica en un altoprelieve de la catedral de Milán. Estos autores comprobaron que la limpieza con *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* fue más efectiva que la realizada con EDTA.

Gioventù et al. (41) investigaron la eficiencia de diferentes tratamientos para la eliminación de costras negras sulfatadas. Junto al tratamiento biológico con *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* ensayaron la limpieza con láser y la química con carbonato amónico en diferentes tipos de materiales de la catedral de Florencia: mármol, serpentina y marga. Los resultados obtenidos demostraron que la limpieza con láser no fue particularmente eficiente, ya que no eliminó completamente las costras. El tratamiento químico dejaba también algunas costras sin eliminar, incluso después de varias aplicaciones y resultó ser el menos controlable de los métodos empleados. El método biológico además de ser el más efectivo tenía la ventaja adicional de que el calcio liberado en la disolución del yeso reaccionaba con dióxido de carbono producido por la bacteria formando calcita, por lo que tenía al mismo tiempo un efecto consolidante.

Más recientemente, Troiano et al. (42) combinaron eficientemente la bacteria sulfato-reductora utilizada habitualmente en anteriores trabajos (38-41) con un pretratamiento con un detergente no-iónico (Tween 20) para eliminar las costras negras sulfatadas de una estatua del Cementerio Monumental de Milán. Los dos tratamientos conjuntos produjeron una reducción del 70% en el tiempo total necesario para la limpieza con respecto al tratamiento biológico individual (Figura 5). Por último, también se ensayó la limpieza biotecnológica en dos estatuas del Castillo del Buen Consejo en Trento, Italia, seguida de un posterior tratamiento con el biocida Biotin N con óptimos resultados. El objetivo fue eliminar las costras negras sulfatadas así como la colonización biológica existente (bacterias, cianobacterias, algas y hongos) que teñían las estatuas con diversos colores verde, verde oscuro y negro (43).



**Figura 5.-** Monumento funerario realizado por Lina Arpesani en 1921 en memoria de 'Neera', la poetisa Anna Zuccari, antes (izquierda) y después (derecha) de la limpieza biológica. Fotos cortesía de la Dra. Francesca Cappitelli, Universidad de los Estudios de Milán, y de la empresa Micro4You que proporcionó las bacterias usadas en la limpieza de la estatua.

No solo el sulfato, sino también el nitrato, se puede eliminar mediante tratamiento biológico. Alfano et al. (44) ensayaron conjuntamente, y por separado, un tratamiento con *Pseudomonas pseudoalcaligenes* y *Desulfovibrio vulgaris* para la eliminación de sulfatos y nitratos. En 24 horas este procedimiento eliminó el 55% del nitrato y el 85% de los depósitos de sulfato. Bosch Roig et al. (45) demostraron que una aplicación de 90 minutos de *Pseudomonas stutzeri* sobre agar proporcionaba una limpieza efectiva de eflorescencias insolubles de nitratos depositadas sobre la superficie de una pintura mural en Valencia, con una reducción del 92% del nitrato.

Por otra parte, no solo las bacterias sulfato-reductoras resultan efectivas en la eliminación de costras negras sulfatadas. Las costras representan también una fuente de azufre para las cianobacterias, que lo utilizan para la síntesis de proteínas y de la vaina. La carencia de azufre en un medio de cultivo produce cambios ultraestructurales notables en las cianobacterias (46, 47). Igualmente, especies de *Bacillus* y *Pseudomonas* utilizaron como fuente de carbono los hidrocarburos policíclicos aromáticos presentes en las costras negras sulfatadas (48), lo que contribuye a una detoxificación de la carga contaminante presente en las costras negras (49).

### 3. CONSIDERACIONES FINALES

La identificación de la microflora colonizadora, así como la evaluación de los daños del biodeterioro son de gran importancia ya que permiten la determinación del tipo de colonización, bio-receptividad y el diseño de intervenciones efectivas para reducir el daño y obtener una prevención a largo plazo del monumento deteriorado. Por lo tanto, para el control y la erradicación de microorganismos de las superficies de monumentos se suelen utilizar frecuentemente biocidas en un protocolo de restauración (50). Sin embargo, la aplicación de biocidas no es siempre una norma de intervención y suelen darse casos en los que su no utilización origina nuevos daños en el monumento restaurado (3).

