

Bioconsolidación de material óseo *ex situ* no fosilizado de cronología pleistocénica mediante carbonatogénesis bacteriana

Grado de Conservación y Restauración de Bienes Culturales

Universidad de Sevilla

Autor: Alejandro Velázquez Tello

Curso: 2019/2020



Trabajo Fin de Grado

Grado de Conservación y Restauración de Bienes Culturales
Universidad de Sevilla

Curso:2019/2020

Autor: Alejandro Velázquez Tello

Tutor: Julio Romero Noguera

Contenido

1. Glosario de abreviaturas.....	1
2. Objetivos y justificación	2
3. Introducción	3
3.1. Formación y degradación del hueso	3
3.2. Consolidación	5
3.2.1. Evolución histórica de los consolidantes	7
3.3. Biomineralización: Carbonatogénesis bacteriana.....	13
3.4. Estudios de seguimiento y técnicas analíticas	16
3.4.1. Medición del pH	16
3.4.2. Estudio microbiológico.....	17
3.4.3. Microscopio digital.....	18
3.4.4. Colorimetría.....	18
3.4.5. <i>Peeling Tape Test o Scotch Tape</i>	19
3.4.6. MEB o SEM, DRX y FTIR	19
3.4.7. Resistencia a la perforación (DRMS).....	21
4. Metodología.....	22
4.1. Selección de muestras	22
4.2. Técnica analítica y estudios de seguimiento.....	24
4.2.1. <i>Peeling Tape Test o Scotch Tape</i>	24
4.2.1. Medición del pH	26
4.3. Bioconsolidación	26

5. Resultados y discusión.....	27
5.1. Pesada.....	27
5.2. Peeling Tape	28
5.3. Medición de pH	29
5.4. Microscopio digital.....	29
5.5. Discusión de los resultados.....	31
6. Conclusiones y perspectivas.....	33
7. Listado de imágenes.....	34
8. Bibliografía.....	37

1. Glosario de abreviaturas

- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **DIN:** Instituto alemán para la Normalización
- **DRMS:** *Drilling Resistance Measurement System*
- **Et al.:** y otros
- **DRX:** Difracción de rayos X
- **EVA:** Acetato de polivinilo
- **FTIR:** Espectrofotómetro por transformada de Fourier
- **g:** Gramos
- **HR:** Humedad Relativa
- **M.a.:** Millones de años
- **MEC:** Matriz Extracelular
- **mm:** Milímetro
- **mM:** Milimolar
- **PEG:** Polietilenglicol
- **PVAc:** Acetato de polivinilo
- **SEM/MEB:** Microscopio electrónico de barrido
- **UV:** Ultravioleta

2. Objetivos y justificación

Este Trabajo de Fin de Grado se desarrolla por la necesidad de buscar nuevos tratamientos de consolidación para mejorar el estado de conservación en el que se suele encontrar el patrimonio óseo y evitar las distintas alteraciones derivadas de los tratamientos consolidantes más utilizados hoy en día. Por ello, se pretende comprobar la eficacia de la bioconsolidación por la acción de bacterias carbonatogénicas de material óseo arqueológico no fosilizado.

Para ello se procede a:

- Estudiar la génesis del material óseo, así como los factores de deterioro que provocan su descohesión.
- Determinar las propiedades correctas de un producto consolidante.
- Analizar los distintos consolidantes que fueron y son empleados dentro del mundo de la Conservación y Restauración de huesos.
- Investigar sobre la carbonatogénesis bacteriana y su aplicación.
- Profundizar en las principales técnicas de análisis empleadas para el estudio de la eficacia de la consolidación.
- Establecer una metodología para ensayar la bioconsolidación sobre cinco muestras de huesos.
- Caracterizar los fragmentos mediante una documentación básica, una técnica analítica y un estudio de seguimiento.
- Discutir los resultados tras la consolidación y desarrollar las conclusiones del procedimiento.

3. Introducción

Cuando se hace referencia al término “patrimonio”, no se suelen tener en cuenta los bienes arqueológicos óseos. Estos son uno de los principales testigos de nuestro pasado, como prueba importante de la evolución de la vida en nuestro planeta. En numerosas ocasiones, la investigación y la herencia al futuro de estas piezas no sería posible sin los procedimientos pertinentes de conservación y restauración.

3.1. Formación y degradación del hueso

El hueso es un material rígido y resistente debido a un proceso de mineralización conocido como osificación. Posee con una composición orgánica e inorgánica compleja y variable según su estado de conservación. La parte orgánica suele ocupar un 20%-30% del total -esencialmente colágeno y otras proteínas- mientras que la parte mineral, un 60%-70%. Esta última está formada por las células osteoblastos que generan fosfatos de calcio asociados con carbonatos y fluoruros. La estructura química es denominada como hidroxapatita y conforma el tejido óseo proporcionándole la resistencia mecánica (Encinas Romero 2009: 19). Este mineral -y otros en menor cantidad como el magnesio- se depositan por cristalización durante el proceso de calcificación o mineralización formando la matriz extracelular (MEC). Los osteoblastos quedan inmersos en ésta, generando las laminillas del tejido óseo. La osificación no es homogénea, sino que da lugar a zonas donde el espacio entre estas láminas es diferente. En función de estos espacios, el hueso se clasifica en compacto o esponjoso (Fig. 1):

- El tejido compacto o hueso cortical constituye la diáfisis de los huesos largos y la parte externa. La separación de las laminillas es ínfima, lo que le proporciona una importante resistencia.

- El tejido esponjoso está compuesto por láminas intersticiales conocidas como trabéculas. Los espacios que dejan las trabéculas es donde se deposita la médula roja, cuya función es fabricar las células de la sangre.

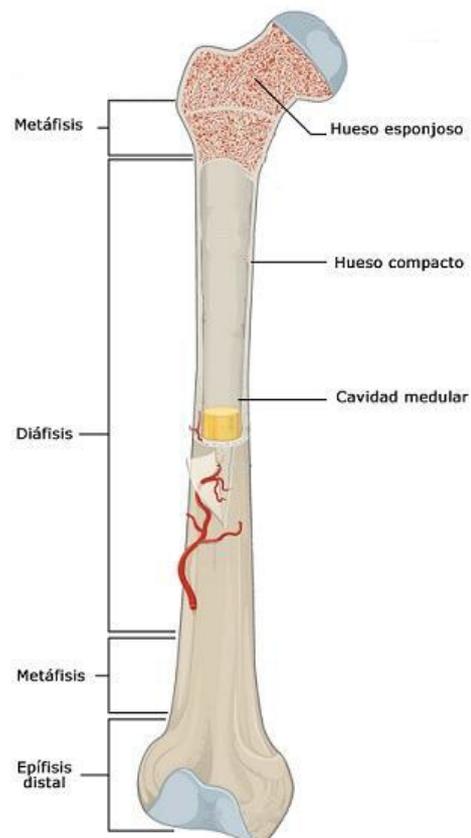


Figura 1. Ilustración esquemática de división principal del tejido óseo.

La variedad de tejido óseo genera diferentes tipos de huesos, como son hueso corto, hueso plano y hueso largo. Este último a su vez se divide en la diáfisis -parte cilíndrica-, epífisis- extremos del hueso- y la metáfisis, entre estos dos anteriores.

Este patrimonio está sometido a una gran variedad de factores de deterioro que generan cambios irreversibles, tanto a niveles físicos como químicos. La conservación de esta materia no dependerá únicamente del tiempo que haya estado enterrado, sino también del ambiente antes y después del enterramiento. Un hueso depositado sobre el terreno ha podido sufrir alteraciones debido a la exposición a la radiación UV, a la acción erosionante del viento o de corrientes de agua. Puede dañarse mediante agentes bióticos, debilitando su estructura y provocando cambios físicos y químicos. Tras su enterramiento, los restos óseos pasan a formar parte de un contexto subterráneo, donde la preservación dependerá de las características del suelo. En esta nueva ubicación, el hueso puede padecer diversas alteraciones, como la pérdida de colágeno, el ataque biológico o la lixiviación mineral (North, Balonis, Kakoulli 2016: 147).

Cuando la granulometría del sedimento es de gran tamaño, los restos más pequeños y frágiles se pierden, mientras que, si el grano es pequeño y el suelo está compactado, se conservarán los huesos más reducidos, pero supondrá la destrucción de las piezas grandes. Si el sustrato es ácido -el pH es bajo- se desencadenará un deterioro de la parte mineral del hueso que provocará la pérdida de resistencia y rigidez e implicará el detrimento del colágeno. Sin embargo, en un contexto alcalino, la parte orgánica se hidroliza y se vuelve sensible al ataque biológico. Los grupos oxidrilos reaccionan con la hidroxiapatita derivando en hidróxido de calcio que, con la presencia del oxígeno, se convierte en carbonato cálcico. La porosidad del propio resto óseo conllevará cambios cromáticos de la cortical heredados de los compuestos del suelo.

Relacionado con la porosidad y su propiedad higroscópica, las sales solubles -sulfatos de calcio, cloruros de sodio o nitratos de sodio- y su recristalización supondrán un punto fuerte de deterioro, ya que acarrearán roturas y pulverulencia. Estas alteraciones podrán ser potenciadas como consecuencia de la alta sensibilidad a los cambios de humedad, conllevando a la deformación por la anisotropía del hueso (García-Fortes, Flos-Travieso, 2008: 100; Bouzas, Laborde, 2013: 271). En ocasiones, la parte orgánica es sustituida por minerales, dando lugar a la fosilización. Debido a la propia composición de la parte mineral del hueso, esta litificación suele ser por carbonatación. Tras la extracción, el material puede sufrir cambios físicos como consecuencia de un nuevo ambiente con distinta temperatura y humedad, lo que conlleva a la recristalización de sales solubles y/o a la dilatación o contracción del hueso por su adaptación al medio. Además, en el proceso de excavación, el hueso

puede degradarse por acciones antrópicas como golpes, extracciones imprudentes o problemas en el transporte. Como resultado de todo ello, el hueso puede encontrarse enmascarado por el sedimento y concreciones, descohesionado o pulverulento, con roturas y grietas, así como erosionado y con manchas cromáticas (Padilla, 2015: 10).

3.2. Consolidación

Una vez depositado en un laboratorio, es el equipo de conservación y restauración quien procede a un análisis previo de la pieza y de sus alteraciones para acometer la intervención siguiendo unos criterios actuales aceptados internacionalmente (ICCOM, 1984; ECCO, 2002). Uno de los tratamientos más comunes y necesarios que se aplican en este ámbito es el de la consolidación. Durante la intervención, se le devuelve o aporta propiedades estructurales al hueso que permiten su manipulación, investigación, exposición y/o almacenaje. La impregnación a través del sistema poroso se hace mediante un producto consolidante en estado líquido, que, por una reacción química o evaporación del disolvente, restablece la cohesión fortaleciendo la zona, rellenando poros y pequeñas grietas (López-Polín 2012: 122). Estos productos consolidantes deben tener las siguientes propiedades (Mora, 1984: 216):

a) Fluidéz y penetración:

Deben tener buena fluidéz y penetrabilidad para facilitar su aplicación, permitiendo la consolidación profunda, además de su distribución dentro de la estructura porosa. Esta dependerá de factores como la viscosidad, la capacidad de impregnación, el tiempo de retención, la fuerza de cohesión y adhesión, el tamaño de las partículas del consolidante y su concentración, la tensión superficial, el tiempo de contacto y la temperatura y presión ambiental (Matteini y Moles, 2008: 322; López-Polín 2012: 124).

b) Permeabilidad:

Es esencial que sean impermeables al agua líquida proveniente del exterior. El consolidante no debe tapan los poros, sino sustituir la función de la sustancia estructural, como es en este caso la hidroxiapatita.

c) Poder de adhesión:

Deben tener suficiente poder de adhesión, para unir las partículas que se han descohesionado (Linares y Carrascosa, 2016:50).

d) Concentración alta:

La concentración de los productos dependerá del esfuerzo que se va a exigir al consolidante, lo cual está en función del peso y tamaño de los huesos, su manipulación, y de las condiciones ambientales de humedad y temperatura a las que se va a encontrar expuesto.

e) Resistencia mecánica:

El producto consolidante debe ser capaz de soportar esfuerzos mecánicos con el fin de absorber las tensiones derivadas de la adaptación al medio o propias del transporte, accidentes o manipulación. Sin embargo, no debe ser ni muy rígido ni flexible. Si es demasiado rígido, ofrece poca resistencia a golpes mecánicos; y si es muy flexible, no se asegura la conservación estructural y morfológica (Linares y Carrascosa, 2016:50).

f) Propiedades ópticas:

El hueso no debe mostrar cambios cromáticos por el empleo de un consolidante. Esto se consigue empleando productos incoloros, transparente y que penetren lo suficiente para evitar brillos (Linares y Carrascosa, 2016:50).

g) Resistencia biológica:

Los componentes no deben actuar como fuente potencial de alimento para organismos como hongos y algas. Dentro de lo posible, deben tener propiedades fungicidas para prevenir una posible infección.

h) Toxicidad:

Es preferible que el dispersante del consolidante no sea tóxico, como sí sucede con hidrocarburos aromáticos o cetonas. Para evitar la intoxicación, en el momento de la excavación, se pueden emplear consolidantes diluidos en agua o alcohol de manera preventiva. Seguidamente, en el laboratorio, donde sí se podría proceder con la protección adecuada del personal, se consolidaría en el disolvente necesario.

