

Proyecto Fin de Carrera

Ingeniería Química

Tratamientos de conservación de monumentos en
piedra. Precipitación biológica de carbonato cálcico
como método alternativo

Autor: Samuel Álvaro Rivas Pavón

Tutor: Rosario Villegas Sánchez

Dpto. de Ingeniería Química y Ambiental
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla

Sevilla, 2021



Proyecto Fin de Carrera
Ingeniería Química

Tratamientos de conservación de monumentos en piedra. Precipitación biológica de carbonato cálcico como método alternativo

Autor:

Samuel Álvaro Rivas Pavón

Tutor:

Rosario Villegas Sánchez

Profesor titular

Dpto. de Ingeniería Química y Ambiental

Escuela Técnica Superior de Ingeniería

Universidad de Sevilla

Sevilla, 2021

Proyecto Fin de Carrera: Tratamientos de conservación de monumentos en piedra. Precipitación biológica de carbonato cálcico como método alternativo

Autor: Samuel Álvaro Rivas Pavón

Tutor: Rosario Villegas Sánchez

El tribunal nombrado para juzgar el Proyecto arriba indicado, compuesto por los siguientes miembros:

Presidente:

Vocales:

Secretario:

Acuerdan otorgarle la calificación de:

Sevilla, 2013

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora de trabajo final de carrera Rosario Villegas Sánchez, por la paciencia y la gran aportación de bibliografía y conocimiento. Ha sido una responsabilidad enorme tratar un tema del que desconozco tanto ante una persona con tanta sapiencia sobre ello y publicaciones a sus espaldas.

A Pepe Cabello de KBYOBIOLOGICAL por atender cada llamada y por su disposición.

A mi familia y amigos, por tanta paciencia y apoyo moral durante estos largos años, por animarme cuando era preciso, pero también por hacerme ver las veces que me equivocaba. En especial a mis padres por facilitarme realizar estos estudios y a mi hermana Raquel por preocuparse de que no me faltaran fuentes bibliográficas en ningún momento y por estar dispuesta a resolver cualquier duda que tuviera que ver con restauración.

RESUMEN

En los últimos años, la biomineralización ha sido propuesta como una tecnología compatible y respetuosa con el medio ambiente para la conservación de piedras ornamentales. En este trabajo se exponen los métodos convencionales utilizados en la protección del Patrimonio en piedra, así como los ensayos llevados a cabo para la comprobación de su validez e idoneidad, y se compara con dicha técnica basada en la precipitación biológica del carbonato de calcio como método alternativo, en base a la revisión bibliográfica de diferentes ensayos *in situ* y en laboratorio.

ABSTRACT

In recent years, biomineralization has been proposed as a compatible and environmentally friendly technology for the conservation of ornamental stones. In this project, the conventional methods used in the protection of heritage in stone are exposed, as well as the tests carried out to verify their validity and suitability, and it is compared with this technique based on the biological precipitation of calcium carbonate as an alternative method, based on the bibliographic review of different in situ and laboratory tests.

ÍNDICE

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2 | TÉCNICAS DE INTERVENCIÓN | 2 |
| 2.1 | CRITERIOS GENERALES DE INTERVENCIÓN EN MATERIALES PÉTREOS | 2 |
| 2.2 | ETAPAS DE INTERVENCIÓN | 3 |
| 2.2.1 | Limpieza | 3 |
| 2.2.2 | Métodos de prevención y control biológico | 11 |
| 2.2.3 | Consolidación | 14 |
| 2.2.4 | Aplicación de los tratamientos: disolventes y emulsiones | 19 |
| 2.2.5 | Hidrofugación | 20 |
| 2.2.6 | Sustitución | 23 |
| 2.2.7 | Reintegración | 23 |
| 2.2.8 | Mantenimiento y conservación preventiva | 23 |
| 2.3 | MÉTODOS Y MATERIALES AVANZADOS PARA LA CONSERVACIÓN DE LA PIEDRA | 23 |
| 3 | EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO Y ESTUDIOS PREVIOS | 25 |
| 3.1 | INTRODUCCIÓN | 25 |
| 3.2 | EVALUACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS | 25 |
| 3.2.1 | Metodología general | 25 |
| 3.2.2 | Aplicación del tratamiento | 26 |
| 3.2.3 | Compatibilidad con el material | 29 |
| 3.2.4 | Eficacia del tratamiento | 34 |
| 3.2.5 | Resistencia al deterioro: Ensayos de alteración acelerada | 41 |
| 4 | BIOMINERALIZACIÓN: BACTERIAS CAPACES DE PRODUCIR CARBONATO DE CALCIO | 46 |
| 4.1 | INTRODUCCIÓN | 46 |
| 4.2 | PROCESO DE BIOMINERALIZACIÓN | 50 |
| 4.2.1 | Producción de carbonatos: | 51 |
| 4.3 | ENSAYOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 53 |
| 4.3.1 | Consolidation of quarry calcarenite by calcium carbonate precipitation induced by bacteria | |

| | |
|---|----|
| activated among the microbiota inhabiting the stone (Jimenez-Lopez, Jroundi, Pascolini, Rodríguez-Navarro, & al., 2008) | 53 |
| 4.3.2 Consolidation of ornamental stone by microbial carbonatogenesis (Jroundi, E.J., Rodríguez-Navarro, & González-Muñoz, 2010) | 58 |
| 4.3.3 Influence of pore structure on the effectiveness of a biogenic carbonate surface treatment for limestone conservation (De Muynck, Leuridan, Van Loo, Verbeken, & al., 2011) | 62 |
| 4.3.4 TABLA RESUMEN DE LOS RESULTADOS OPTENIDOS EN LOS ESPERIMENTOS | 70 |
| 4.4 ÚLTIMOS AVANCES | 71 |
| 4.5 VENTAJAS E INCONVENIENTES | 71 |
| 4.6 INVESTIGADORES Y PROYECTOS EUROPEOS | 72 |
| 5 CONCLUSIÓN | 75 |
| Índice de ilustraciones | 77 |
| Índice de tablas | 80 |
| Índice de ecuaciones | 82 |
| Referencias | 84 |
| Normas | 88 |

1 INTRODUCCIÓN

El deterioro en los materiales pétreos, ya sea piedra ornamental utilizada en edificios históricos o de nuestras obras, o materiales utilizados en escultura, se ha visto acentuado en los últimos tiempos debido a los factores derivados de la contaminación ambiental y lluvia ácida. Este efecto es notable en especial en zonas urbanas o industriales con alta exposición a productos tóxicos, derivados de combustibles, etc. Esto ha supuesto que la conciencia sobre la importancia de este tipo de casos haya aumentado al producirse deterioros severos o pérdidas en edificios y esculturas de gran valor histórico-artístico (González-Muñoz, 2008).