Los biocidas son compuestos químicamente activos que pueden influir negativamente en la salud humana y en el ambiente. Cuando se utilizan biocidas los requisitos necesarios son una baja toxicidad y una elevada eficacia contra la amplia gama de microorganismos que colonizan los monumentos y objetos artísticos. Actualmente se está recomendando, como una alternativa a los biocidas convencionales, el uso de tratamientos fotocatalíticos, tales como nanocompuestos de  $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$ , para prevenir el biodeterioro y, a largo plazo, obtener una limpieza automática para el material de construcción. Sin embargo, estos productos deben cumplir una lista específica de requisitos químicos, físicos y estéticos. Por lo tanto, actualmente se están llevando a cabo ensayos aplicando tratamientos fotocatalíticos en rocas monumentales, con el fin de diseñar el tratamiento más efectivo para la eliminación de las comunidades microbianas activas y evaluar sus propiedades de limpieza (51, 52). Este procedimiento puede proporcionar estrategias eficaces para minimizar el biodeterioro y para el desarrollo de nuevos tratamientos sostenibles basados en la nanotecnología.

En el campo de la conservación del patrimonio, unos autores abogan por una conservación preventiva, mejor que actuar directamente sobre el monumento u objeto artístico en cuestión o aplicar biocidas. De esta forma, un control de las condiciones ambientales en las que se encuentra el bien a conservar se considera mucho más efectivo que un tratamiento, que puede comportar una agresión y posterior deterioro. Así, en los archivos y bibliotecas, donde en los casos de elevada humedad proliferan los hongos que atacan el papel y pergaminos, el mantener una temperatura por debajo de  $18^\circ\text{C}$  y una humedad relativa no superior al 65% impide el crecimiento de microorganismos. Claramente este control solo puede realizarse en archivos y museos o en frescos y pinturas en el interior de edificios, pero no en monumentos expuestos a la intemperie.

Otra medida es el adecuado mantenimiento, que ayuda claramente a evitar problemas, sobre todo la limpieza periódica de polvo y suciedad que se depositan sobre los objetos. A este respecto, un estudio efectuado en el Retablo Mayor de la catedral de Sevilla demostró que la acumulación de polvo y humedad conducían a

una alteración de las maderas y policromía (Figura 6). La composición del polvo fue muy heterogénea, incluyendo partículas minerales resultantes del deterioro de los materiales de construcción de las bóvedas, fragmentos de elementos decorativos (policromía y dorado), productos de la contaminación atmosférica, así como fragmentos de insectos y arácnidos, excrementos de aves, además de un significativo y elevado número de bacterias y esporas de hongos, que han sido eliminados en la reciente restauración del retablo.



**Figura 6.-** Ensayo de limpieza efectuado en el Retablo Mayor de la Catedral de Sevilla en el año 2012.

Por otra parte, en las dos últimas décadas se han publicado una serie de investigaciones proponiendo la utilización de bacterias y enzimas para limpieza y consolidación de bienes culturales. Mientras que los ensayos presentados, a escala reducida, tanto en el laboratorio como in situ, parecen ser prometedores, la aplicación real puede ser compleja por las grandes superficies a tratar, el volumen de líquido a utilizar, el periodo de aplicación necesario, etc. y, de hecho, la eliminación de costras negras sulfatadas en monumentos, a escala industrial, suele seguir efectuándose mediante limpieza mecánica o con limpieza láser en pequeños objetos o estatuas.

La transferencia del laboratorio al campo cuenta con grandes inconvenientes, particularmente en los casos de consolidación con calcita procedente de bacterias. En estos casos es dudosa la capacidad de penetración en el sistema poroso y que la calcita cristalice y consolide en el interior de la piedra. Se considera que en la mayoría de los casos se produce una bioprecipitación

superficial o en poros cercanos a la superficie. Los trabajos publicados no suelen presentar datos sobre la aplicación de ensayos normalizados de análisis de resistencia de materiales en probetas consolidadas por bioprecipitación y solo en algunos casos se indica que las probetas son más resistentes a la sonicación o que la calcita de origen biogénico es más insoluble que la calcita producida inorgánicamente, argumentándose que se debe a la incorporación de moléculas orgánicas producidas durante el metabolismo de las bacterias (53).

La biotecnología tiene mucho que ofrecer pero debe superar las barreras que actualmente la convierten en una técnica prometedora en el campo de la conservación del patrimonio aunque resulta de difícil aplicación a casos reales con grandes extensiones de fachadas. Su empleo se efectúa en ensayos u objetos de dimensiones abarcables, mientras que su aplicación a escala industrial está aún por desarrollar.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por el proyecto Consolider, TCP CSD2007-00058. Se agradece al Cabildo Catedral de Sevilla y a la empresa Ágora las facilidades para el estudio del Retablo Mayor.