3.2.1. Evolución histórica de los consolidantes empleados para la intervención en material óseo

Existe una gran variedad de productos empleados para la consolidación de material óseo. Aunque muchos de ellos ya no se utilizan, es fácil encontrar huesos intervenidos con estos consolidantes en los almacenes de los museos arqueológicos. De manera tradicional, los productos utilizados para la consolidación a comienzos del siglo XX eran adhesivos naturales como la cera, la resina dammar, la goma laca, la cola animal y otros adhesivos proteicos. Generalmente muestran una escasa penetración en la estructura ósea y un progresivo oscurecimiento debido a la atracción del polvo y/o la oxidación. Con el tiempo, pueden cambiar su volumen y generar una tracción sobre la superficie (Johnson, 1994: 224):

- La cera es un material producto de la esterificación de un ácido graso saturado con un alcohol con un solo grupo -OH. Es débil a la temperatura y a la contaminación atmosférica. Reblandece con facilidad a partir de los 35°C y se vuelve quebradiza por debajo de los 5°C. Si esta no se encuentra perfectamente endurecida, atrae las partículas de polvo y elementos contaminantes en el aire, conllevando a una oxidación y oscurecimiento del objeto consolidado (Bermúdez, 2016: 67)
- Las resinas triterpénicas como el dammar sufren una oxidación que deriva en un amarilleo y aumento de la fragilidad y opacidad. La exposición a la luz ultravioleta, a elementos oxidantes como el ozono y/o a una fuente de calor desencadena la oxidación de los dobles enlaces de las cadenas hidrocarbonadas que la componen (Romero-Noguera, 2007:132).
- La goma laca es una resina de origen animal sensible a la humedad, y a la radiación UV, acarreando una alteración física similar a la cera y de fácil oxidación (Fig. 2).



Figura 2. Cambios cromáticos generados por el oscurecimiento de la goma laca.

- La cola animal es un producto proteínico que puede verse alterada por cambios de tipo físico, químico y biológico. Es un material sensible a la humedad relativa (HR), favoreciendo las contracciones y dilataciones del consolidante y causando la formación de grietas, roturas o deslaminado sobre el sustrato intervenido. Además, es fácilmente alterable por los cambios de pH, que supondrían su desnaturalización por la rotura de los enlaces péptidos entre los aminoácidos. A nivel microbiológico, las colas animales en un ambiente con HR alta, son una gran fuente de alimento para hongos y bacterias (Bailach, 2011: 21).

A partir de 1930, se comenzaron a introducir nuevos materiales orgánicos sintéticos. La proliferación de su empleo se debe esencialmente a su fácil manipulación y rápida actuación. Los primeros consolidantes fueron las resinas nitrocelulósicas y vinílicas.

- El nitrato de celulosa es un adhesivo que contiene polímeros obtenidos a través de la esterificación de la celulosa con ácido nítrico. Para la consolidación, se emplea a bajas concentraciones diluida en alcoholes o cetonas. Su inestabilidad se debe nuevamente a la oxidación frente a la luz ultravioleta, que provoca la pérdida de adhesión, el amarilleo y craquelado. Sin embargo, este adhesivo se sigue utilizando gracias a su fácil obtención (Muñoz, Osca y Gironés, 2014: 214).
- Las resinas vinílicas son materiales orgánicos compuesto por vinilo, un grupo funcional también denominado eteno. Estos grupos suelen unirse formando polímeros o se pueden combinar con otros grupos funcionales dando lugar a productos más conocidos, como el acetato de polivinilo (PVAc), el acetato de vinilo (EVA) o el alcohol polivinílico (Muñoz, Osca y Gironés, 2014: 314). Tanto el PVAc como el EVA son polímeros de gran peso molecular, lo que afecta a la solubilidad, la penetración y la transición vítrea. De esta manera, estas resinas plastifican en superficie los huesos por su escasa penetración y reblandecen con el calor, atrayendo el polvo. El adhesivo polivinílico más empleado en el ámbito de la consolidación de huesos ha sido el conocido como "la cola de carpintero". Es una emulsión que tiende a volverse insoluble en agua u otros disolventes. Además, puede ser especialmente ácida y tener una baja transición vítrea, favoreciendo la adhesión del polvo y cambios de volumen y ocasionado tensiones que generen alteraciones físicas en los restos óseos. Su ventaja más inmediata es el secado rápido; sin embargo, esto puede provocar una escasa penetración, aunque se disperse en concentraciones bajas en alcohol o agua (Johnson, 1994: 226).

- El PEG es un polímero orgánico sintético que puede ser fabricado con distintos grados de polimerización. Permite conjugar el secado de piezas húmedas con una consolidación simultánea sin el peligro de sufrir alteraciones derivadas de la adaptación al medio y cambios de volumen. Las desventajas que tiene este producto son los posibles cambios en la topografía de la pieza y una consolidación no inmediata que, en ocasiones, puede tardar semanas, meses o años.

Más adelante, a partir de 1970, se añadieron otros productos comunes dentro del mundo de la conservación, como las resinas acrílicas. Son polímeros orgánicos sintéticos formados por la combinación del ácido acrílico o metacrílico con un alcohol -metílico, etílico, propílico o butílico-. Las resinas acrílicas son más flexibles que la metacrílicas aunque tienen mayor tendencia al reticulado, haciéndolas más irreversibles (Muñoz, Osca y Gironés, 2014: 269). En la elección de las resinas acrílicas suelen prevalecer las ventajas de su correcto poder consolidante e hidrorrepelente, una relativa reversibilidad y fácil aplicación. Como ejemplo de estas resinas, los productos más empleados son el Acril AC-33® y el Paraloid B-72®.

- El Acril AC-33® es una dispersión coloidal sol compuesta por un copolímero de metacrilato de etilo y metilo (40%) y acrilato de etilo (60%). En distintas fuentes se indica que tiene un pH neutro (Johnson, 1994: 227) aunque otras se mencionen como un consolidante básico entre 9 y 10 (Muñoz, Osca y Gironés, 2014: 256). Una vez que la emulsión polimeriza es reversible al 90% con disolvente como acetona y/o mediante calor. Sus principales ventajas son una alta penetración que puede ser empleado sobre objetos ligeramente húmedo o seco y no repercute toxicidad alguna.
- El Paraloid B-72® es copolímero compuesto por acrilato de metilo y metacrilato de etilo. Es poco soluble en alcoholes y por ello, se suele diluir en acetona, aunque también se puede hacer en disolventes aromáticos o hidrocarburos clorados. Su extenso empleo se debe a que se aplica fácilmente y endurece rápidamente, lo que lo hace muy útil para el proceso de excavación.

A pesar de su extenso empleo, estos consolidantes pueden generar una serie de deterioros en la propia pieza. Con el tiempo, los materiales óseos sufren un proceso de alteración común en las resinas acrílicas. Son productos higroscópicos que pueden generar tensiones y contracciones provocando roturas y grietas. La exposición a la radiación ultravioleta, así como a los cambios térmicos, oxidan estas resinas (Fig. 3), perdiendo la flexibilidad propia y craquelando (Sánchez, 2015: 39).



Figura 3. Cambios cromáticos en la superficie del hueso por oxidación de Paraloid B 72. ©-

Aunque se describan como productos reversibles, esta afirmación es parcialmente contraria si se aplica sobre productos porosos, ya que siempre quedarán restos. Se ha de tener en cuenta que estos productos significan una aportación de un material con un comportamiento físico distinto al original, lo que puede provocar gradientes desiguales de dilatación, generando tensiones a nivel externo e interno.

Otro tipo de resinas que se ha empleado para la consolidación, aunque en menor medida, son los adhesivos epoxi y cianocrilatos. Las resinas epoxídicas son polímeros termoendurecibles resultado de la reacción entre una sustancia con un grupo epoxi -epiclorhidrina- con un polialcohol - bisfenol A-. Se mezclan con un producto catalizador que posibilita el endurecimiento de esta resina. Son adhesivos irreversibles químicamente, con buena resistencia al calor y a la humedad, pero frágiles a los impactos (Muñoz, Osca y Gironés, 2014: 272). Su dureza es excesiva sobre materiales anisotrópicos, pudiendo generar tensiones y, por consecuencia, fractura y grietas. De la misma manera ocurre con las resinas sintéticas de cianocrilatos. Son ésteres del ácido cianocrílico que generan su poder adhesivo tras una polimerización gracias a la humedad ambiental. Cuando esto ocurre, generan una capa poco elástica que tiende al amarilleamiento por radiación UV y al craquelado. En ambientes muy húmedos, la adhesión puede verse alterada (Muñoz, Osca y Gironés, 2014: 96).

A todas las desventajas anteriores de los consolidantes, se le añade la dificultad o el impedimento para futuras investigaciones (García-Fortes, Flos-Travieso, 2008: 160; Padilla, 2015: 15; Gallegos, 2006: 61).

El empleo de los consolidantes orgánicos cuya composición está basada en combinaciones de C, O y H, puede dificultar diferentes técnicas de análisis, como puede ser el análisis de isótopos estables e inestables, el microscopio electrónico de barrido o la recuperación del ADN. En la datación por radiocarbono, la aplicación de resinas orgánicas, ya sean naturales o sintéticas, supone una adición de carbono que falsificaría cualquier dato. Mientras que las resinas orgánicas naturales suponen dataciones más antiguas, las sintéticas conllevan a resultados más recientes. Aunque los investigadores retiren el consolidante a la hora de preparar la muestra para su estudio -poniendo en peligro la resistencia estructural de la pieza-, en este proceso el hueso sufre daños como microabrasiones o arañazos debido al empleo de disolventes con herramientas como cepillos o escalpelos, pudiendo generar una ulterior interpretación. Además, los consolidantes no son completamente reversibles en materiales porosos y quedan ocultos en su interior. A la hora de analizar posibles restos de ADN, se ha comprobado que estos productos pueden dañarlos, complicando los análisis. Los diluyentes de los consolidantes (acetona, alcohol...) son agentes abrasivos que dañan la superficie, posibilitando de nuevo interpretaciones erróneas en manos de arqueólogos o paleontólogos, además de alterar análisis de ADN e isótopos. Por otro lado, los consolidantes suelen generar capas superficiales que alteran la topografía a nivel microscópico (Fig.4) e impiden la observación de marcas o huecos de interés mediante microscopio electrónico u óptico (López-Polín 2012: 122).

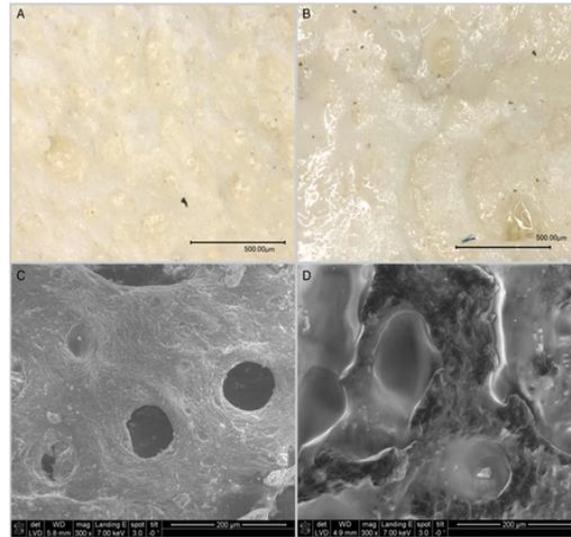


Figura 4. Visión al microscopio óptico y microfotografías SEM de muestras no tratadas (A y C) y muestras tratadas con Acril-C33®. Se observa el acabado brillante, la saturación de poros y el cambio topográfico.

En los últimos años, se han introducido consolidantes como los silico-orgánicos e inorgánicos empleados en la conservación de elementos pétreos como el silicato de etilo, el hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), o el hidróxido de bario ($\text{Ba}(\text{OH})_2$).

- El silicato de etilo es el producto resultante de una esterificación del ácido silícico con un alcohol -etanol o metanol-.

Cuando se aplica mediante impregnación, la hidrolización de este conlleva a la formación de hidróxido de silicio ($\text{Si}(\text{OH})_4$) que precipita como sustancia amorfa ligándose al material pétreo mediante enlace electroestático. Seguidamente, se deshidrata y polimeriza dando lugar al sílice, obstaculizando la penetración

del agua, pero no del vapor. Dentro de las propiedades del silicato de etilo no se incluye el poder adhesivo sino el cementante, característica que permite devolver la cohesión a las partículas más pequeñas, pero no las más grandes. En climas secos la hidrólisis se ralentiza mientras que, en climas húmedos, se acelera y puede generar halos blancos resultantes de la precipitación en superficie. Este efecto también tendrá lugar en sustratos básicos derivado de las limpiezas con productos alcalinos. Además, puede desencadenar la cristalización de sales solubles que se encuentren dentro de la estructura porosa conllevando a tensiones internas. Suele ir diluido en etanol o White Spirit incluyendo un catalizador, que permite un curado aproximado de tres meses (North, Balonis, Kakoulli 2016: 148). Se comercializa bajo el nombre de *Estel 1000*, *Estel 1200*, o *Nanoestel*.

- El agua de cal es el nombre común de una solución saturada de hidróxido de calcio con alta alcalinidad - con un pH de 9-. El carbonato cálcico se forma por la reacción con el dióxido de carbono del aire que cristaliza en el interior de los poros actuando como cementante. La principal desventaja está relacionada con su escasa penetración, pudiendo generar velos blanquecinos sobre la superficie y escasa consolidación en el interior de la pieza. Conjuntamente deben emplearse varias aplicaciones, dejando varios días para el fraguado, lo que ralentiza la consolidación.
- El hidróxido de bario es un consolidante que funciona a partir de la reacción de este con el dióxido de carbono para formar cristales insolubles de carbonato de bario. Su aplicación es denominada como el "método de bario" y consta de dos fases:
 1. El sulfato de calcio -yeso- se transforma en carbonato de calcio y sulfato de amonio con carbonato de amonio.
 2. Se aplica el hidróxido de bario, generándose la carbonatación de este al entrar en contacto con el CO₂.