En su 17ª reunión en París en 1972, la conferencia general de la UNESCO adoptó la Convención sobre la protección del mundo y la naturaleza. El objetivo de este programa era catalogar y conservar lugares con un patrimonio excepcional y belleza natural, ya fuera de interés científico, natural o cultural. En virtud de este programa, muchos edificios históricos y sitios patrimoniales del mundo fueron identificados y listados como patrimonio cultural que se encontraba en un estado de deterioro progresivo. Fue un punto de inflexión en la gestión del patrimonio, ya que a partir de entonces se han iniciados muchos proyectos y programas para la preservación de edificios y bienes patrimoniales. Algunos países, la mayoría de ellos pertenecientes a la Unión Europea, han lanzado proyectos de investigación para mejorar las técnicas convencionales, estudiándose de este modo el papel de la biotecnología como método de conservación. (Dakal & Cameotra, 2012).

El objetivo de este trabajo es recabar información sobre las técnicas de conservación del patrimonio empleadas hoy en día y los ensayos llevados a cabo para evaluar la eficacia de éstos, así como la investigación bibliográfica sobre el método basado en la precipitación biológica del carbonato cálcico para regenerar la piedra. Se expondrán ensayos reales cuyos resultados dan a conocer el comportamiento de esta técnica de la que aún se desconocen datos, pero la cual ya se está empleando en proyectos europeos, sobre todo en Francia, Portugal y España.

2 TÉCNICAS DE INTERVENCIÓN

2.1 CRITERIOS GENERALES DE INTERVENCIÓN EN MATERIALES PÉTREOS

Los principios comunes que deben presidir la restauración y conservación de la piedra están recogidos en la Carta de Venecia o Carta Internacional para la Conservación y Restauración de Monumentos y Sitios (1964). En ésta se recoge que todos los procedimientos empleados deberán conservar el aspecto original de la piedra y mantener el mensaje artístico y estético que sus autores pretendieron transmitir. (Villegas, Baglioni, & Sameño, Tipología de Materiales para Tratamiento, 2003)

En la mayoría de los casos conlleva cierta complejidad llevar esta teoría a la práctica desde el punto de vista técnico debido a la agresión que sufre la piedra por parte del ambiente. Al intervenir, no solo se pretende frenar el deterioro, si no también contribuir a la conservación de la pieza haciendo que ésta aguante dichas agresiones durante un tiempo.

De forma general, se sigue un criterio de prioridad de conservación en el que en primer lugar se actúa sobre las causas de deterioro para eliminarlas -o minimizarlas- y posteriormente se lleva a cabo la intervención de la piedra propiamente dicha. Cabe destacar que la piedra en un edificio es solo la capa externa y superficial, pero está en contacto con otros materiales (morteros, rellenos de muros, etc.) a los que pueden afectar los tratamientos pétreos.

Los tratamientos existentes actualmente para la conservación de la piedra cumplen, en general, las prestaciones para las que han sido diseñados (consolidan, protegen, etc.) pero la mayoría de ellos están concebidos para ser aplicados a materiales homogéneos, con una composición, textura y porosidad uniformes. Un ejemplo de ello podría ser el hormigón. Sin embargo, la piedra es un material extraordinariamente heterogéneo, con un grado de penetración y distribución de los productos de tratamiento diferente en cada punto del seno de la piedra, lo que conlleva una diferente durabilidad.

Por ello, es necesario un estudio experimental, previo a la aplicación de productos a una piedra, para determinar el comportamiento del sistema piedra-tratamiento que se haya seleccionado. Los comportamientos obtenidos al aplicar un tratamiento a un tipo de roca no pueden extrapolarse a otras variedades, ya que se estarían cometiendo errores significativos.

Esta es la razón por la que, junto a la escasez de negocio que supone para la industria química los productos de tratamientos de la piedra, el número de investigaciones realizadas en este campo es pequeño, suponiendo una falta de conocimiento en el comportamiento de la piedra frente a ciertos tratamientos.

Debido a esto, resulta importante remarcar que es preferible no aplicar ningún tratamiento ante la falta de elementos de juicio sobre el sistema piedra-tratamiento, o hacerlo solo cuando sea absolutamente imprescindible. (Villegas, Baglioni, & Sameño, 2003)

2.2 ETAPAS DE INTERVENCIÓN

Los procesos de conservación de la piedra se clasifican en los siguientes tres grupos principales:

- Limpieza
- Consolidación
- Protección

Así se decidió en la reunión del Grupo de Trabajo para el Tratamiento de la Piedra en Bolonia (Octubre 1971).