## 6. REFERENCIAS

1. Miller, A.Z., Sanmartín, P., Pereira-Pardo, L., Dionísio, A., Saiz-Jimenez, C., Macedo, M.F., Prieto, B. (2012) Bioreceptivity of building stones: a review. *Sci. Total Environ.* 426: 1-12.
2. Guillitte, O. (1995) Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies. *Sci. Total Environ.* 167: 215-220.
3. Jurado V., Miller, A.Z., Cuezva, S., Fernandez-Cortes, A., Benavente, D., Rogerio-Candelera, M.A., Reyes, J., Cañaveras, J.C., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C. (2013) Recolonization of mortars by endolithic organisms: a case of tertiary bioreceptivity on the walls of San Roque Church in Campeche (Mexico). *Constr. Build. Mater.* (en prensa).
4. Saiz-Jimenez, C. (2001) The biodeterioration of building materials. En: J. Stoecker II (ed.), *A Practical Manual on Microbiologically Influenced Corrosion*, vol. 2. NACE, Houston, pp. 4.1-4.20.
5. Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Piñar, G., Lubitz, W., Rolleke, S. (2002) Altamira cave paleolithic paintings harbour partly unknown bacterial communities. *FEMS Microbiol. Lett.* 211: 7-11.
6. Sáiz-Jiménez, C. (1982) Causas del deterioro de los murales de Daniel Vázquez Díaz, Monasterio de Santa María de la Rábida, Huelva. *Mundo Científ.* 18: 1007-1011.
7. De la Torre, M.A., Gomez-Alarcon, G., Melgarejo, P., Saiz-Jimenez, C. 1991. Fungi in weathered sandstone from Salamanca cathedral, Spain. *Sci. Total Environ.* 107: 159-168.
8. De la Torre, M.A., Gomez-Alarcon, G., Vizcaíno, C., García, M.T. (1993) Biochemical mechanisms of stone alteration carried out by filamentous fungi living in monuments. *Biogeochemistry* 19: 129-147.
9. Gómez-Alarcón, G., Muñoz, M., Ariño, X., Ortega-Calvo, J.J., Saiz-Jimenez C. (1995) Microbial activity in weathered sandstones: the case of Carrascosa del Campo church. *Sci. Total Environ.* 167: 249-254.
10. Ariño, X., Hernandez-Marine, M., Saiz-Jimenez, C. (1997) Colonization of Roman tombs by calcifying cyanobacteria. *Phycologia* 36: 366-373.
11. Saiz-Jimenez, C. (2012) Microbiological and environmental issues in show caves. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 2453-2464.