Sus mayores desventajas son su toxicidad, el no ser aplicable en presencia de sales solubles como nitratos, la posibilidad de generación de velos blanquecinos y cambios cromáticos en presencia de humedad alta, así como su escasa penetración (North, Balonis, Kakoulli 2016: 148).

El objetivo de este estudio es devolver la resistencia mecánica a los tejidos óseos -esencialmente a la parte cortical- mediante la bioaportación de carbonato cálcico. Esto llevará a la remineralización del hueso a partir de un elemento de la génesis del material óseo, favoreciendo una compatibilidad absoluta.

3.3. Biomineralización: Carbonatogénesis bacteriana

La biomineralización es un proceso por el cual un ser vivo es capaz de inducir la producción de minerales. En los últimos tiempos la microbiología ha demostrado que algunas bacterias son capaces de producir minerales como carbonatos, óxidos, sulfuros o silicatos.

En esta investigación se plantea un tratamiento usado en la consolidación de material pétreo conocido como bioconsolidación mediante carbonatogénesis bacteriana. Este proceso ocurre gracias a la actuación de las bacterias carbonatogénicas como núcleos para la cristalización (Jroundi *et al.*, 2014: 3846) o producción de sustancias minerales como desechos de su actividad metabólica.

La carbonatogénesis bacteriana es un proceso de biomineralización por el cual suceden ciertas reacciones químicas en unas condiciones determinadas a cargo de unos microorganismos que conllevan a la precipitación de carbonato cálcico. Existen varias intervenciones efectivas mediante bioconsolidación en Bienes de Interés Cultural, como las acometidas en las columnas marmóreas del Patio de los Leones en la Alhambra (Tesela, 2018: 2) y en las calcarenitas del Hospital Real y la Iglesia de San Jerónimo (González-Muñoz *et al.*, 2014: 84). Tanto las calcarenitas -rocas sedimentarias detríticas carbonatadas- como el mármol -roca metamórfica a partir de caliza- tienen en común el carbonato cálcico como uno de los componentes principales. Teniendo esto en cuenta y la composición básica de un hueso -fosfato de calcio asociado con carbonato cálcico- se considera una metodología apta para el material óseo. Estas intervenciones fueron realizadas a mano de la empresa KBYO Biological (Padul, Granada), la cual ha realizado también la consolidación de las muestras de este estudio.

La producción mineral puede ocurrir de manera autótrofa o heterótrofa. En el primer caso, la bacteria puede utilizar CO₂, ya sea en gas o líquido, como fuente de carbono, y producir carbonato cálcico. Si esto sucede en ambientes ricos en calcio, se favorece la precipitación de carbonato cálcico. Por otra parte, el proceso heterótrofo puede darse activa o pasivamente. La precipitación activa es el resultado de un intercambio iónico a través de la membrana celular, mientras que en la pasiva precipita carbonato cálcico como producto de desecho en los ciclos metabólicos que realizan las bacterias para asimilar el nitrógeno. Estos metabolitos son producidos en presencia de materia orgánica y calcio y junto con la amonificación del nitrógeno bajo unas condiciones determinadas: por una reducción de nitrato o por una hidrólisis del ácido úrico mediante la acción de la enzima ureasa. Por todo ello, la carbonatogénesis va a depender principalmente de la concentración de calcio y carbonato, además del pH (Cameotra y Dakal, 2012: 81).

En intervenciones realizadas con anterioridad a las mencionadas la bacteria empleada había sido *Bacillus cereus*. Sin embargo, esta ha demostrado tres desventajas principales: son patógenas; el movimiento de las bacterias es muy escaso produciendo carbonato cálcico y un tapiz bacteriano en superficie taponando el sistema poroso (Rodríguez *et al.*, 2003: 2). Para evitar estos inconvenientes, en los ejemplos anteriores se han empleado las mixobacterias, en concreto *Myxococcus xanthus*, con la capacidad de formar carbonato cálcico en profundidad sin suponer la saturación de poros (Jimenez-Lopez *et al.*, 2007: 353). Desde el punto de vista filogenético, pertenece a la subdivisión delta de las proteobacterias en el orden *Myxobacterales* (Tabla 1). Esta bacteria aeróbica se ha seleccionado también por la posibilidad que tiene de producir minerales con diferentes morfología y composición; la facilidad de encontrarlas en las capas más superficiales del suelo ricas en materia orgánica, como podría ser en la rizosfera, limos o agua marina y que resiste valores de pH entre 5 y 9 (Rodríguez *et al.*, 2003: 15; González-Muñoz *et al.*, 2010: 36). Es un organismo procarionte no patógeno y quimioorganótrofa (Tabla 2) que puede generar carbonato cálcico de manera heterótrofa pasiva extracelularmente como resultado de su actividad metabólica mediante la amonificación.

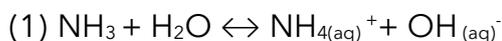
Categoría taxonomía	Taxón
Dominio	Bacterias
División	Proteobacterias
Clase	Proteobacteria Delta
Orden	<i>Myxococcales</i>
Suborden	<i>Cystobacterineae</i>
Familia	<i>Myxococcaceae</i>
Género	<i>Myxococcus</i>
Especie	<i>Myxococcus xanthus</i>

Tabla 1. Taxonomía de la bacteria *Myxococcus xanthus* (Gómez, 2009: 3)

Fuentes de energía	Donador de electrones	Fuentes de carbono
Luz: Fotótrofos	Inorgánico: Fotolitofros	Inorgánica: Autrótofos
		Orgánica: Heterótrofos
	Orgánicos: Fotoorganotrofos	Inorgánica: Autrótofos
		Orgánica: Heterótrofos
Compuestos químicos: Quimiotrofos	Inorgánico: Quimiolitotrofos	Inorgánica: Autrótofos
		Orgánica: Heterótrofos
	Orgánicos: Quimioorganotrofos	Inorgánica: Autrótofos
		Orgánica: Heterótrofos

Tabla 2. Clasificación de las bacterias según de metabolismo. En tonalidades azules se muestra la clasificación de la bacteria *Myxococcus xanthus*. Al emplear compuestos químicos como fuente de energía se cataloga como quimiotófras. Seguidamente, emplea como donador de electrones sustancias orgánicas, dando lugar al término "quimioorganotrófas". Por último, como la fuente de carbono es orgánica, se considera heterótrofas (Universidad, 2006).

En primer lugar, este proceso comienza por la desaminación por oxidación de los aminoácidos presentes en el medio nutritivo liberando NH_3 (1) por parte de la bacteria.



Como consecuencia directa, se incrementa el pH debido a la nueva presencia de amoníaco (Cameotra y Dakal, 2012: 93). Según la alcalinidad del microambiente alrededor de la bacteria, el CO_2 es transformado en HCO_3^- o CO_3^{2-} .



A continuación, a partir de la sobresaturación de iones por la formación de amoníaco y la presencia de calcio en el medio nutritivo se precipita una fase mineralógica del carbonato cálcico (Rodríguez-Navarro, 2007:1199).



La forma cristalográfica de este compuesto dependerá de las condiciones de su formación. En este caso, en el ambiente se produce una sobresaturación y un rápido incremento del pH por la desaminación por oxidación de los aminoácidos. Esto dará lugar una fase metastable polimorfa del carbonato cálcico conocida como vaterita, precedente a la calcita. Cuando la sobresaturación se reduce, tiene lugar la formación de calcita (González-Muñoz *et al.*, 2010: 40). La precipitación se produce en el propio entorno de la bacteria y directamente sobre su membrana provocando su fosilización.

La alta motilidad de deslizamiento permite que la carbonatación en profundidad y no en superficie como ocurre con la *Bacillus cereus*. Para que el metabolismo de las bacterias produzcan el mineral deseado el mineral deseado -carbonato cálcico- y no otros como sulfuros, fosfatos u oxalato, se aplica un medio comercializado bajo el nombre de MYXOSTONE M-3P® [1% vol. de hidrolizado de caseína Bacto Casitone®, 1% vol. $\text{Ca}(\text{CH}_2\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (calcio total 43.33mM), 0.2% vol $\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ (potasio total, 35.6mM; carbonato total 17.8mM), 10mM tampón de fosfato en agua desionizado (pH 8)] (Jimenez-Lopez *et al.*, 2008: 353) por la empresa KBYO Biological (Padul, Granada). Según describe González-Muñoz (González Muñoz *et al.*, 2014: 90), la aplicación de esta solución nutritiva sobre los sillares del Monasterio de San Jerónimo y la crestería de la Capilla Real de Granada acarreó un descenso de bacterias capaces de alterar la piedra por la producción de metabolitos ácidos. Esto se debe al empleo de un medio de cultivo que tiene como fuente de energía, de carbono y de nitrógeno un hidrolizado de proteínas -específicamente caseína- posibilitando únicamente el desarrollo de las bacterias capaces de metabolizar los aminoácidos.

Las ventajas principales de este método de consolidación consisten en una menor permeabilidad al agua, evitando el acceso de minerales y contaminantes diluidos en esta, manteniendo la permeabilidad y transpiración al vapor de agua, y una correcta cementación, sin alterar la topografía ni el color con buena penetración (Rodríguez *et al.*, 2003: 16; González-Muñoz *et al.*, 2010: 98). Además, se denota un posible cambio de pH hacia la alcalinidad por la producción de amoníaco, lo que, a su vez, podría actuar como antifúngico (Becerra, 2015). Las desventajas se centran en los requisitos técnicos y los posibles daños derivados de la aplicación de un medio de cultivo desencadenando la proliferación de otros microorganismos nocivos. Suele necesitarse un previo estudio bacteriano, así como un método de aplicación complejo y a manos de personal especializado. De esta manera, se trata de un producto que tiene una aplicación difícil y específica.

3.4. Estudios de seguimiento y técnicas analíticas

A continuación, se indican algunos estudios de seguimiento para la investigación de la bioconsolidación. Gracias a ellas se podrá determinar la proliferación de las bacterias carbonatogénicas una vez aplicado el medio nutritivo y con ello, predecir la eficacia de la consolidación. Debido a la situación derivada del COVID-19, solo se realizará las mediciones de pH, la observación con microscopio digital.

3.4.1. Medición del pH

La medición del pH tiene dos objetivos: en primer lugar, determinar el pH de las muestras antes de aplicar el medio nutritivo. Con ello se comprueba que este valor se encuentra entre los parámetros necesarios ya indicados -entre 5 y 9- (González-Muñoz *et al.*, 2010: 36) para el desarrollo de las bacterias. Seguidamente, la producción de carbonato cálcico durante el proceso de bioconsolidación genera amonio, una base débil. Este cambio de pH puede medirse para comprobar el proceso de carbonatogénesis bacteriana. Si la medición después de la aplicación del producto fuese más alcalina, podría relacionarse con la producción de amoníaco y carbonato cálcico. Para ello, lo idóneo sería medirlo con un pHímetro de inmersión o con uno medidor de contacto. Teniendo en cuenta la situación actual del COVID-19 que impide la disposición de estos medios, se procede la medición con tiras de pH (Fig. 5). Estas se impregnan durante dos segundos con agua que

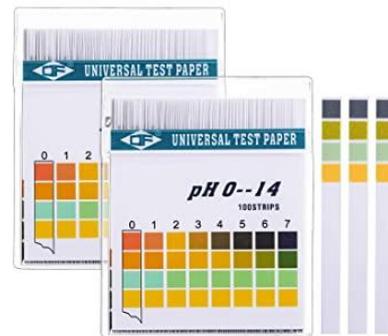


Figura 5. Tiras de medición de pH.

previamente ha estado en contacto con la muestra y pasado 10 segundos, los reactivos de color cambiarán de tonalidad según la alcalinidad o acidez del agua.

3.4.2. Estudio microbiológico

El estudio inicial de la microbiota es importante para identificar la presencia de la mixobacteria *Myxococcus xanthus*. Además, se debe determinar la existencia de otras bacterias perjudiciales para el hueso capaces de proliferar con el medio nutritivo M-3P como las sulfooxidantes, nitrificantes u esporas de hongos. Para ello, y según establece González-Muñoz (González-Muñoz *et al.*, 2014:87), se obtiene una muestra de polvo de hueso que se cultiva en distintos medios diferenciales y selectivos para identificar los microorganismos y diagnosticar el recuento de colonias bacterianas (Fig. 6). A continuación, deben aislarse y ser sembradas en el medio M-3P para conocer su proliferación en este medio nutritivo. Según el recuento de las bacterias carbonatogénicas se puede pronosticar la eficacia de la consolidación. Si el recuento fuese bajo sería necesario introducir mixobacterias a partir del inoculado con un cultivo de *Myxococcus xanthus*. Este estudio debe llevarse a cabo pasado unos meses para conocer la evolución de la población bacteriana en los huesos. Si las condiciones de proliferación son las ideales, la población de bacterias carbonatogénicas que emplea el carbono y nitrógeno para su evolución incrementará frente a aquellas que solo utilizan el carbono para su desarrollo deben disminuir. Esta situación se debe al medio M-3P, que contiene un hidrolizado de proteína provocando una ventaja de las bacterias que evolucionan por la presencia de carbono y nitrógeno ante los microorganismos que proliferan únicamente a partir de carbono.