Debido a esto, el tratamiento de la piedra no se considera un proceso único, si no una secuencia ordenada de operaciones adecuadas a las necesidades: primero se identifica el mecanismo de deterioro, a continuación, se realiza un proceso de limpieza, seguida de una consolidación y, por último, si el ambiente agresivo no ha cambiado, se protege la piedra para evitar un nuevo deterioro. (Villegas, Baglioni, & Sameño, 2003)

Cabe destacar, además de las etapas principales mencionadas, las siguientes actuaciones:

- Preconsolidación: se suele llevar a cabo en piezas o partes de edificios que tengan un valor artístico alto, como escudos, esculturas, paramentos con policromía, etc. Se aborda antes de la limpieza en piedras que presentan un significativo grado de decohesión.
- Desalinización: las sales solubles en una piedra, en caso de detectarse, deben ser eliminadas siempre de forma total ya que una incompleta eliminación condicionaría la evolución de los tratamientos aplicados posteriormente. Se considera una fase de la limpieza.
- Eliminación de organismos vivos (plantas superiores, insectos, hongos, líquenes, bacterias, etc.) así como de los productos de su metabolismo y su desarrollo sobre los edificios (nidos de aves o insectos, guano de aves, etc.). Se puede llevar a cabo como una fase de la limpieza, aunque en la mayoría de los casos se requiere de tratamientos biocidas específicos.
- Reintegración de elementos con pérdidas, sustituyendo con el mismo material (en el caso de la piedra, si se conoce la cantera original) o con materiales similares de aspecto y propiedades físicas y mecánicas
- Mantenimiento y conservación preventiva: no están incluidas, desde el punto de vista formal, en lo que se consideran etapas de intervención. Sin embargo, para que los tratamientos aplicados consigan una durabilidad aceptable, es imprescindible abordar estas dos fases. (Esbert, Ordaz, Alonso, & Montoro, 1997)

2.2.1 Limpieza

El objetivo de la limpieza es eliminar cualquier producto nocivo o suciedad que puedan encontrarse en la superficie de la piedra que acelere su deterioro, además de mejorar su estética y acercarla a la que tuviera originalmente.

Es necesario el planteamiento de las siguientes cuestiones, previamente al comienzo de la limpieza:

- En relación con el valor artístico del objeto
- En relación con la naturaleza de la piedra y de los productos a eliminar (Esbert, Ordaz, Alonso, & Montoro, 1997)

La costra que cubre la piedra consiste, principalmente, en sales solubles, incrustaciones insolubles, restos de antiguos tratamientos, partículas de combustibles inquemados, vegetación, microorganismos y excrementos

de pájaros. El problema aparece al encontrarse estos productos, generalmente, formando una capa persistente y regular sobre la piedra, por lo que es conveniente tomar muestras para determinar su naturaleza e identificarlas con precisión.

Otro inconveniente puede llegar a ser que la limpieza, al ser la primera de las etapas -en algunos casos, la única- que se lleva a cabo, se aborda en muchos edificios de valor histórico-artístico como una limpieza industrial, no teniendo en cuenta ningún criterio de especialistas en restauración.

Además, esta etapa condiciona al resto de etapas de intervención posteriores, siendo necesario por este motivo el uso de métodos y productos compatibles con dichas etapas. Para ello, se deben cumplir los siguientes requisitos durante la limpieza:

- La acción limpiadora debe ser lenta en la medida en la que el responsable de dicha operación sea capaz de controlar los posibles efectos.
- El producto o el método empleado no debe generar ningún producto que pueda perjudicar el proceso de conservación.
- Éste tampoco debe producir fuertes abrasiones, microfracturas o modificaciones del relieve superficial de la piedra que faciliten su posterior deterioro.

La elección del método de limpieza depende fundamentalmente de:

- La naturaleza de las sustancias a eliminar
- Las características petrofísicas de la piedra y su estado de conservación.
- El tipo, grosor, extensión y uniformidad de la capa de suciedad que se quiere eliminar (Esbert, Ordaz, Alonso, & Montoro, 1997).

2.2.1.1 Métodos basados en agua

Tienen como finalidad disolver los compuestos solubles, ablandando además los no solubles, para facilitar su posterior eliminación por medios mecánicos suaves. Para estos métodos se suele recurrir a agua corriente, destilada o desmineralizada a través de resinas intercambiadoras de iones.

El agua, sea cual sea el método empleado, debe penetrar lo mínimo posible para evitar deterioro causado porque se lleguen a mojar elementos internos. No se debe aplicar en épocas del año frías para evitar las heladas y los efectos que éstas puedan inducir (Esbert, Ordaz, Alonso, & Montoro, 1997).

Chorro de agua a presión

Se somete la superficie de la piedra a un chorro de agua a presión durante un periodo de tiempo suficiente hasta alcanzar un grado de ablandamiento que permita disolver la materia soluble y retirar la materia no soluble mediante un cepillo. Por ello, resulta eficaz cuando la costra superficial está compuesta por sales solubles, pero poco efectivo si dicha capa es muy gruesa. Se debe evitar su uso en piedras con un alto grado de decohesión (Villegas, Baglioni, & Sameño, 2003).

Agua pulverizada

Se aplica agua en forma de rocío sobre la superficie hasta que la costra resulta reblandecida. Se repite la aplicación varias veces, se cepilla y se aclara retirando el material disuelto.

No es aconsejable ya que se necesita emplear mucha cantidad de agua, lo que puede conllevar a infiltraciones hacia el interior de la piedra. Si el agua tiene sales solubles, éstas se depositan por evaporación (Esbert, Ordaz, Alonso, & Montoro, 1997).

Agua nebulizada

La nebulización (atomización) permite un efecto máximo con la mínima cantidad de agua. Se convierte el agua en gotas de niebla de 80-120 micras, con una alta superficie específica, mediante nebulizadores. Se consigue una gran cantidad de puntos de contacto piedra-agua debido a la gran cantidad de gotas y a la alta superficie específica de éstas, reduciendo en gran medida la necesidad de limpieza mecánica.

Además, es posible dirigir esta nube de gotas hacia zonas con difícil acceso o a zonas localizadas debido a su capacidad de dispersión a través del aire. (Villegas, Baglioni, & Sameño, 2003)

Vapor de agua

Se genera en una caldera vapor de $0,5 \text{ Kg/cm}^2$ y se aplica sobre la piedra a tratar. Pero para que este tratamiento sea efectivo debe cumplirse dos condiciones: que la piedra sea capaz de resistir altas temperaturas del vapor y que no retenga una alta cantidad de éste pudiendo provocar eflorescencia.

Se considera apropiada para superficies irregulares y en edificios de bajo valor artístico, ya que sus efectos no pueden ser controlados y se puede dañar la piedra debido a las altas temperaturas.