12. Valentini, F., Diamanti, A., Palleschi, G. (2010) New bio-cleaning strategies on porous building materials affected by biodeterioration event. *Appl. Surf. Sci.* 256: 6550-6563.
13. Saiz-Jimenez, C. (1994) Biodeterioration of stone in historic buildings and monuments. En: G.C. Llewellyn, W.W. Dashek, C.E. O'Rear (eds.), *Biodeterioration Research 4: Mycotoxins, Wood Decay, Plant Stress, Biocorrosion, and General Biodeterioration*, Plenum, New York, pp. 587-603.
14. Bastian, F., Jurado, V., Novakova, A., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C. (2010) The microbiology of Lascaux Cave. *Microbiology* 156: 644-652.
15. Martin-Sanchez, P.M., Nováková, A., Bastian, F., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C. (2012) Use of biocides for the control of fungal outbreaks in subterranean environments: The case of the Lascaux Cave in France. *Environ. Sci. Technol.* 46: 3762-3770.
16. Saiz-Jimenez, C., Cuezva, S., Jurado, V., Fernandez-Cortes, A., Porca, E., Benavente, D., Cañaveras, J.C., Sanchez-Moral, S. (2011). Paleolithic art in peril: Policy and science collide at Altamira Cave. *Science* 334: 42-43.
17. Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C. *Écologie Microbienne de la Grotte de Lascaux*. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC. ISBN: 978-84-694-7852-3.
18. Saiz-Jimenez, C. (1999) Biogeochemistry of weathering processes in monuments. *Geomicrobiol. J.* 16: 27-37.
19. Saiz-Jimenez, C. (2010) Painted Materials. In: R. Mitchell, C.J. McNamara, (eds.), *Cultural Heritage Microbiology*. ASM Press, Washington, DC pp. 3-13.
20. Akatova, E., Roldan, M., Hernandez-Mariné, M., Gonzalez, J.M., Saiz-Jimenez, C. (2009) On the efficiency of biocides and cleaning treatments in restoration works of subterranean environments. En: *Science and Cultural Heritage in the Mediterranean Area*. Regione Siciliana, Palermo, pp. 317-322.
21. Piñar, G., Saiz-Jimenez, C., Shabereiter-Gurtner, C., Blanco-Varela, M.T., Lubitz, W., Rölleke, S. (2001) Archaeal communities in two disparate deteriorated ancient wall paintings: detection, identification and temporal monitoring by DGGE. *FEMS Microbiol. Ecol.* 37: 45-54.
22. Garcia de Miguel, J.M., Sanchez-Castillo, L. Ortega-Calvo, J.J., Gil, J.A., Saiz-Jimenez, C. (1995) Deterioration of building materials from the Great Jaguar Pyramid at Tikal, Guatemala. *Build. Environ.* 30: 591-598.
23. Saiz-Jimenez, C. (1990) The mosaics of Italica. *Eur. Cult. Herit. Newsl. Res.* 4: 34-38.
24. Ariño, X., Saiz-Jimenez, C. (1996) Lichen deterioration of consolidants used in the conservation of stone monuments. *The Lichenologist* 28: 391-394.
25. Kigawa, R., Hayakawa, N., Yamamoto, N., Kawanobe, W., Sano, C., Aoki, S. (2005) Evaluation of mould resistance of various synthetic resins used in conservation of historic sites. *Hozon Kagaku* 44: 149-156.
26. Cappitelli, F., Nosanchuk, J.D., Casadevall, A., Toniolo, L., Brusetti, L., Florio, S., Principi, P., Borin, S., Sorlini, C. (2007) Synthetic consolidants attacked by melanin-producing fungi: Case study of the biodeterioration of Milan (Italy) cathedral marble treated with acrylics. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 271-277.
27. Cappitelli, F., Sorlini, C. (2008) Microorganisms attack synthetic polymers in items representing our cultural heritage. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 564-569.
28. Boquet, E., Boronat, A., Ramos-Cormenzana, A. (1973) Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature* 246: 527-529.
29. Le Métayer-Levrel, G., Castanier, S., Oriol, G., Loubière, J.F., Perthusot, J.P. (1999) Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony. *Sediment. Geol.* 126: 25-34.
30. De Muynk, W., Leuridan, S., Van Loo, D., Verbeken, K., Cnudde, V., De Belie, N., Verstraete, W. (2011) Influence of pore structure on the effectiveness of a biogenic carbonate surface treatment for limestone conservation. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 6808-6820.
31. Rodriguez-Navarro, C., Rodriguez-Gallego, M., Chekroun, K.B., Gonzalez-Muñoz, M.T. (2003) Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2182-2193.
32. Daskalakis, M.I., Magoulas, A., Kotoulas, G., Catsikis, I., Bakolas, A., Karageorgis, A.P., Mavridou, A., Doulia, D., Rigas, F. (2013) *Pseudomonas*, *Pantoea* and *Cupriavidus* induce calcium carbonate precipitation for biorestitution of ornamental stone. *J. Appl. Microbiol.* 115: 409-423.