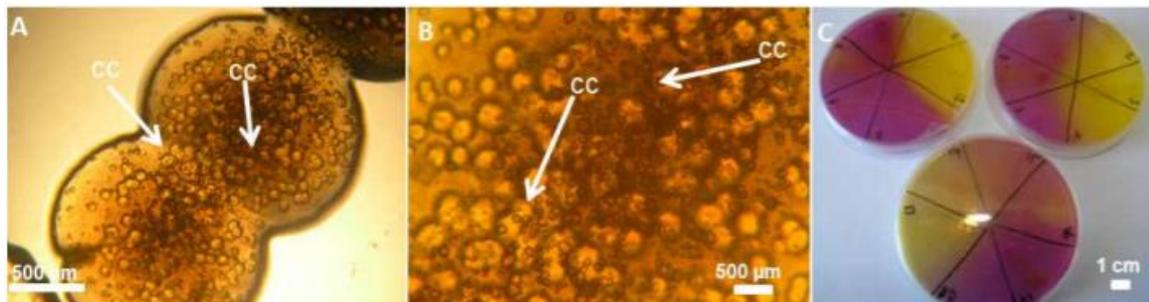


Figura 6. Resultados del cultivo bacteriano realizado sobre la crestería del Monasterio de San Jerónimo de Granada.

(A) proliferación de las colonias mixobacterianas en el cultivo.

(B) es un detalle de la donde se ha marcado con CC la formación de cristales de calcita.

(C) muestra el cambio de color por el desarrollo de bacterias productoras de ácidos en sus medios nutritivos específicos.

3.4.3. Microscopio digital

La aplicación de un medio nutritivo puede desencadenar el desarrollo de otros microorganismos visibles con un microscopio digital de 1000x aumentos. Este tipo de microscopio tiene en su interior un juego de lentes que, combinado con un zoom digital permite la visualización directa en una pantalla o monitor. Este último sistema de ampliación conlleva a que las imágenes más amplificadas no tengan tanta calidad y estén más pixeladas. Para esta ocasión, la ampliación se realizará con el microscopio digital Jiusion Digital Microscope 1000x (Fig.7).



Figura 7. Microscopio Digital Jiusion 1000x

Para el estudio de los resultados de la consolidación a partir de carbonatogénesis bacteriana hay una gran variedad de técnicas analíticas que se centran en medir el poder consolidante de esta y los posibles cambios que se hayan generado en el material. Debido a la situación del COVID-19, solo se va a realizar el *Peeling Tape*. No obstante, se indican otros análisis que se podrían realizar en futuras investigaciones

3.4.4. Colorimetría

Como se ha indicado anteriormente, el consolidante no debe conllevar a un cambio cromático en el bien intervenido. Para evaluar que esto no suceda se emplea la colorimetría, una técnica que permite definir un color de una superficie concreta. La determinación de color de la muestra se obtiene a partir de la reflectancia o remisión, que consiste en la relación entre la energía recibida por el objeto y la reflejada expresada en tanto por ciento. La medición mediante un colorímetro (Fig. 8) determina el color dentro del espectro visible mediante la caracterización de su onda. El sistema de medición de color CIElab (DIN 6174) determina el color a partir de unas coordenadas dadas a partir de los valores L - luminosidad, A- de verde a rojo, y B -de amarillo a azul-. Este análisis por imagen no se ha podido llevar a cabo a causa de la falta de medios. No obstante, cabe mencionar que la carbonatogénesis bacteriana no produce cambios cromáticos significantes en materiales pétreos (Jroundi, *et al.*, 2010: 4; Jroundi, *et al.*, 2010: 39; Jroundi, *et al.*, 2014: 3848).



Figura 8. Instrumento empleado para la medición del color

3.4.5. Peeling Tape Test o Scotch Tape

Seguidamente, para conocer el grado de consolidación del tratamiento, se procede con un sistema de análisis invasivo conocido como *Peeling Tape Test* o *Scotch Tape*. Este se presenta como un método para evaluar la degradación de una superficie (Jroundi, *et al.*, 2010: 41, Jroundi, *et al.*, 2010: 3). Se basa en la colocación de una cinta adhesiva con un tamaño determinado sobre una superficie y su posterior retirada. Este mismo proceso se realiza antes y después del tratamiento comparando así el peso o color de ambas cintas. Si ha habido un menor arrastre después de la consolidación, se entiende que el tratamiento ha funcionado. No obstante, este sistema presenta problemas de reproducibilidad, ya que la fuerza con la que se adhiere la cinta no es homogénea ni constante. Además, no todas las cintas se adhieren por igual (Chiche, 2005:190). Para su correcta realización se ha establecido el estándar ASTM D 4214-07. Este procedimiento restringe unas medidas de una misma cinta de 50 mm de largo por 13 mm de ancho. A continuación, se coloca la cinta sobre la superficie, se frota diez veces con ayuda de una goma con intención de eliminar burbujas y evitar arañosos y se retira rápidamente en un ángulo de 90°. Para que los datos sean más precisos este proceso debe repetirse en ciertos puntos de la superficie (Miloš 2012: 508).

3.4.6. Microscopía electrónica de barrido (MEB o SEM), difracción de rayos X (DRX) y espectrofotómetro de transformada de Fourier (FTIR)

Todas estas técnicas analíticas se emplean dentro del área de la carbonatogénesis bacteriana para observar el proceso de calcificación entorno a las bacterias y la fase mineralógica del carbonato cálcico -calcita, vaterita o argonita- producido.

- La microscopia electrónica de barrido permite obtener una imagen aumentada de la superficie de hasta 5.000x aumentos en tonalidades grises a partir de un barrido de electrones que rebotan hacia un sensor. Gracias a ello, se comprueba la formación de carbonato cálcico y según la forma de los cristales, qué fase ha tenido lugar (Fig. 9). Si la forma cristalográfica es romboedra se podrá determinar la formación de calcita. Sin embargo, si se observa esferulitas se identificará la creación de vaterita.

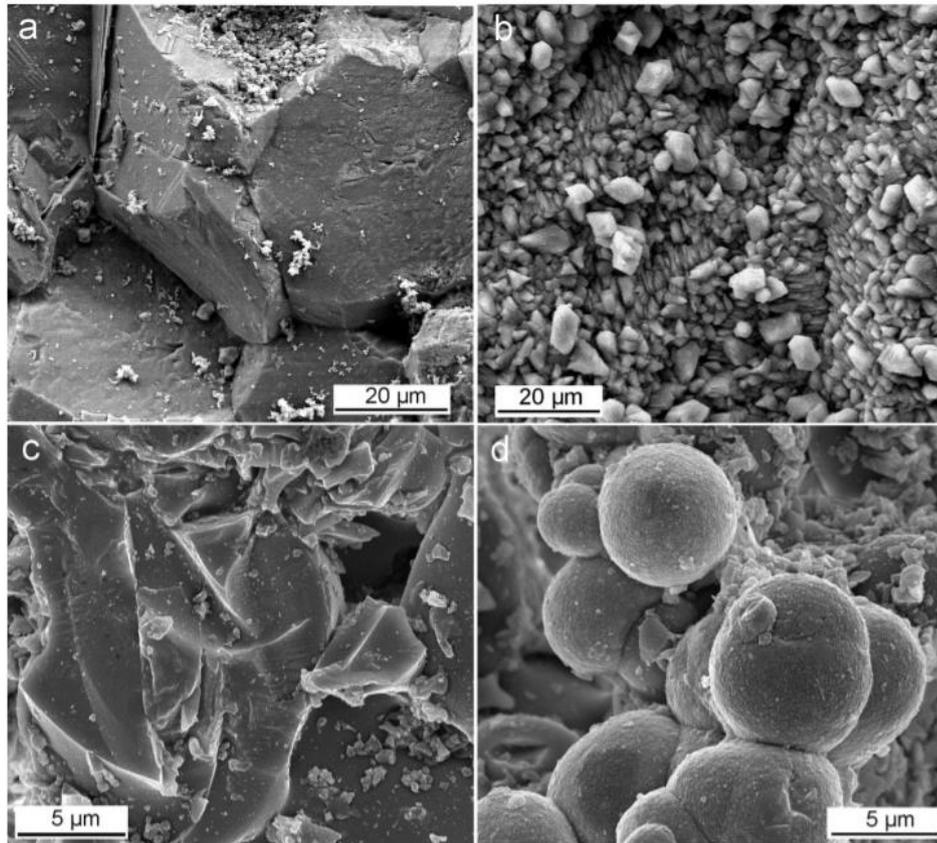


Figura 9. Resultados obtenidas con SEM de una piedra marmórea y un sustrato poroso antes y después de aplicar del medio M-3P. (a y b) Estado de la superficie del mármol antes y después de la formación de calcita. (c y d) Sustrato poroso antes y después con la formación de vaterita esférica.

- Con la difracción de rayos X se consigue determinar cualitativa y cuantitativamente las fases cristalinas de un mineral, siendo en este caso, calcita y/o vaterita, ya que los espectros de difracción son distintos (Rodríguez-Navarro, 2007:1201). Esto es posible gracias a los picos de reflexión que determinan a las distintas formaciones cristalinas (Dickinson y McGrath, 2001: 5) (Fig.10).
- La espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier se trata de un sistema que irradia infrarrojos hacia la muestra. Dependiendo de la composición de ésta, parte de la energía es absorbida y parte se transmite. Las distintas bandas de absorción de la materia permiten distinguir su composición y estructura espacial. Así, la vaterita se caracteriza por una absorción de banda de 745 y 1085 cm^{-1} y la calcita 714, 876, 1420 cm^{-1} (Fig. 10).

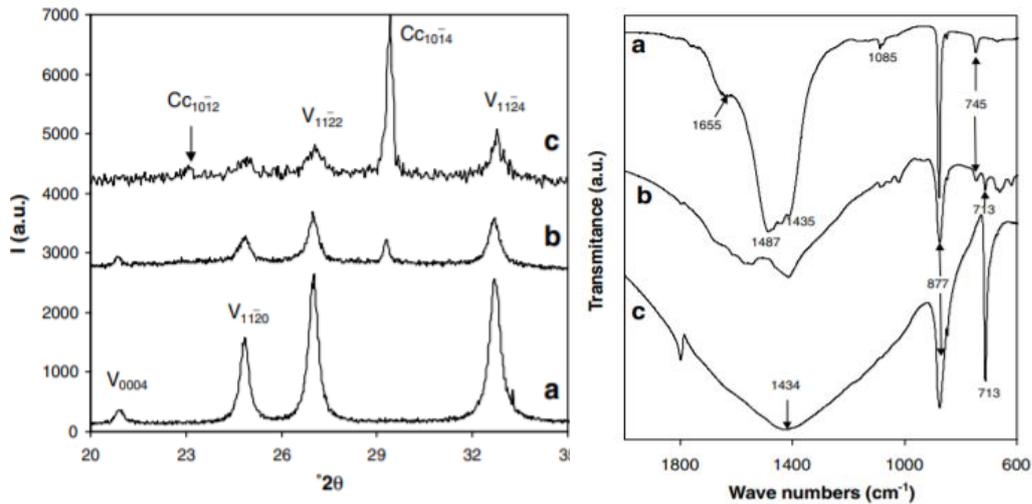


Figura 10. (Izquierda) Espectro resultante de distintas mediciones de DRX donde V indica la presencia devaterita y Cc la calcita.
 (Derecha) Espectro del FTIR donde se observa la presencia de calcita y vaterita en distintas mediciones.

3.4.7. Resistencia a la perforación (DRMS)

Sistema desarrollado para medir la resistencia de los materiales pétreos. El análisis cuantifica la fuerza necesaria para realizar un agujero de un tamaño determinado manteniendo constante la velocidad de rotación y la velocidad de avance. La velocidad de rotación se determina entre las 20 y 1000 revoluciones por minuto, mientras que la velocidad de avance trabaja en parámetros inferiores, de 1 a 80 revoluciones por minuto (Jroundi, *et al.*, 2014:3848). Este análisis permite determinar la fuerza de consolidación y la profundidad de esta actuación (Fig.11).

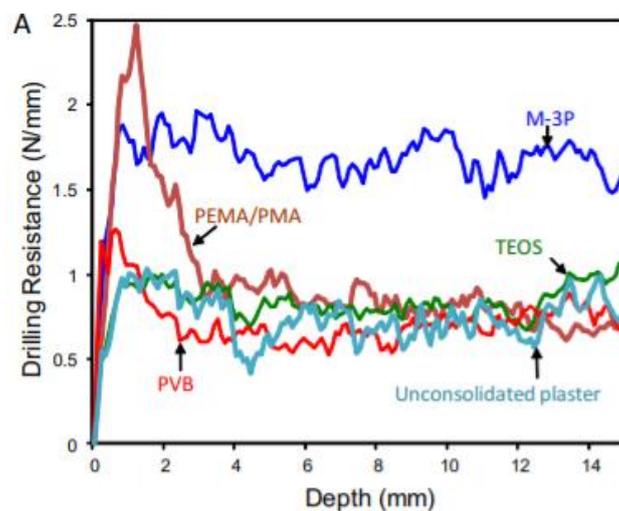


Figura 11. Gráfica resulta del DRMS donde se comparan distintos consolidantes sobre piedra. Al comienzo, los valores son altos y dependiendo del producto, a medida que la broca se introduce, la resistencia es menor. En algunos casos, la resistencia se mantiene o no según la profundidad.

4. Metodología

4.1. Selección de muestras

Como sujeto de ensayo y estudio, se han elegido tres fragmentos óseos porosos y dos compactos con intención de cubrir una de las principales características diferenciadoras de este patrimonio, su estructura. Las muestras provienen de la campaña de excavación de 2019 dentro del Proyecto General de Investigación “Presencia humana y contexto paleoecológico en la cuenca continental de Guadix-Baza. Estudio e interpretación a partir de los depósitos Plio-Pleistocénicos de Orce. Granada. España”, dirigido por la Universidad de Granada (Contreras y Dorado, 2018:15).