Agua aplicada con apósitos

Se coloca sobre la superficie de la piedra unos apósitos o compresas empapados en aguas. Éstos pueden ser tanto de materiales inorgánicos (arcillas, filosilicatos hidratados de magnesio, sílice micronizada...) como orgánicos (por ejemplo, pasta de papel o de madera).

Se caracteriza por tener una gran superficie específica que le permite absorber, en relación a su peso, una gran cantidad de líquido sin hincharse, ocupando el líquido los espacios vacíos de la estructura del material del que esté compuesto el apósito.

Se trata de un método eficaz para costras de poco espesor (máx. 1 mm), por lo que suele emplearse en estatuas o frescos localizados en interiores de edificios. Para costras gruesas sería tedioso y poco rentable, ya que habría que repetir el proceso un número muy elevado de veces.

Es interesante destacar que, mediante apósitos, si se sustituye el agua por el disolvente conveniente, es posible eliminar diferentes tipos de suciedad como las grasas.

Este método presenta las siguientes ventajas:

- No es dañino, lo que lo hace aconsejable para la limpieza de objetos delicados
- Barato
- De fácil aplicación

Pero también presenta ciertas desventajas:

- Lentitud del proceso
- No es controlable
- Baja eficacia para costras gruesas.

Además, existen diferentes propuestas que mejoran este método:

- Paquete biológico: mediante el cual los microorganismos formados durante la aplicación contribuyen en la eliminación de la suciedad. Se realiza aplicando una mezcla con la siguiente composición (Istituto Centrale per il Restauro, Roma):
 - 1 litro de agua
 - 50 gramos de urea $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$

- 22 ml de glicerina (CH₂OH)₂CHOH
- Arcilla hasta formar una pasta.
- Hempel propone una mezcla similar:
 - 500 ml de agua
 - 25 gramos de urea
 - 100 ml de glicerol
 - Cantidad suficiente de sepiolita para formar una pasta.

El apósito debe estar aplicado sobre la piedra alrededor de un mes, permitiendo al término de este tiempo la eliminación de la mayor parte de la costra con un simple lavado. Se desconoce el mecanismo de acción, pero se cree que las bacterias aportan un efecto disolvente sobre los ligantes de las costras. Para eliminar problemas con las bacterias en procesos posteriores, se recomienda tratar la piedra con fungicidas. (Villegas, Baglioni, & Sameño, 2003)

2.2.1.2 Métodos mecánicos

Se trata de métodos que limpian la costra de la piedra utilizando energía mecánica. Hay que tener en cuenta que la acción mecánica no debe dañar el material al limpiar, por lo que la separación se debe producir justo en la interfase entre la piedra y la suciedad.

Métodos mecánicos sencillos

Estos métodos sencillos deben llevarse a cabo siempre de forma controlable, ya sea manualmente (papel de lija, bisturí, espátula, etc) o mediante instrumentos de pequeñas dimensiones con acción eléctrica, por lo que su eficacia depende de la sensibilidad y la habilidad de la que disponga el operario que maneje el instrumento.

Chorro de arena seca

Una suspensión de algún material abrasivo, arrastrado por un chorro de aire a presión, se hace impactar contra la superficie de la piedra que se quiere tratar. Es importante que este abrasivo sea fino y con un tamaño homogéneo. Pueden utilizarse sílice, escorias metálicas, esferas de vidrio, etc.

Los efectos de esta acción mecánica dependen de varios factores:

- Presión del chorro de aire
- Tiempo de aplicación del abrasivo
- Distancia de la boquilla de salida del aire a presión a la superficie a tratar
- Forma de las partículas abrasivas
- Densidad y dureza de éstas

Ventajas de esta técnica:

- No provoca eflorescencias debido a que se trabaja sin agua (como en el chorro húmedo explicado a continuación)
- Aplicable en cualquier estación del año sin peligro de congelación

Inconvenientes:

- Difícil de controlar
- Puede eliminar sustrato además de la costra
- Mayor problema en piedras heterogéneas, ya que puede erosionar las partes menos resistentes

Chorro de arena húmeda

Se trata de un chorro de agua, a una presión entre 0,5 y 3 Kg/cm², que arrastra arena en su interior e impacta con la piedra a tratar arrancando la costra.

No se produce tras su aplicación polvo que pueda ser dañino para el operador o el medio ambiente, pero se crea una película de barro en la superficie que debe ser eliminada al eliminar la etapa mediante lavado. No se recomienda, además, su uso en edificios de alto interés histórico-artístico ya que puede depositar sales solubles en el chorro de agua que cristalicen tras el secado y evaporación de ésta.

Microchorro de arena

Es un proceso parecido al chorro de arena visto anteriormente, pero en este caso, el polvo abrasivo es mucho más fino (aproximadamente de unas 40 micras) y de menor dureza y la boquilla utilizada es de un diámetro muy pequeño. Se suele usar esferas de vidrio o alúmina como abrasivo.

Presenta las siguientes ventajas:

- Presión del chorro y cantidad de abrasivo regulable, lo que facilita su utilización en cualquier tipo de piedra
- Efectivo para costras gruesas y delgadas, e incluso para costras negras (hollín, cenizas, carbón, gas-oil, etc. (García de Miguel, Sánchez Castillo, González Aguado, & Puche Riart)) que cubren las piedras con policromías, sin dañar las pátinas cromáticas originales que se encuentran debajo

Desventajas:

- Aparatos, mantenimiento y abrasivos costosos
- Método lento
- Desprende una gran cantidad de polvo que es preciso eliminar

2.2.1.3 Métodos químicos

Los métodos químicos son aquellos en los que se ponen en contacto a la costra con un producto químico, soluble en agua, con el que reacciona dicha suciedad, facilitando su eliminación posterior con agua y métodos mecánicos (hay que asegurarse que se retira todo el limpiador). Para facilitar el contacto entre la costra y el producto, este último se suele aplicar junto una pasta absorbente que impide la evaporación del agua, lo que minimiza el consumo de agente limpiador. Deben evitarse productos muy ácidos (pH menor que 5), muy básicos (pH mayor que 8) y aquellos que puedan generar sales solubles.