33. Beutel, S., Klein, K., Knobbe, G., Königfeld, P., Petersen, K., Ulber, R., Scheper, T. (2002) Controlled enzymatic removal of damaging casein layers on medieval wall paintings. *Biotechnol Bioeng.* 80: 13-21.
34. Ranalli, G., Alfano, G., Belli, C., Lustrato, G., Colombini, M.P., Bonaduce, I., Zanardini, E., Abbruscato, P., Cappitelli, F., Sorlini, C. (2005) Biotechnology applied to cultural heritage: biorestitution of frescoes using viable bacterial cells and enzymes. *J. Appl. Microbiol.* 98: 73-83.
35. Saiz-Jimenez, C. (2003) Organic pollutants in the built environment and their effect on the microorganisms. En: P. Brimblecombe (ed.) *The Effects of Air Pollution on the Built Environment.* Air Pollution Reviews vol. 2, Imperial College Press, London, pp. 183-225.
36. Atlas, R.M., Chowdhury, A.N., Gauri, K.L. (1988) Microbial calcification of gypsum-rock and sulfated marble. *Stud. Conserv.* 33: 149-153.
37. Gauri, L.K., Parks, L., Jaynes, J., Atlas, R. (1992) Removal of sulphated crust from marble using sulphate-reducing bacteria. En: R.G.M. Webster (ed.), *Stone Cleaning and the Nature, Soiling and Decay Mechanisms of Stone.* Donhead, London, pp. 160-165.
38. Ranalli, G., Chiavarini, M., Guidetti, V., Marsala, F., Matteini, M., Zanardini, E., Sorlini, C. (1997) The use of microorganisms for the removal of sulphates on artistic stoneworks. *Int. Biodeter. Biodegr.* 40: 255-261.
39. Cappitelli, F., Zanardini, E., Ranalli, G., Mello, E., Daffonchio, D., Sorlini, C. (2006) Improved methodology for bioremoval of black crusts on historical stone artworks by use of sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3733-3737.
40. Cappitelli, F., Toniolo, L., Sansonetti, A., Gulotta, D., Ranalli, G., Zanardini, E., Sorlini, C. (2007) Advantages of using microbial technology over traditional chemical technology in removal of black crusts from stone surfaces of historical monuments. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 671-675.
41. Gioventù, E., Lorenzi, P.F., Villa, F., Sorlini, C., Rizzi, M., Cagnini, A., Griffo, A., Cappitelli, F. (2011) Comparing the bioremoval of black crusts on colored artistic lithotypes of the Cathedral of Florence with chemical and laser treatment. *Int. Biodeter. Biodegr.* 65: 832-839.
42. Troiano, F., Gulotta, D., Balloi, A., Polo, A., Toniolo, L., Lombardi, E., Daffonchio, D. Sorlini, C., Cappitelli, F. (2013) Successful combination of chemical and biological treatments for the cleaning of stone artworks. *Int. Biodeter. Biodegr.* 85: 294-304.
43. Polo A., Cappitelli F., Brusetti L., Principi P., Villa F., Giacomucci L., Ranalli G., Sorlini C. (2010) Feasibility of removing surface deposits on stone using biological and chemical remediation methods. *Microb. Ecol.* 60: 1-14.
44. Alfano, G., Lustrato, G., Belli, C., Zanardini, E., Cappitelli, F., Mello, E., Sorlini, C., Ranalli, G. (2011) The bioremoval of nitrate and sulfate alterations on artistic stonework: The case-study of Matera Cathedral after six years from the treatment. *Int. Biodeter. Biodegr.* 65: 1004-1011.
45. Bosch Roig, P., Regidor Ros, J.L., Montes Estellés, R. (2013) Biocleaning of nitrate alterations on wall paintings by *Pseudomonas stutzeri*. *Int. Biodeter. Biodegr.* 84: 266-274.
46. Ortega-Calvo, J.J., Ariño, X., Stal, L., Saiz-Jimenez, C. 1994. Cyanobacterial sulfate accumulation from a historic building black crust. *Geomicrobiol. J.* 12: 15-22.
47. Ariño, X., Ortega-Calvo, J.J., Hernandez-Marine, M., Saiz-Jimenez, C. (1995) Effect of sulphur starvation on the morphology and ultrastructure of the cyanobacterium *Gloeotheca* sp. PCC 6909. *Arch. Microbiol.* 16: 447-453.
48. Ortega-Calvo, J.J., Saiz-Jimenez, C. (1997) Microbial degradation of phenanthrene in two European cathedrals. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22: 95-101.
49. Saiz-Jimenez, C. (1997) Biodeterioration vs biodegradation: the role of microorganisms in the removal of pollutants deposited on to historic buildings. *Int. Biodeter. Biodegr.* 40: 225-232.
50. Blazquez, A.B., Lorenzo, J., Flores, M., Gómez-Alarcón, G. (2000) Evaluation of the effect of some biocides against organisms isolated from historic monuments. *Aerobiologia* 16: 423-428.
51. Pinho, L., Mosquera, M.J. (2011) Titania-silica nanocomposite photocatalysts with application in stone self-cleaning. *J. Phys. Chem. C* 115: 22851-22862.
52. Pinho, L., Mosquera, M.J. (2013) Photocatalytic activity of TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> nanocomposites applied to buildings: Influence of particle size and loading. *Appl. Catal. B-Environ.* 134-135: 205-221.

53. Webster, A., May, E. (2006) Bioremediation of weathered-building stone surfaces. *Trends Biotechnol.* 24: 255-260.