Las tres muestras de tejido compacto (Fig. 12) proceden del yacimiento de Venta Micena, en el municipio de Orce, Granada. Este enclave paleontológico tiene una cronología aproximada de 1,6-1,5 millones de años (M.a). correspondiente al Pleistoceno inferior español (Cañavete, 2005: 971). Este estrato se compone principalmente de 99% de calcita y 1% de cuarzo (Instituto, 2007) además de una gran representación de huesos de grandes mamíferos como *Lycaon lycaonoides* y *Canis mosbachensi*.

Los fragmentos óseos de estructura compacta (Fig. 12) fueron extraídos del yacimiento arqueológico de Fuente Nueva-3 con una cronología parecida a Venta Micena, pero ligeramente más reciente, 1,3-1,2 M.a. (Instituto, 2007).

Estos restos son ideales para el estudio, ya que han sido calificados como “no recuperables” a manos de la paleontóloga, lo que los hace de escaso interés para la investigación arqueológica, pero sí para esta. Además, presentan una superficie descohesionada a modo de pulverulencia y, concretamente, el fragmento de estructura compacta sufre un deslaminado y agrietamiento.

Estos fragmentos han sido registrados mediante fotografías, mediciones de tamaño y pesadas (Tabla 3) después de una ligera limpieza con brocha suave, una sustancia hidroalcohólica 50% v/v y un palillo de madera para eliminar las mayores concreciones. Las imágenes han sido tomadas con una cámara DSLR Nikon D5200. Las pesadas se hicieron con la balanza analítica ED153-PCE Sartorius Extend.



Figura 12. Muestras seleccionadas para la investigación. M1, M2, M3 corresponden al tejido poroso y M4, M5 al tejido compacto.

Durante el proceso de limpieza la muestra M.5 se ha fracturado en dos piezas. Esto ha sucedido como consecuencia de la retirada de pequeñas concreciones terrosas que podrían servir como sustento de la pieza. Por consiguiente, solo se limpiaron ligeramente las muestras M.4 y M.5 que mostraban mayores concreciones (Fig.13).

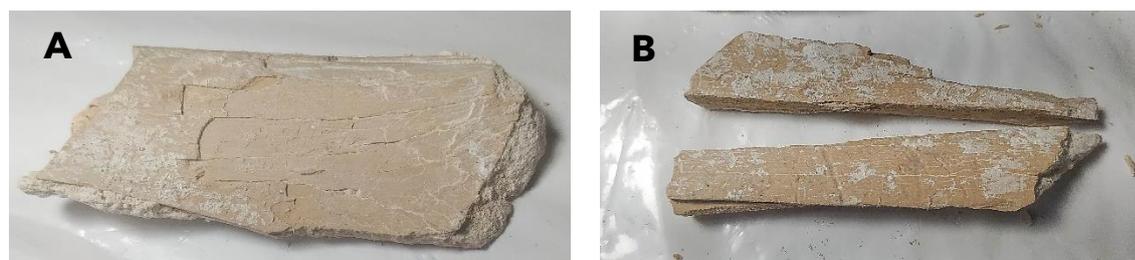


Figura 13. (A) Muestra M. 4 y (B) muestra M.5 fracturada en dos partes tras el proceso de limpieza.

N. Muestra	Tamaño en mm (Largo x ancho x grosor)	Peso antes de la consolidación	Peso tras la consolidación
M.1	26.50 x 26.50 x 18	8,915 g	8,773 g
M.2	26.50 x 29 x 16.5	3,383 g	3,559 g
M.3	33 x 18 x 17	6,437 g	6,495 g
M.4	82.5 x 32 x 15	30,543 g	32,234 g
M.5	71 x 29 x 11	22,131 g	19,182 g

Tabla 3. Medidas iniciales del tamaño y peso de cada una de las muestras antes y después de la aplicación del medio M-3P.

4.2. Técnica analítica y estudios de seguimiento

El estudio de la eficacia de la bioconsolidación se ha realizado mediante el *Peeling Tape Test* mientras que el control de la proliferación de las bacterias se ha comprobado con la medición del pH antes y después del tratamiento.

4.2.1. *Peeling Tape Test* o *Scotch Tape*

En el caso del análisis de los restos óseos, se ha adaptado el procedimiento teniendo en cuenta el tamaño de las muestras y del ancho del adhesivo según el método (Miloš 2012: 508) y se documentó mediante un microscopio digital Jiusion Digital Microscope 1000x. En primer lugar, se pegó una cinta adhesiva de doble cara sobre un papel (Fig. 14). A continuación, se cortó dicha cinta con las siguientes medidas, teniendo en cuenta que las muestras porosas son más pequeñas que las de estructura compacta:

- Muestras de estructura porosa: 10 mm por 18 mm
- Muestras de estructura compacta: 30 mm por 18 mm
- Las tiras de control serán posteriormente utilizadas para conocer el material óseo retirado durante el proceso.

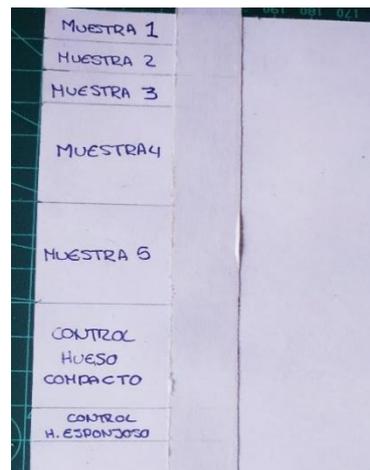


Figura 14. Cinta adhesiva adherida sobre un papel para preparar las cintas.

Seguidamente, se ha adherido un trozo de cinta por muestra presionando diez veces con ayuda de una goma y se han retirado en un ángulo de 90° (Fig. 15).

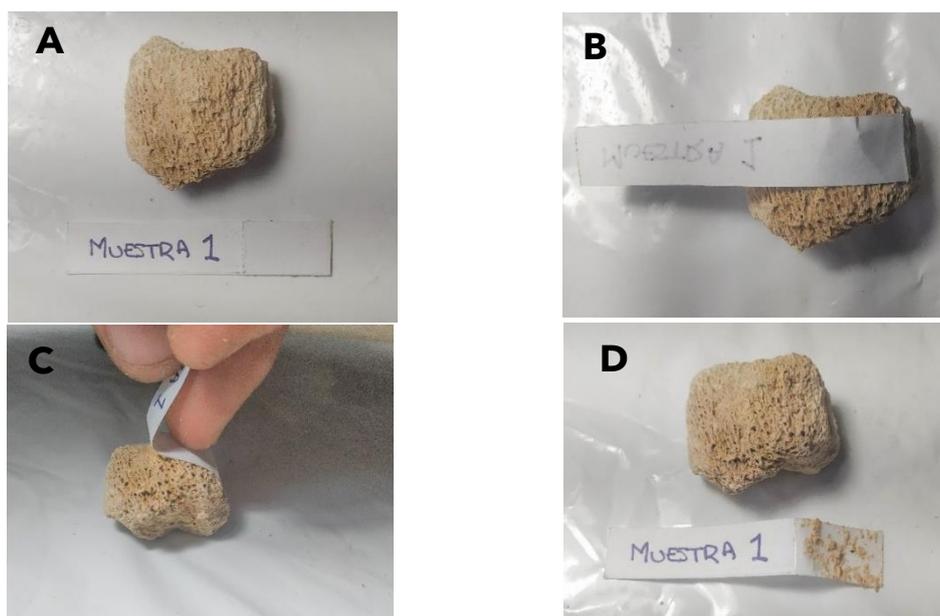


Figura 15. A y B: el fragmento sobre el cual se toma la muestra. C: levantamiento de la cinta en un ángulo de 90°. D: resultado del levantamiento.

En el arranque de la cinta adhesiva de la muestra M.4 se observa como esta ha dejado restos sobre la superficie. Asimismo, la muestra M.5. se fragmentó aún más como consecuencia de la tracción de la cinta (Fig. 16).

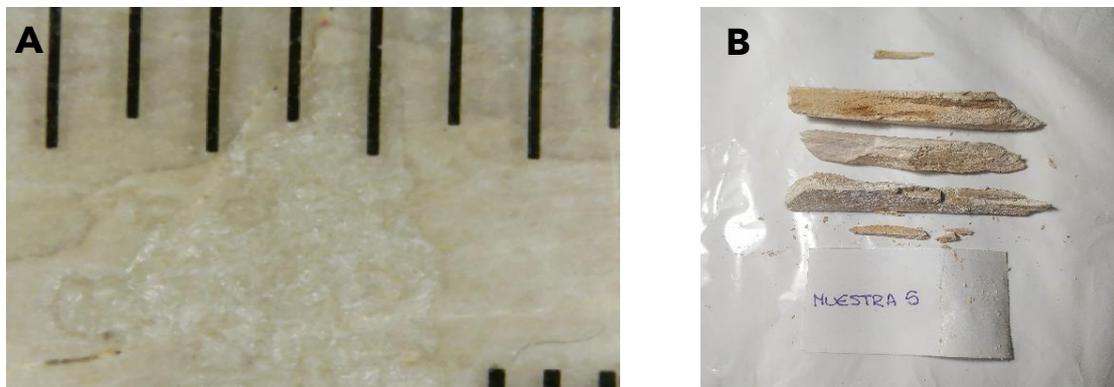


Figura 16. (A) Imagen realiza con el microscopio digital Jiusion Digital Microscope 10x del resto de adhesivo dejado sobre la muestra M.4.
 (B) Rotura de la muestra cinta durante la retirada de la cinta adhesiva.

Consecutivamente, cada cinta es almacenada dentro de una bolsa para evitar su contaminación. Para calcular la cantidad de materia retirada, se ha pesado teniendo en cuenta el peso de la bolsa y de la cinta en la balanza analítica ED153-PCE Sartorius Extend (Fig. 17). Este proceso se ha repetido antes y después de la bioconsolidación.

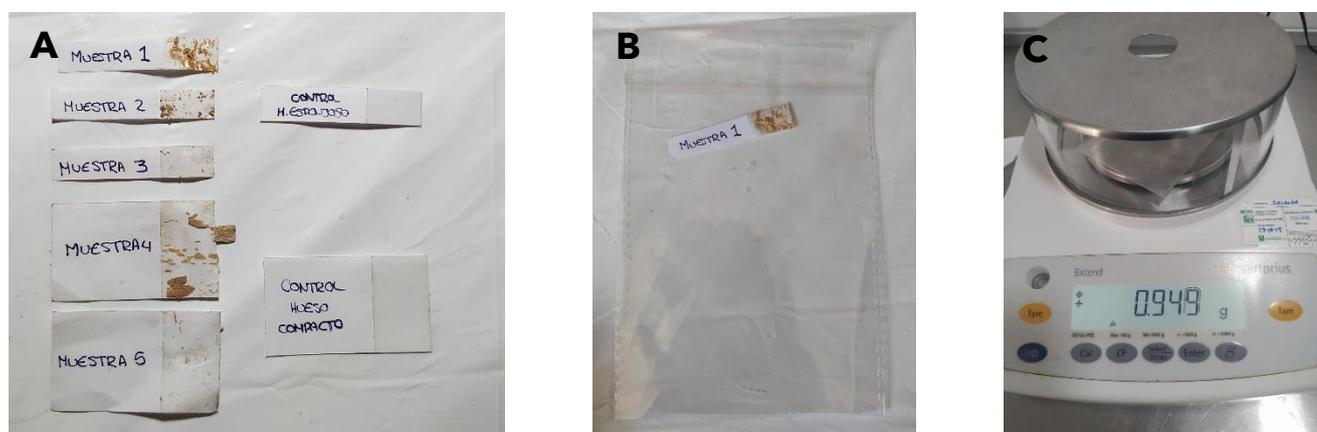


Figura 17. (A) Resultado visual del procedimiento de "Peeling tape"
 (B) Muestra del fragmento M.1 dentro de una bolsa para evitar su contaminación.
 (C) Pesado de la bolsa vacía para después calcular el peso de las muestras.

4.2.1. Medición del pH

Con un cuentagotas se ha controlado la humectación de la pieza con agua desionizada y desmineralizada -con pH 7- para poder medir el pH con las tiras. La medición se tomaba goteando las muestras hasta humedecer los reactivos de las tiras (Fig.18). Posteriormente, se ha aplicado alcohol sobre la zona humectada para acelerar la velocidad de evaporación.



Figura 18. (A) Instrumental utilizado para la medición.

(B) Resultado visual de la reacción de las tiras al contacto con las piezas.

4.3. **Bioconsolidación**

Primero debe hacerse un estudio previo determinando las colonias bacterianas. Permite controlar tanto la presencia de mixobacterias que generen carbonato cálcico, como la proliferación y desarrollo de bacterias que pueden generar ácidos ante la presencia de fuentes fermentables de carbono como bacterias sulfoxidantes y nitrificantes (González-Muñoz *et al.*, 2014:87). Si no se detectase presencia de bacterias, estas podrían ser inoculadas en los huesos. Debido a la situación actual ocasionada por el COVID-19, se ha procedido directamente a la aplicación del medio de cultivo en el laboratorio de la empresa KBYO Biological (Padul, Granada). El sustrato nutritivo ha sido aplicado hasta la saturación cada 12 horas durante 7 días (Fig. 19). Para que tenga lugar el metabolismo bacteriano y así la producción de carbonato cálcico, ha sido necesario mantener las piezas en unas condiciones de 50%-80% humedad relativa, a una temperatura entre 18°C y 22°C, con una concentración de CO₂ estable y evitando la exposición a cualquier fuente de luz (KBYO Biological: 2; Jroundi, 2014: 3846).



Figura 19. Se ha aplicado el medio nutritivo sobre un secante para recoger el sobrante.