Agentes ácidos

Estos agentes ácidos o sales ácidas reaccionan con las costras disolviéndolas. Pero su acción resulta altamente agresiva, dejando muestras de su tratamiento años después de la aplicación, por lo que no es recomendable su uso.

Principalmente es peligroso el ácido clorhídrico, ya que puede formar cloruros, posibles causantes de una

gran degradación de la piedra. Este efecto puede tener consecuencias visuales en zonas donde puedan encontrarse impurezas de hierro. Éstas migran hacia la superficie al ser atacadas por el clorhídrico, dotando de un color amarillento a la piedra.

Otras sustancias a considerar son el bifloruro de amonio y el ácido fluorhídrico, las cuales transforman el carbonato cálcico en fluoruro de calcio, el cual tiene un tamaño mucho menor que el primero, creando grietas en la superficie de la piedra que facilitan la entrada a contaminantes.

Sin embargo, hay casos particulares en los que sí puede ser apropiado el uso de agentes ácidos, como en la limpieza de herrumbre en el mármol mediante ácido fosfórico (aunque necesita ser neutralizado posteriormente con amoniaco).

Agentes básicos

Se ponen en contacto la suciedad con agentes con un alto pH, junto con aditivos que permiten controlar la actividad superficial y aumentar su efectividad. Los agentes más usados son la sosa cáustica y las mezclas basadas en amoniaco, teniendo un gran uso efectivo sobre mármoles, calizas y morteros si se quiere eliminar las costras de yeso.

Villegas, Baglioni, y Sameño (2003) indican, al respecto de las mezclas con amoniaco, que:

Entre ellos se encuentra una mezcla de metafosfato de sodio con formiato de amonio, un agente humidificante y etanolamina, a un pH de 9, la cual tiene la propiedad de disolver el yeso sin atacar a la calcita.

Una fórmula puesta a punto por técnicos del Istituto Centrale del Restauro es la siguiente:

- 1.000 cc de agua
- 30 g de bicarbonato de amonio
- 50 g de bicarbonato de sodio
- 25 g de EDTA (sal bisodica)
- 10 cc de desogen
- 60 g de carboximetil celulosa

Dicha mezcla se identifica con la sigla AB57. Es importante que el pH no sea superior a 8 para evitar la corrosión de las calizas y la formación de subproductos dañinos. Una vez aplicada se eliminan los residuos de la pasta con varios lavados y cepillados; de este modo, se eliminan las sales básicas nocivas que podrían permanecer en las piedras. (p.173)

Este método no es recomendable para mármoles, donde podría provocar decohesión de los granos de calcita, ni para calizas muy porosas, ya que pueden desprenderse restos del material al retirar el apósito.

Por el contrario, sí resulta apropiado para eliminar sedimentos calcáreos de poco espesor y cierta dureza.

Presenta las siguientes ventajas:

- Rápido
- De fácil aplicación
- Bajo coste

2.2.1.4 Aplicación de radiación láser

Se trata de un proceso físico en el que se produce la fotoablación, es decir, la vaporización de los materiales

que conforman la costra gracias a la absorción de pulsos de luz coherente (todos los fotones del haz están en fase y presentan la misma longitud de onda) por parte de ésta.

Al desaparecer la costra, se produce un cambio de color (ya que normalmente las costras son más oscuras que la piedra subyacente), minimizando la absorción de energía en la superficie, lo que hace que el proceso se pare.

Las características de este método son las siguientes:

- Radiación monocromática: esto permite elegir una determinada longitud de onda para eliminar una capa concreta sin dañar al sustrato.
- Radiación en pulsos: los cuales tienen una duración muy corta, de unos 10 ns, lo que garantiza que, a pesar de utilizar altas potencias, no se producirán alteraciones en la piedra por altas temperatura.
- El haz que se aplica sobre la piedra es regulable, lo que permite expandirlo para abarcar más superficie o reducirlo para concentrar en zonas de pequeño tamaño toda la energía.

Las características con las que se indica el tipo de láser requerido son:

- Medio activo que emplea
- Duración del pulso
- Potencia máxima de salida o energía total por pulso

Con este método es posible limpiar capas de distintos espesores ya que permite variar la intensidad de la luz, llegando a emplearse energías de más de 10 megavatios/m² para las costras más gruesas. La velocidad de trabajo se mueve en números cercanos a los 100 cm²/min para superficies lisas pero puede variar en caso de que el relieve sea diferente o dependiendo de la intensidad aplicada.

En cuanto al efecto sobre recubrimientos cromáticos que pueda tener la superficie de la piedra, el rayo láser no se muestra dañino si se aplica con la intensidad adecuada a la situación, aunque en el caso de haber colores rojizos en esa capa podrían llegar a surgir algunas complicaciones.

Las ventajas más importantes de la limpieza con láser, a modo de recopilación, son:

- Agresividad física prácticamente nula, lo que permite no preconsolidar.
- Elevada selectividad.
- Ausencia de contacto directo con la piedra.
- Inexistencia de daños causados por la humedad o abrasión debido a que no necesita el uso de agua o abrasivos.

2.2.1.5 Aplicación de ultrasonidos

Se trata de la transmisión de vibraciones desde un emisor hasta la costra a eliminar, mediante una película de agua. La costra se despega de la superficie y posteriormente se elimina por lavado.

Este método no produce ningún daño a la piedra, es muy preciso y resulta de gran utilidad principalmente en piezas policromadas, pero debido a que es un proceso lento, resulta aconsejable su aplicación en objetos de pequeño tamaño.

2.2.1.6 Aplicación disolventes orgánicos

Se tratan de disolventes empleados normalmente para eliminar componentes grasos de la superficie, que con frecuencia provienen de productos de tratamientos anteriores, los cuales son muy sensibles a la oxidación. Esta oxidación podría dar lugar a una indeseable variación de color con respecto al original.