5. Resultados y discusión

5.1. Pesada

Los resultados de la variación del peso de las muestras se presentan en la siguiente tabla (Tabla 4). El incremento de este parámetro en los fragmentos óseos M.2, M.3 y M.4 puede deberse a la creación de carbonato cálcico dentro de su estructura. Sin embargo, este suceso podría estar también vinculado a un remanente de humedad del medio nutritivo aplicado. Para confirmar este hecho sería necesario la realización de nuevas pesadas y un análisis por microscopía electrónica de barrido que permitiese estudiar la topografía de los restos óseos. El descenso del peso de las muestras M.1 y M.5 se relaciona con su manipulación durante la investigación. Ya se observó como la pieza M.5 se había fracturado y astillado durante la limpieza y el análisis de *Peeling Tape*. No obstante, la pérdida de materia de la muestra M.1 se vincula a su alto estado de descohesión como se comprueba con el análisis de *Peeling Tape*, donde adquiere el mayor valor de arrastre en las muestras porosas (Tabla 5). Tras el transporte de las muestras al laboratorio de la empresa KBYO Biological (Padul, Granada) y su regreso se ha observado como la bolsa donde se almacena el fragmento M.1 ha acumulado polvo de hueso procedente de la erosión de la muestra (Fig. 20).



Figura 20. Polvo de hueso en el interior de la bolsa.

N. Muestra	Peso absoluto antes de la consolidación	Peso absoluto tras la consolidación	Variación porcentual
M.1	8,915 g	8,773 g	-1,59%
M.2	3,383 g	3,559 g	5,20%
M.3	6,437 g	6,495 g	0,90%
M.4	30,543 g	32,234 g	5,53%
M.5	22,131 g	19,182 g	-13,325%

Tabla 4. Variación porcentual antes y después del proceso de consolidación. Este valor muestra porcentualmente la cantidad de material perdido (valor negativo) o ganado (valor positivo) tras el tratamiento.

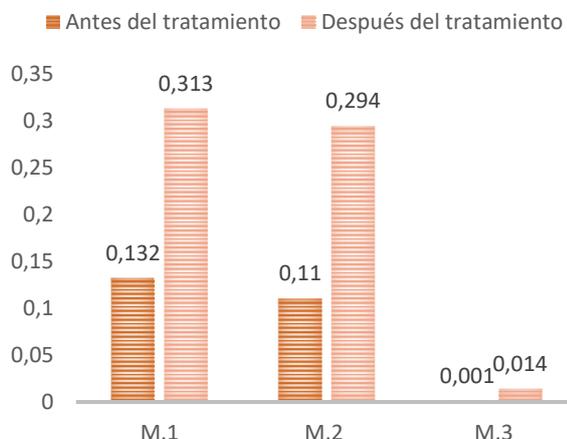
5.2. Peeling Tape

El tratamiento con el medio nutricional M-3P no ha supuesto en ninguno caso la reducción del peso de las tiras respecto a las de control. Para la medición, se ha restado el peso de la bolsa con una cinta no contaminada, "bolsa + cinta" en la tabla 5, a la pesada de cada una de las muestras, "Peso con la bolsa y cinta". De esta manera, se obtiene el peso absoluto de la materia arrastrada por la cinta. A continuación, se muestra el resultado de las pesadas realizadas con la balanza analítica (Tabla 5, Fig. 21).

N. Cinta adhesiva	Peso con la bolsa y cinta		Peso absoluto		Variación porcentual del peso absoluto
	Muestra de control	Muestras tras el tratamiento	Muestra de control	Muestras tras el tratamiento	
Muestras de tejido poroso					-
Bolsa + cinta	0,830 g	-	-	-	-
Muestra 1	0,952 g	1,143 g	0,132 g	0,313 g	137%
Muestra 2	0,940 g	1,124 g	0,110 g	0,294 g	167%
Muestra 3	0,831 g	0,845 g	0,001 g	0,014 g	1300%
Muestras de tejido compacto					
Bolsa + cinta	0,841 g	-	-	-	-
Muestra 4	1,188 g	1,266 g	0,347 g	0,425 g	22%
Muestra 5	0,844 g	1,239 g	0,223 g	0,398 g	78%

Tabla 5. Resultado de las pesadas del Peeling Tape Test. La variación porcentual indica un incremento o descenso de peso entre las muestras antes y después de la bioconsolidación.

MUESTRAS DE TEJIDO POROSO



MUESTRAS DE TEJIDO COMPACTO

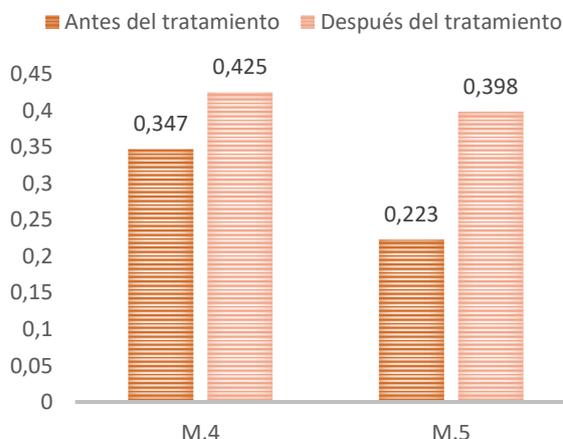


Figura 21. Representación gráfica de los valores absolutos del peso de las tiras antes y después de la bioconsolidación.

La variación porcentual del peso absoluto de las tiras indica un incremento en las pesadas, especialmente en las muestras de tejido poroso. Esta situación se vincula a dos posibles desencadenantes:

- La humectación de las piezas hasta saturación durante 7 días ha podido derivar en tensiones estructurales por cambios dimensionales conllevando a un aumento de la descohesión.
- El proceso de transporte de las piezas hasta el laboratorio y su posterior regreso ha podido erosionar la superficie de las muestras a pesar de haber tomado las medidas pertinentes para enviar este material tan frágil.

5.3. Medición de pH

En la siguiente tabla (Tabla 6) se muestran las medidas de pH tomadas antes y después de la intervención. Un posible cambio en la alcalinidad de la muestra podría haber justificado la creación de carbonato cálcico ya que el proceso de creación de este mineral está acompañado del proceso de amonificación del nitrógeno. Sin embargo, según los resultados, no se muestra variación entre las distintas medidas.

N. Muestra	pH antes de la bioconsolidación	pH después de la bioconsolidación
M.1	7,5	7,5
M.2	8	8
M.3	7	7
M.4	8	8
M.5	8	8

Tabla 6. Mediciones de pH sobre la muestra antes y después de la bioconsolidación. Como no se observa cambio en estos valores, se puede deducir que no ha habido una bioconsolidación.

5.4. Microscopio digital

Tras la recepción de las muestras desde el laboratorio, visualmente no se observó ningún cambio. No obstante, pasada las dos semanas se detectaron manchas amarillas y grises en superficie de las muestras M.2 y M.3. Para una correcta identificación, se procedió con el microscopio digital empleando distintos aumentos.

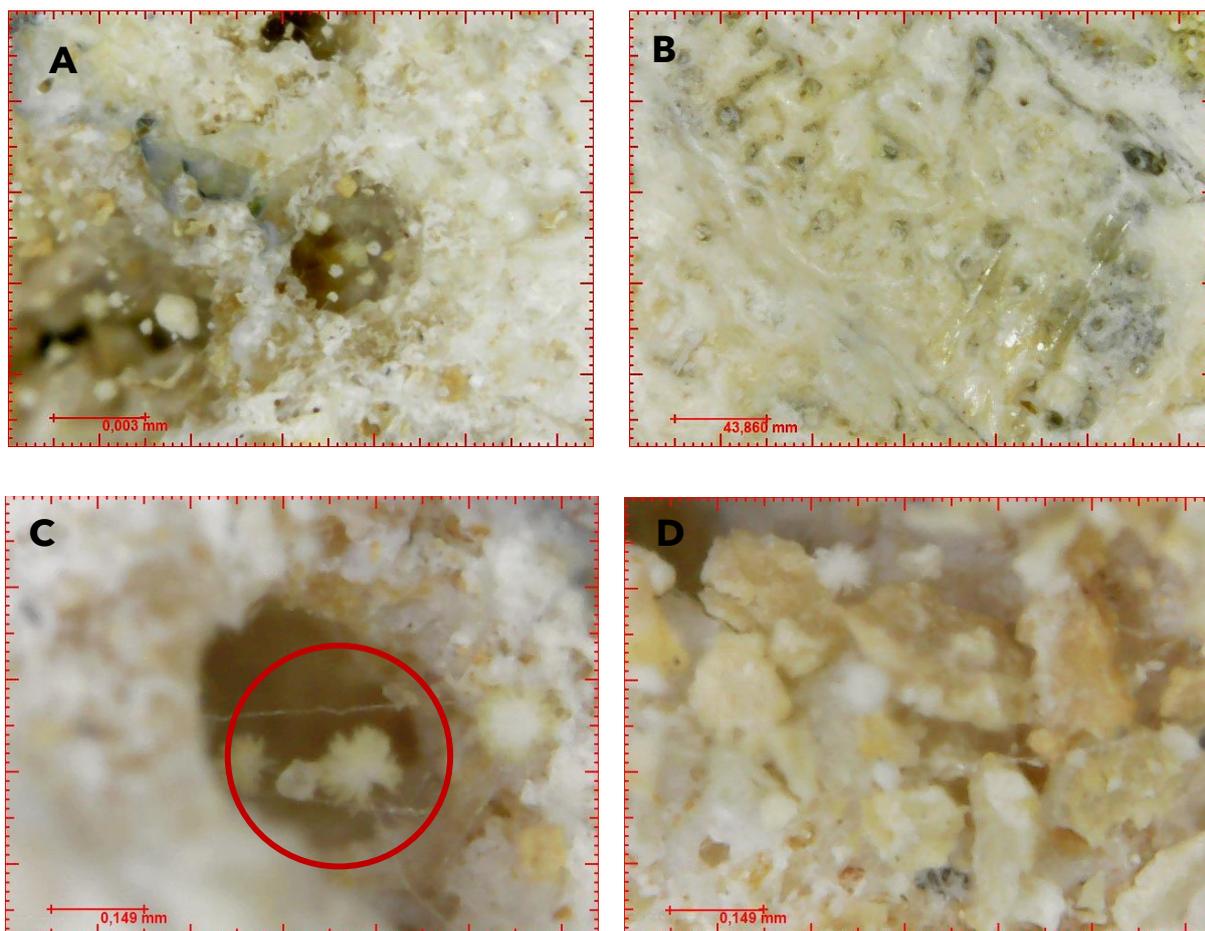


Figura 22. Imágenes tomadas con un microscopio digital de las muestras M.2 y M.3
 (A) Posible proliferación fúngica en las muestra M.2 (240x aumentos).
 (B) Superficie de la muestra M.3. donde se observa manchas grisáceas, así como brillos (170x aumentos).
 (C) Hipotéticas cabezas conidiales de un hongo del género *Aspergillus* en la muestra M.3 (1000x aumentos) (Abarca, 2000: 82).
 (D) Probable formación de carbonato cálcico en la muestra M.3 (1000x aumentos).

Las imágenes tomadas (Fig. 22) permiten identificar hipotéticamente los distintos elementos originados a partir de la aplicación del medio nutritivo. En la figura 22.A, 22.B y 22.C, se observa un posible crecimiento fúngico. Según la morfología, se podría vincular al hongo del subgénero *Aspergillus* (Fig. 23 Tabla 7) (Abarca, 2000:82). Es un hongo oportunista y filamentoso que ha podido crecer gracias al medio nutritivo y las condiciones ambientales. Tras detectarse la alteración en las muestras se registró la humedad relativa y temperatura dentro de las bolsas abiertas en las que se encontraban con el termohigrómetro Preciva HT-86 (Tabla 8).

Categoría taxonomía	Taxón
Dominio	Fungi
Clase	<i>Eurotiomycetes</i>
Orden	<i>Eurotiomycetes</i>
Suborden	<i>Cystobacterineae</i>
Familia	<i>Trichocomaceae</i>
Subgénero	<i>Aspergillus</i>

Tabla 7. Taxonomía del hongo *Aspergillus*

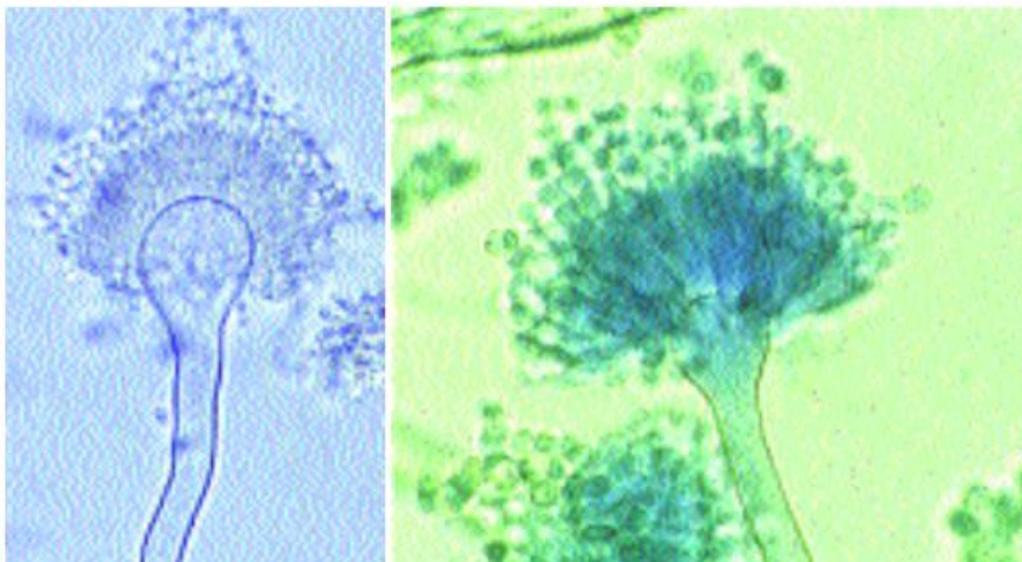


Fig. 23. Cabezas conidiales de diferentes especies de *Aspergillus* con cierta similitud a lo observado en la figura 22.