Para mantener a estos disolventes actuando más tiempo sobre la superficie se suelen aplicar de dos formas: mediante apósitos de pulpa de papel (cubriéndolos después con polietileno) o en forma de preparado gel (usando de base, por ejemplo, la bentonita)

Algunos de los más utilizados son el tricloroetano y los hidrocarburos alifáticos o aromáticos.

2.2.1.7 Métodos mixtos

Los métodos anteriormente descritos pueden usarse junto a otro método, ya sea de forma sucesiva o simultáneamente en diferentes zonas. Las combinaciones más frecuentes son agua más acción mecánica, agua más vapor y agua más productos químicos. (Esbert, Ordaz, Alonso, & Montoro, 1997)

2.2.1.8 Extracción de sales solubles

Las sales solubles son uno de los principales problemas para la piedra si no se eliminan o se hace de forma incompleta. Las sucesivas fases de cristalización-disolución que sufren dichas sales al cambiar el contenido de agua del material provocan que los cristales alojados en los poros del material pétreo produzcan microfisuras que acaban dando lugar a disgregaciones y a una mala evolución de los tratamientos posteriores. De hecho, es conveniente no solo su eliminación, si no actuar para prevenir la posible formación futura de nuevas sales que puedan aparecer como consecuencia del agua de lluvia, la contaminación ambiental, los morteros, etc.

A pesar de ello, no resulta sencillo el proceso de eliminación de dichas sales. Normalmente se suele proceder de la siguiente forma:

- Se aplica sobre la piedra un material absorbente empapado en agua destilada. Se mantiene en contacto con la piedra hasta solubilizar las sales, cubierta por polietileno.
- Al acabar el paso anterior, se deja secar y se retira el apósito una vez seco.
- La pasta retirada se diluye en agua destilada para determinar la concentración de sales con un conductímetro.
- Se repite todo el proceso las veces necesarias hasta que la solución no conduzca la electricidad, es decir, hasta que no queden sales en la piedra.

Recientemente se han propuesto métodos basados en el uso de bacterias sulforreductoras, vacío, microondas... pero sus resultados son menos contrastados que el método indicado anteriormente. También se han desarrollado proyectos que estudian el uso de la cristalización, es decir, sustancias que impiden que las sales cristalicen aunque se produzca la saturación de las disoluciones existentes en el interior de los poros de la piedra.

2.2.2 Métodos de prevención y control biológico

Uno de los pasos más importante dentro de la conservación del patrimonio es el control de agentes biológicos que puedan producir el biodeterioro de una pieza. No solo se debe intervenir sobre aquellos agentes que se encuentren en la piedra en el momento del tratamiento, si no también prevenir las apariciones futuras, que serán más probable conforme sean más favorables las condiciones ambientales. Existen los siguientes métodos de control biológico:

2.2.2.1 Métodos indirectos

Son métodos en los que el control del crecimiento de las poblaciones de agentes biológicos se lleva a cabo mediante la alteración de las condiciones ambientales (temperatura, humedad, etc.) o de la cantidad de nutrientes a las que dichas poblaciones puedan acceder. No resulta fácil su aplicación ya que manipular las condiciones ambientales por parte del operario es una tarea factible en pocas ocasiones, además de que necesitaría un control muy exhaustivo.

2.2.2.2 Métodos directos

Actúan directamente sobre los agentes biológicos, eliminándolos de la piedra o estabilizándolos. Pero estos efectos solo serán efectivos durante un periodo de tiempo tras la aplicación. Nuevas colonias de organismos aparecerán en la piedra. Para evitarlo, es necesario realizar un mantenimiento estricto continuo.

Métodos mecánicos

Se trata del método más común por su simplicidad. Consiste en la eliminación de los organismos de forma física, con instrumentos manuales (cepillo, bisturí, espátula, etc.). Por el contrario, como es difícil mediante este método obtener una eliminación completa de los agentes, no proporciona resultados a largo plazo. Por ello, normalmente se aplican junto con métodos químicos.

Métodos físicos

Son métodos basados en la aplicación de radiaciones electromagnéticas y eléctricas que conllevan un resultado nocivo para los organismos. Se emplean los siguientes tipos de radiaciones:

- Radiación ultravioleta: con gran capacidad para la eliminación de gérmenes, se emplea para esterilizar objetos o superficies.
- Rayos γ : tienen una mayor actividad biocida que los anteriores, ya que esta radiación electromagnética es de mayor frecuencia. Se aplica solamente a materiales orgánicos como madera, papel, etc.
- Temperatura: tanto altas como bajas temperaturas son útiles, también, para materiales orgánicos.
- Ultrasonidos: además de emplearse para la limpieza, puede tener efectos biocidas.

Métodos biológicos

Se basa en el empleo de otros organismos para frenar el crecimiento de aquellos que dañan la piedra. Está altamente enfocado en combatir la presencia de animales o plantas con especies parásitas o que compitan con ellas. Para combatir la flora, por ejemplo, se podría emplear insectos fitófagos. Sin embargo, conlleva muchas complicaciones y contraindicaciones en la práctica. En el caso de los animales, se emplean antagonistas que reduzcan la población de la especie perjudicial (por ejemplo, depredadores de crías, sobre todo en las aves).

A la hora de combatir insectos, resulta complicado el método, ya que no se dispone de suficiente conocimiento acerca del comportamiento de éstos, y además es difícil asegurar la erradicación completa de la plaga. Sin embargo, dentro del campo de la investigación, se cree que las feromonas puede ser un buen método para controlarlos (siendo además un método no tóxico), ya que pueden atraerlos reproduciendo la feromona del sexo contrario, y eliminarlos posteriormente con insecticida.

Métodos químicos: Pesticidas y desinfectantes

a) Definición y clasificación de los productos

Un pesticida es aquella sustancia química capaz de eliminar especies biológicas perjudiciales para la piedra, ya sea actuando contra microorganismos, en cuyo caso la acción recibe el nombre de desinfección, o contra organismos macroscópicos, en cuyo caso recibe el nombre de desinfestación.

Se clasifican dependiendo de:

- Su naturaleza química (orgánicos o inorgánicos)
- Los organismos objetivos (bactericidas, fungicidas, alguicidas, herbicidas e insecticidas, en el caso de la conservación del patrimonio)
- Tipo de acción
- Método de uso

Comercialmente, el producto suele llevar un principio activo, encargado de la actividad biocida, y aditivos, encargados de mejorar su eficiencia.

b) Requisitos de los productos

Para el empleo de pesticidas en obras de arte es necesario el cumplimiento de requisitos tanto técnicos como sanitarios:

- Elevada eficiencia de acción contra los agentes encargados del biodeterioido
- Inexistencia de efectos sobre los materiales constitutivos de la obra
- Baja toxicidad para la salud
- Bajo riesgo de contaminación ambiental

La actividad biocida de un producto la determina su eficacia, que viene definida por:

- Dosis necesaria: es decir, la cantidad de pesticida necesario por volumen de aire o superficie
- Espectro de acción: que determina la amplitud de variedad de organismos contra los que es útil la acción
- Persistencia: o lo que es lo mismo, la capacidad para permanecer en el tiempo

Este producto comercial debe ser neutro, estable e incoloro para minimizar la interferencia con el sustrato. Sin embargo, esta interferencia puede verse afectada, no solo por las características químicas del principio activo, sino también por factores como la porosidad o composición del sustrato, el tiempo de contacto, la concentración de producto empleada, etc.

Otro factor a tener en cuenta en un pesticida comercial es su toxicidad (capacidad del producto de producir la muerte o lesiones de los agentes de biodeterioro). Esta característica viene definida un índice que expresa la cantidad de principio activo que es capaz de eliminar al 50% de la población. Este índice recibe el nombre DL_{50} (DL =Dosis Letal), medida en mg de producto por Kg de peso del agente.

Cualquier sustancia con actividad biocida deben estar contenida en un registro donde se indican la clase toxicológica, así como las medidas de precaución a tener en cuenta a la hora de manipularla.

Con respecto al riesgo de contaminación ambiental, es necesario es necesario prestar atención al uso de estos productos, ya que una dosis elevada de producto puede provocar que se disperse por el ambiente durante o tras su aplicación.

c) Modalidad de aplicación

La aplicación de un biocida depende del organismo a eliminar, el material de la obra y su estado y del producto elegido.

Los pesticidas vienen dados como líquidos o como sólidos, que posteriormente se disolverán en agua o en un disolvente orgánico, y se pueden aplicar de formas diferentes (fumigación, compresas, inyección, etc.).

Los métodos más empleados son pulverización y pincel, siendo la primera la opción más adecuada en caso de que la piedra presente un estrato superficial muy deteriorado. Sin embargo, la aplicación de compresas resulta muy útil cuando el agente tiene un contacto muy fuerte con el sustrato y es necesario ampliar el tiempo de contacto para la acción biocida. Por otra parte, la inyección se suele usar para eliminar insectos que dañan la madera, utilizando los orificios que ellos mismo crean. Para materiales orgánicos se emplea la fumigación, que presenta una alta eficacia y penetración, aunque debe aplicarse en ambientes preparados y sellados, llamados cámaras de fumigación, debido a su alta toxicidad.

Atmósferas controladas. Gases inertes

Debido a los grandes problemas que puede suponer la fumigación de productos biocidas con altos niveles de toxicidad, es necesario disponer de un método alternativo. Este método alternativo se basa en la utilización de gases inertes (argón o nitrógeno) en sistemas cerrados herméticamente donde se deposita y manipula el objeto a tratar. Para ello, es necesario controlar factores ambientales como la humedad o la temperatura.

Estudios en laboratorio indican que la aplicación de una atmósfera de gas inerte a baja concentración de oxígeno produce anoxia total en cualquier fase del ciclo biológico de los insectos que suponen problemas para la restauración.

Ventajas de los gases inertes:

- No es tóxico
- Es estable, por lo que no conlleva alteraciones físico-químicas en las piezas tratadas
- Bajo coste

2.2.2.3 Ensayos con biocidas

Es necesario realizar un estudio previo para determinar los agentes biológicos que aparecen en una piedra, para posteriormente aplicar los tratamientos más adecuados.

Determinación de la eficacia

Primero se realizan pruebas *in situ* de tratamientos biocidas, y después se llevan a cabo ensayos en laboratorio que consisten en la aplicación del producto y la observación de las consecuencias que tienen lugar en la interfase entre el agente y el sustrato. Estas observaciones se efectúan en determinados intervalos de tiempo, haciendo uso de microscopios (óptico y electrónico de barrido).

Determinación de la interacción biocida-piedra

Esta determinación trata de comprobar cuales son los efectos de los biocidas sobre la piedra a tratar, midiendo, antes y después de aplicar el tratamiento, las características de ésta. Los biocidas utilizados en la prueba han sido preparados previamente en dosis concretas para cada tipo de tratamiento.

Se pueden estudiar diferentes propiedades cuya variación indicaría un efecto negativo, como serían:

- Absorción de agua por capilaridad
- Alteración cromática
- Ensayos de alteración acelerada para evaluar la resistencia a los factores de deterioro
- Observación al microscopio electrónico de barrido para estudiar posibles reacciones superficiales

2.2.3 Consolidación

“Por consolidación se entiende la aplicación de un material que, al penetrar en profundidad en la piedra, mejora su cohesión, sus características mecánicas y la adhesión de las capas alteradas al sustrato sano” (Villegas, Baglioni, & Sameño, 2003, p.180).

Solo es necesaria la aplicación de un consolidante cuando se ha producido una pérdida de cohesión entre los granos que forman la piedra, volviendo a unir dicho consolidante los granos sueltos al sustrato sano.

Saber de antemano qué proceso de consolidación es el mejor a largo plazo para una pieza o edificio es complicado, ya que el deterioro se produce a un ritmo tan bajo que, a pesar de haber mucha información sobre los productos a emplear, acaba siendo necesario realizar ensayos acelerados de laboratorio para representar el comportamiento que tendrá la piedra con un tratamiento concreto frente a los agentes de deterioro.