	M.1	M.2	M.3	M.4	M.5
Temperatura	28,67°C	29,85°C	30,84°C	30,19°C	30,68°C
Humedad Relativa	61,14%	64,10%	65'02%	63,57%	58,88%

Tabla 8. Registro de la temperatura y la humedad relativa dentro de las bolsas abiertas e individuales donde se encuentran las muestras.

Las condiciones para el desarrollo de hongos son muy favorables en todas las muestras. Sin embargo, se desconoce el motivo por el cual solo se ha producido el ataque fúngico en M.2 y M.3 a pesar de que los parámetros de temperatura y humedad relativa son similares.

Por último, es importante destacar la formación de elementos poliédricos irregulares (Fig. 22D) en la superficie de la muestra M.3. Podría vincularse con la formación de cristales pero sería necesario aplicar las técnicas analíticas anteriormente mencionadas para su correcta identificación.

5.5. Discusión de los resultados

Tras la observación de los datos se puede deducir que la precipitación de carbonato cálcico por las bacterias carbonatogénicas no se ha producido, aunque los valores de pH hayan sido idóneos para la proliferación de estas bacterias. En primer lugar, los resultados del *Peeling Tape* (Tabla 5) muestran directamente que el objetivo de consolidación no ha tenido lugar ya que no se reduce la materia retirada por la cinta adhesiva tras el tratamiento. Con ello, se deduce que el aumento de peso de las

muestras M.2, M.3, y M.4 (Tabla 4) se podría vincular a un posible error durante las pesadas o bien, a una hay cierta humedad procedente de la sustancia nutritiva en el interior de estos materiales.

Los motivos por los que no se ha producido la bioconsolidación podría ser por:

- Desde un principio, las muestras no contienen mixobacterias. Como se ha comentado anteriormente, es necesario realizar un muestreo bacteriano para, al menos, detectar la presencia de estos microorganismos. Si en este no se hubiese demostrado la presencia de bacterias, se podría haber introducido a partir del inoculado con un cultivo de *Myxococcus xanthus*.
- Los restos óseos si hubieran tenido este tipo de bacterias, pero su almacenaje en bolsas herméticas durante demasiado tiempo habría podido ocasionar la asfixia de las bacterias.
- Las bacterias sí se encuentran en las muestras, pero no han generado la suficiente cantidad de metabolitos que permita la consolidación. Esto puede deberse a la cantidad de mixobacterias insuficiente o bien, que no ha transcurrido el tiempo necesario para que generasen carbonato cálcico.

Las imágenes del microscopio digital han aportado cierta información sobre las consecuencias de aplicar un medio nutritivo sobre los huesos. La formación de un posible ataque fúngico se ha derivado de unas condiciones ideales para su desarrollo. No obstante, deben realizarse investigaciones con mayor profundidad para conocer con exactitud los motivos de su desarrollo y la causa por la cual solo ha tenido lugar en las muestras M.2 y M.3. Existe la casuística de la intervención en el Monasterio de San Jerónimo donde, tras la aplicación del medio M-3P, no se había producido el desarrollo de hongos y el número de esporas se había reducido (González-Muñoz *et al.*, 2014:87).

6. Conclusiones y perspectivas

El ensayo realizado ha permitido desarrollar y cumplir los objetivos propuestos para este trabajo de investigación. Se ha reunido bibliografía acerca del proceso de formación de los huesos, así como sus factores de deterioro. Para mejorar los tratamientos de consolidación de estos materiales se han revisado las fuentes bibliográficas que han permitido conocer diferentes productos consolidantes o las alteraciones intrínsecas y extrínsecas consecuentes de su empleo, así como la obstaculización investigaciones futuras. Esto ha conllevado a que se haya propuesto la bioconsolidación como nueva alternativa. Tras el desarrollo de la metodología estudiada se ha evidenciado la ineficacia de la bioconsolidación de material óseo no fosilizado de cronología pleistocénica mediante carbonatogénesis bacteriana en el ensayo propuesto. No obstante, hay que mencionar la falta de medios derivados de la alerta sanitaria por el COVID-19 y que ha alterado la propuesta inicial de esta investigación. Técnicas analíticas importantes para este estudio como la microscopía SEM o las pruebas de difracción de RX no han sido realizadas, quedando únicamente el *Peeling Tape Test* como medio para verificar la consolidación apoyado por pesadas, que no se han podido asegurar con varias mediciones, o valoraciones de pH un tanto dudosas por la calidad de las tiras.

No obstante, este ensayo debe servir como antecedente para futuras investigaciones. Se deberá subsanar errores aquí cometidos como la rotura de algunas muestras o incluir la posibilidad de acceder a muestras de mayor tamaño que permitan hacer varias mediciones mediante *Peeling Tape Test*. Además, es conveniente el acceso a mejores sistemas de análisis que permitan verificar la consolidación como la microscopía electrónica de barrido para el estudio de la formación superficial de nuevos cristales o el DRMS para conocer la resistencia de las piezas.

Por último, se ha observado que el empleo de este sistema de consolidación no sería idóneo para la intervención en huesos *in situ* debido a los requisitos técnicos de la carbonatogénesis bacteriana que se enfrentan al rápido proceso de excavación arqueológica. Sin embargo, la bioconsolidación sí podría realizarse en los laboratorios sobre restos óseos preconsolidados temporalmente con resinas acrílicas en los sitios de hallazgos, en los almacenes de material óseo de los museos arqueológicos o bien, sobre material arqueológico que no vaya a ser extraído en yacimientos musealizados como Fuente Nueva 3, en la cuenca continental de Guadix-Baza en Granada.

7. Listado de imágenes

- **Figura 1.** O. Sucre. *Sin título* (gráfico digital) [Consultado el 29 de abril de 2020]. Disponible en <https://www.lifeder.com/hueso-esponjoso/>
- **Figura 2.** T. Pasíes Oviedo. *Fragmento óseo con recubrimiento superficial de gomalaca* (fotografía digital). En: *Los trabajos de conservación-restauración en el laboratorio del Museo de Prehistoria de Valencia: problemática de las antiguas intervenciones* [Consultado el 15 de mayo de 2020]. Disponible en <https://url2.cl/kmEbs>
- **Figura 3.** M^a. A. Linares Soriano & M^a B. Carrascosa Moliner, 2016. *Bone fragments selected for test and consolidating process* (fotografía digital). En: *Consolidation of bone material: chromatic evolution of resins after uv accelerated aging* [Consultado el 15 de mayo de 2020]. Disponible en <http://www.jpaleontologicaltechniques.org/pasta3/JPT%20N15/n4/files/basic-html/page2.html>
- **Figura 4.** A. North, M. Balonis y I. Kakoulli, 2016. *DM (A and B) and SEM (C and D) micrographs of crystals formed on the surface of both the 1.0 M (A and C) and 0.5 M (B and D) treated modern bone samples; note some of the newly formed crystals circled on the DM images* (fotografía digital). En: *Biomimetic hydroxyapatite as a new consolidating agent for archaeological bone* [Consultado 3 marzo de 2020]. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/281307481_Biomimetic_hydroxyapatite_as_a_new_consolidating_agent_for_archaeological_bone
- **Figura 5.** Alkanatur, 2016. *Sin título* (fotografía digital) [Consultado 18 de mayo de 2020]. Disponible en <https://alkanatur.com/product/set-de-tiras-reactivas-de-alta-precision/>
- **Figura 6.** Muñoz- González, M. T. et al., 2014. *Cultivos de bacterias aisladas de los elementos pétreos en tratamiento: (A) desarrollo de colonias en medio de cultivo M-3P sólido; (B) detalle de una colonia y (C) viraje del color púrpura al amarillo provocado por el crecimiento de bacterias productoras de ácidos a partir de glucosa en el medio de Hugh y Leifson. (CC: Cristales de calcita)* (fotografía digital). En: *Bioconsolidación de materiales pétreos y ornamentales mediante carbonatogénesis bacteriana* [Consultado el 17 de junio de 2020]. Disponible en: https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=705411&orden=1&info=open_link_libro
- **Figura 7.** Amazon, 2020. *Jiusion Endoscopio de aumento de 40 a 1000x, microscopio digital* (fotografía digital [Consultado el 19 de junio de 2020]). Disponible en: <https://www.amazon.co.uk/Jiusion-Magnification-Endoscope-Microscope-Compatible/dp/B06WD843ZM>

- **Figura 8.** AlphaOmega Electronics, 2020. *Sin título* (fotografía digital) [Consultado el 19 de mayo de 2020]. Disponible en <https://www.alphaomega-electronics.com/es/colorímetros/2677-clrm-200-colorímetro-de-precisión-8mm-de-abertura-de-medición.html>
- **Figura 9.** C. Rodríguez-Navarro *et al.*, 2012. *FESEM images of calcium carbonate precipitates formed on marble and porous glass substrates treated with M. xanthus for 28 days. (a and b) Marble surface before (a) and after (b) the formation of oriented bacterial calcite. (c and d) Porous glass support before (c) and after (d) the formation of aggregates of spheroidal vaterite linked by EPS* (fotografía digital). En: *Influence of Substrate Mineralogy on Bacterial Mineralization Calcium Carbonate: Implications for Stone Conservation* [Consultado el 20 de mayo de 2020]. Disponible en <http://aem.asm.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=22447589>
- **Figura 10.** C. Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007. *XRD patterns of carbonates. Biotic vaterite (a), and abiotic carbonates in samples collected 1 h (b) and 48 h (c) after the onset of precipitation. hkl values of Bragg peaks are indicated (Cu K α radiation, $k \frac{1}{4} 1:5405 \text{ \AA}$). V, vaterite; Cc, calcite. FTIR spectra of biotic vaterite (a), abiotic carbonates formed in the presence of Bacto Casitone (b), and abiotic calcite formed in the absence of Bacto Casitone (c)* (Gráfico digital). En: *Bacterially mediated mineralization of vaterite* [Consultado el 16 de mayo de 2020]. Disponible en <https://url2.cl/5KJ5n>
- **Figura 11.** F. Jroundi *et al.*, 2014. *DR of gypsum plaster. (A) DR measured of gypsum plaster pieces with initial porosity of 29%-38% treated with three conventional consolidants and M-3P culture médium.* En: *Consolidation of archaeological gypsum plaster by bacterial biomineralization of calcium carbonate* [Consultado el 14 de mayo de 2020]. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1742706114001184>
- **Figura 12.** Fotografía del autor, 2020. *Muestras seleccionadas para la investigación. M1, M2, M3 corresponden al tejido poroso y M,4, M5 al tejido compacto* (digital).
- **Figura 13.** Fotografía del autor, 2020. *(A) Muestra M. 4 y (B)muestra M.5 fracturada en dos partes tras el proceso de limpieza* (digital).
- **Figuras 14.** Fotografía del autor, 2020. *Cinta adhesiva adherida sobre un papel para preparar las cintas.* (digital).
- **Figura 15.** Fotografía del autor, 2020. *A y B: el fragmento sobre el cual se toma la muestra. C: levantamiento de la cinta en un ángulo de 90°. D: resultado del levantamiento* (digital).
- **Figura 16.** Fotografía del autor, 2020. *(A) Imagen realizada con el microscopio digital Jiusion Digital Microscope 1000x del resto de adhesivo dejado sobre la muestra M.4, (B) Rotura de la muestra cinta durante la retirada de la cinta adhesiva* (digital).

- **Figura 17.** Fotografía del autor, 2020. (A) Resultado visual del procedimiento de "Peeling tape" (B) Muestra del fragmento M.1 dentro de una bolsa para evitar su contaminación. (C) Pesado de la bolsa vacía para después calcular el peso de las muestras (digital).
- **Figura 18.** Fotografía del autor, 2020. (A) Instrumental utilizado para la medición, (B) Resultado visual de la reacción de las tiras al contacto con las piezas (digital).
- **Figura 19.** Fotografía del autor, 2020. Se ha aplicado el medio nutritivo sobre un secante para recoger el sobrante (digital).
- **Figura 20.** Fotografía del autor, 2020. Polvo de hueso en el interior de la bolsa (digital).
- **Figura 21.** Gráfico del autor, 2020 Representación gráfica de los valores absolutos del peso de las tiras antes y después de la bioconsolidación (digital).
- **Figura 22.** Fotografía del autor, 2020. Imágenes tomadas con un microscopio digital de las muestras M.2 y M.3 (A) Posible proliferación fúngica en la muestra M.2 (240x aumentos). (B) Superficie de la muestra M.3. donde se observa manchas grisáceas, así como brillos (170x aumentos). (C) Hipotéticas cabezas conidiales de un hongo del género *Aspergillus* en la muestra M.3 (1000x aumentos) (Abarca, 2000: 82). (D) Probable formación de carbonato cálcico en la muestra M.3 (1000x aumentos) (digital).
- **Figura 23.** M. L. Abarca, 2000. *Aspergillus flavus*. Conidióforo. *Emericella nidulans* Conidióforo. [Consultado el 20 de junio de 2020]. Disponible en <https://www.fba.org.ar/panel-gestion/InformeResultado/MI/mi33.pdf>

8. Bibliografía

- **(1984).** *El Conservador-Restaurador: Definición de una profesión.* ICOM. Copenhague.
- **Abarca, M.D., 2000.** "Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial", *Revista Iberoamericana de Micología* [en línea], n. 17, pp, 79-84 [Consultado el 20 de junio de 2020]. Disponible en <https://www.fba.org.ar/panel-gestion/InformeResultado/MI/mi33.pdf>
- **Bailach, C. et al., 2011.** "Gelatinas y colas para el uso en tratamientos de restauración. Estado de la cuestión", *Arché. Publicación del Instituto universitario de restauración del Patrimonio de la UPV* [en línea], n. 6 y 7, pp. 17-22 [Consultado el 3 de mayo de 2020]. Disponible en https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/33041/2012_6-7_17-22.pdf?sequence=1
- **Becerra Luna, J., 2015.** "Estudio comparativo entre consolidación por carbonatación bacteriana y nanopartículas de hidróxido de calcio en materiales pétreos", *MoleqLa* [en línea], n. 17 [Consultado el 15 de febrero de 2020]. Disponible en https://www.upo.es/moleqLa/export/sites/moleqLa/documentos/Numero17/D_estacado_3.pdf
- **Bermúdez Sánchez, C., 2016.** "Modelos clínicos de cera. Proceso de restauración", *Cuaderno técnico* [en línea], n.3, pp. 63-73 [Consultado el 3 de mayo de 2020]. Disponible en https://www.academia.edu/42200246/MODELOS_CL%C3%8DNICOS_DE_CERA.PROCESO_DE_RESTAURACI%C3%93N
- **Bouzas Abad, A. y A. Laborde Marqueze ,2003.** "La degradación del hueso", *Monte Buciero* [en línea], n. 9, pp. 269-275 [Consultado el 17 Septiembre 2019]. Disponible en <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=6&ved=2ahUKEwjlkq3qmdjkAhWLSRQKHTNyCr0QFjAFegQIAxAC&url=https%3A%2F%2Fdialnet.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F759270.pdf&usg=AOvVaw1nmvX76TIIspd58s1aXH1P>

- **Cameotra Swaranjit S. y C. Dakal Tikam, 2012.** "Carbonatogénesis: contribución microbiana a la conservación de monumentos y obras de arte de piedra.", *Conservation Science in Cultural Heritage* [en línea], v. 12, pp. 79-108 [Consultado el 19 de abril de 2020]. Disponible en <https://conservation-science.unibo.it/article/download/3383/2748>
- **Cañavate Toribio, J. (coord.), 2005.** *Anuario Arqueológico de Andalucía 2005* [en línea], Junta De Andalucía, Consejería de Cultura, pp. 957-978. [Consultado el 18 de abril de 2020]. Disponible en http://www.juntadeandalucia.es/cultura/publico/BBCC/Anuario_2005/Granada.pdf
- **Chiche, A., et al., 2005.** "A new design for high-throughput peel tests: statistical analysis and example", *Meas Sci Technol* [en línea], n.16, pp.183-190 [Consultado el 28 de abril de 2020]. Disponible en <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0957-0233/16/1/024/meta>
- **Contreras Cortés F. (coord.) y A. Dorado Alejo (coord.),2018.** "Los yacimientos arqueopaleontológicos de Orce (Orce Granada)", *Cuadernos técnicos de Patrimonio 7. Yacimientos arqueológicos y artefactos. Las colecciones del departamento de prehistoria y arqueología* [en línea], n.7, pp.12-16 [Consultado el 30 de abril de 2020]. Disponible en https://patrimonio.ugr.es/wp-content/uploads/2018/05/Cuaderno_patrimonio7_online.pdf
- **Dickinson Steven, R. y K. M. McGrath, 2001.** "Quantitative determination of binary and tertiary calcium carbonate mixtures using powder X-ray diffraction", *The Analyst* [en línea], n.126, pp. 1118-1121[Consultado el 15 de mayo de 2020]. Disponible en <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2001/an/b103004n?page=search>
- **ECCO, 2002.** *Directrices profesionales de E.C.C.O: la profesión y su código ético.* [en línea], [Consultado el 17 Septiembre 2019]. Disponible en [https://ge-iic.com/files/Cartasydocumentos/2002_directrices_%20profesionales de ecco la profesion y su codigo etico.pdf](https://ge-iic.com/files/Cartasydocumentos/2002_directrices_%20profesionales_de_ecco_la_profesion_y_su_codigo_etico.pdf)

- **Encinas Romero, M. A., 2012.** *Síntesis y caracterización de compósitos de hidroxiapatita-wollastonita, preparados mediante la técnica Sol-Gel* [en línea], Sustaita Martínez Eslith Guadalupe, dir. Trabajo de doctorado en Ciencias Materiales. Universidad de Sonora, Sonora [Consultado el 15 febrero de 2020]. Disponible en http://repositorioinstitucional.uson.mx/bitstream/handle/unison/716/encinas_omeromarinantoniod.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- **Rodríguez Gallego, M. et al., 2003.** "Conservación de rocas ornamentales por biomineralización bacteriana", *ROC Máquina: Piedras naturales, maquinaria y equipos* [en línea], n.83, pp. 14-17 [Consultado el 2 marzo de 2020]. Disponible en <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=715275>
- **Gallegos Rojas, R. J., 2006.** *Restauración y conservación de material óseo y material lítico: Megafauna y Artefactos Líticos. Objetos provenientes de la laguna de Tagua y sitio de Bahía Totoral* [en línea], Santiago: Universidad de Santiago [Consultado el 26 de febrero de 2020]. Disponible en: http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2006/gallegos_r/sources/gallegos_r.pdf
- **García Fortes, S. y N. Flos Travieso, 2008.** *Conservación y restauración de bienes arqueológicos*. Madrid: Síntesis.
- **Gómez Santos, N., 2009.** *Análisis de la respuesta al cobre en Myxococcus xanthus mediada por CuoB y Cuoc. Caracterización del factor sigma del tipo ECF CorE* [en línea]. José Muñoz Dorado y Juana Pérez Torres, dir. Tesis doctoral. Universidad de Granada, Departamento de Microbiología, Granada [Consultado el 19 de junio de 2020]. Disponible en: <https://hera.ugr.es/tesisugr/18514893.pdf>
- **Instituto Geológico y Minero de España, 2007.** *AND332 Yacimiento paleontológico de Fuente Nueva-3* [en línea], [Consultado el 18 de abril de 2020]. Disponible en <http://info.igme.es/ielig/LIGInfo.aspx?codigo=AND332>
- **Instituto Geológico y Minero de España.** *Las capas de Venta Micena* [Consultado el 18 de abril de 2020]. Disponible en <http://www.igme.es/museo/fonelas/paginas/001-002.htm>

- **Jiménez-López, C. et al., 2007.** "Consolidation of degraded ornamental porous limestone stone by calcium carbonate precipitation induced by the microbiota inhabiting the stone.", *Chemosphere* [en línea], n.10, pp. 1929-1936, [Consultado el 17 Septiembre 2019]. Disponible en <http://hdl.handle.net/10481/7428>
- **Jiménez-López, C. et al., 2008.** "Consolidation of quarry calcarenite by calcium carbonate precipitation induced by bacteria activated among the microbiota inhabiting the stone.", *International Biodeterioration & Biodegradation* [en línea], n. 62, pp. 352-363, [Consultado el 17 de junio de 2020]. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830508000590>
- **Johnson, J. S., 1994.** "Consolidation of Archaeological Bone: A Conservation Perspective", *Journal of Field Archaeological* [en línea], n.21 pp. 221-233 [Consultado el 3 de mayo de 2020]. Disponible en <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1179/009346994791547661>
- **Jroundi, F. et al., 2014.** "Consolidation of archaeological gypsum plaster by bacterial biomineralization of calcium carbonate", *Acta Biomaterialia* [en línea], n. 10, pp.3844-3854 [Consultado el 17 septiembre 2019]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-010-9665-y>
- **Jroundi, F. et al., 2010.** "Consolidation of ornamental stone by microbial carbonatogenesis", *Global Stone Congress* [en línea], n.60, pp.1-5 [Consultado el 20 abril 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20386895>
- **Jroundi, F. et al., 2010.** "Bioconservation of Deteriorated Monumental Calcarenite Stone and Identification of Bacteria with Carbonatogenic Activity", *Microb Ecol* [en línea], n.60, pp.39-54 [Consultado el 20 abril 2020]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20386895>
- **KBYO Biological.** *Manual de aplicación MYXOSTONE M-3P.* [No publicado]
- **López-Polín, L., 2012.** "Possible interferences of some conservation treatments with subsequent studies on fossil bones: A conservator's overview", *Quaternary Internacional* [en línea], n. 275, pp. 120-127 [Consultado el 9 de abril de 2020]. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104061821100437X/pdf?md5=02a0c5b89f3f0bf8fb9b96792eb62fca&pid=1-s2.0-S104061821100437X-main.pdf>

- **Linares Soriano, M. A. y M. Begoña Carrascosa Moliner, 2016.** "Consolidation of bone material: chromatic evolution of resins after UV accelerated aging", *Journal of Paleontological Techniques* [en línea], n. especial, pp. 46-67 [Consultado el 05 de mayo de 2020]. Disponible en https://www.jpaleontologicaltechniques.org/pasta3/JPT%20N15/pdf/JPT15_pg_46_67.pdf
- **Miloš D et al., 2012.** "Standardization of peeling tests for assessing the cohesion and consolidation characteristics of historic stone surfaces", *Materials and Structures* [en línea], n. 45 pp. 505-520 [Consultado el 20 de abril de 2020]. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1617/s11527-011-9778-x>
- **Mora P., L. Mora y P. Philippot, 1984.** *Conservation of wall paintings*. Londres, Butterwoths.
- **Muñoz- González, M. T. et al., 2014.** "Bioconsolidación de materiales pétreos y ornamentales mediante carbonatogénesis bacteriana", *La Ciencia y el Arte V. Ciencias experimentales y conservación del patrimonio* [en línea], n. 5, pp. 80-101 [Consultado el 17 Septiembre 2019]. Disponible en <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6257716>
- **Muñoz- González, M. T. et al., 2010.** "Bacterial biomineralization: new insights from *Myxococcus*-induced mineral precipitation", *Geological Society*. [en línea], n. 336, pp. 31-50 [Consultado el 19 Abril 2020]. Disponible en <https://sp.lyellcollection.org/content/specpubgsl/336/1/31.full.pdf>
- **Muñoz Viñas, S., J. Osa Pons e I. Gironés Sarrió, 2014.** *Diccionario de materiales de restauración*. Ediciones Akal: Madrid.
- **Nacarino Meneses, Ca., 2011.** *El conocimiento de las poblaciones del pasado a través de los restos óseos: Análisis paleohistológico sobre huesos largos arqueológicos* [en línea], Trabajo fin de carrera en Biología Evolutiva y Biodiversidad. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid [Consultado el 02 de mayo de 2020]. Disponible en https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/7748/42993_Carmen_Nacarino.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- **North A., M. Balonis y I. Kakoulli, 2016.** "Biomimetic hydroxyapatite as a new consolidating agent for archaeological bone", *Studies in Conservation* [en línea], no. 61, pp.146-161 [Consultado el 20 de marzo de 2020]. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/281307481_Biomimetic_hydroxyapatite_as_a_new_consolidating_agent_for_archaeological_bone
- **Padilla Cano, M., 2015.** *Introducción a la conservación y mantenimiento de los materiales óseos del Museo de Anatomía Comparada de Vertebrados de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid* [en línea], [Consultado el 17 septiembre 2019]. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/308968651_Introduccion_a_la_conservacion_y_mantenimiento_de_los_materiales_oseos_del_Museo_de_Anatomia_Comparada_de_Vertebrados_de_la_Facultad_de_Ciencias_Biologicas_de_la_Universidad_Complutense_de_Madrid
- **Rodríguez-Navarro, C. et al., 2007.** "Bacterially mediated mineralization of vaterite", *Geochimica et Cosmochimica* [en línea], n. 71, pp. 1197-1213 [Consultado el 11 de mayo de 2020]. Disponible en <http://www.ugr.es/~grupo179/pdf/Rodriguez%20Navarro%20C%2007.pdf>
- **Romero Noguera, J., 2017.** *Biodeterioro fúngico y bacteriano de resinas terpénicas utilizadas en pintura y otras artes plásticas* [en línea],. Fernando Bolívar Galiano, María Antonia Fernández Vivas e Inés Martín Sánchez dir. Tesis doctoral. Universidad de Granada, Facultad de Bellas Artes, Granada [Consultado el 03 de mayo de 2020]. Disponible en <https://hera.ugr.es/tesisugr/16790819.pdf>
- **Sánchez Ortiz, I., 2015.** "Restauración de Modelos Anatómicos en cera: Colección del Real Colegio de San Carlos", *Ge-conservación* [en línea], n.7, pp. 37-49 [Consultado el 04 de mayo de 2020]. Disponible en https://www.academia.edu/38103512/Restauraci%C3%B3n_de_modelos_anat%C3%B3micos_en_cera_Colecci%C3%B3n_del_Real_Colegio_de_Ciruj%C3%ADa_de_San_Carlos

- **Tesela. Materiales, Innovación y Patrimonio, 2018.** "Bio-consolidation of the marble columns of the Lions Courtyard in the Alhambra". *Rehabend. Construction Pathology, Rehabilitation Technology and Heritage Management* [en línea], pp. 1-7 [Consultado el 30 de marzo de 2020]. Disponible en <https://teselainnova.com/wp-content/uploads/2018/06/La-Bio-consolidaci%C3%B3n-de-las-columnas-de-m%C3%A1rmol-del-Patio-de-los-Leones-en-la-Alhambra.pdf>
- **Universidad de Granada, 2006.** "Captación de energía" . En: *Microbiología general* [en línea]. Universidad de Granada [Consultado el 19 de junio de 2020]. Disponible en: <https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/10energia.htm>