Hay tres procesos fundamentales que rigen los principales métodos de consolidación:

- 1) Cambiar los componentes de la piedra más delicados ante situaciones atmosféricas adversas por materiales químicamente resistentes que se introducen en los poros y favorecen la cohesión de los granos más sueltos.
- 2) Depositar sílice en los poros con la finalidad de proporcionar cohesión entre los granos sueltos y las partes sanas de la piedra.

- 3) Cementar los granos e impermeabilizar la piedra impregnándola con productos orgánicos que rodean dichos granos sin rellenar totalmente los poros, formando una red polimérica orgánica.

En cuanto a qué tipo de consolidante (orgánico o inorgánico) es mejor, resulta difícil dar una respuesta. Los consolidantes inorgánicos tienen a su favor su parecido a la piedra en cuanto a composición y su resistencia a los ataques ambientales. Sin embargo, sus características mecánicas son inferiores a las de los orgánicos, además de suponer una dificultad añadida a la hora de hacer que el consolidante penetre. Los polímeros orgánicos, por su parte, presentan características demasiado diferentes a la de la piedra, como puede ser los coeficientes de expansión térmica, mayores en los polímeros, lo que ocasiona tensiones.

2.2.3.1 Características de los consolidantes

Las características exigidas a los consolidantes se pueden dividir en dos categorías. Las características primarias son las que el consolidante debe cumplir independientemente de su aplicación específica. Las características secundarias son aquellas a tomar en consideración en cada tratamiento particular. En la Tabla 1 se resumen estas características:

| <i>Características de los consolidantes</i> |
|---|
| PRIMARIAS |
| ·Valor consolidante |
| ·Alterabilidad de la piedra consolidada |
| ·Profundidad de penetración |
| ·Modificación de la porosidad |
| ·Capacidad de transferencia de humedad |
| ·Compatibilidad con la piedra |
| ·Efecto en el aspecto de la piedra |
| SECUNDARIAS |
| Producto |
| ·Facilidad y velocidad de curado |
| ·Viscosidad |
| ·Inflamabilidad |
| ·Toxicidad |
| ·Presión de vapor |
| ·Miscibilidad con el agua |
| ·Sensibilidad al contenido de agua de la piedra y a su estado de limpieza |
| Sustrato |
| ·Presencia de fisuras |
| ·Estado de alteración |
| ·Presencia de microorganismos |
| Ambiente |
| ·Posibilidad de aparición de hielo |
| ·Presencia de agentes agresivos |
| ·Exposición a la radiación |
| ·Presencia de sales |

Tabla 1: Características de los consolidantes (Villegas, 1989)

Las características primarias son las más importantes y pueden resumirse como sigue:

- a) **Valor consolidante:** es decir, la capacidad para restablecer la cohesión entre los granos de la piedra. Los ensayos empleados para cuantificar este valor son: resistencia a la compresión, a la tracción, a la abrasión y dureza superficial.
- b) **Alterabilidad de la piedra consolidada:** que, para que tenga sentido el tratamiento, debe ser menor que la de la piedra sin trata. Se comprueba mediante ensayos de alteración acelerada.
- c) **Profundidad de penetración:** debe ser alto, ya que, si existiera un cambio poco gradual de las propiedades entre la superficie tratada y el interior de la piedra no tratada, se podría perder la cohesión entre ambas zonas y desprenderse la primera. La profundidad de penetración es inversamente proporcional a la viscosidad del producto y al ángulo de contacto con la piedra.
- d) **Modificación de la porosidad y porometría:** La porosidad es uno de los parámetros que más afectan a la alterabilidad de la piedra, debido a que ésta determina la cantidad de agua que ésta contenga en sus poros y la capacidad de movimiento que experimente por ella.
- e) **Capacidad de transferencia de humedad:** A pesar de que es importante impedir la entrada de agua de lluvia a la piedra, también lo es permitir la salida de humedad contenida en la piedra y así impedir acumulaciones de sales y aguas en zonas interiores.
- f) **Compatibilidad con la piedra:** Desde el aspecto físico se debe procurar que las características del consolidante y la piedra sean lo más parecidas posibles para evitar tensiones. En cuanto a la parte química, se debe evitar reacciones con componentes de la piedra.
- g) **Efecto en el aspecto:** La piedra consolidada no solo no debe mostrar diferencias estéticas con la piedra original, sino que, además, hay que procurar que no se produzcan alteraciones visuales con el paso del tiempo debido a los agentes ambientales.

2.2.3.2 Consolidantes inorgánicos

Dadas sus grandes semejanzas con los minerales que forman la piedra en cuanto a su composición, los consolidantes inorgánicos podrían parecer un método perfecto para consolidar la piedra. Sin embargo, este parentesco hace que, tras el tratamiento, la piedra se siga alterando de igual forma que antes de éste.

Ventajas:

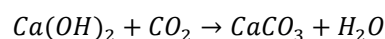
- Mayor duración
- Gran resistencia a agentes medioambientales

Inconvenientes:

- Dificultad de penetración
- Baja acción consolidante
- Formación de sales solubles como subproductos
- Cambio de color en la superficie

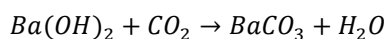
Entre los consolidantes inorgánicos se encuentran los siguientes:

- a) **Hidróxido cálcico:** que reacciona con el dióxido de carbono atmosférico dando lugar al carbonato cálcico que actúa de consolidante.



Ecuación 1: Formación de carbonato a partir de hidróxido de calcio (Esbert, Ordaz, Alonso, & Montoro, 1997, p. 78)

b) **Hidróxido de bario:** se produce una reacción similar a la anterior, pero en este caso los carbonatos formados (carbonato de bario) son menos solubles que los de calcio, lo que significa que son más resistentes a la alteración.



Ecuación 2: Formación de carbonato a partir de hidróxido de bario

c) **Silicatos alcalinos:** que producen sílice precipitada. Presentan un problema debido a la precipitación de sales alcalinas, muy solubles, además de experimentar una penetración muy baja.

d) **Derivados del Flúor:** El ácido fluorhídrico reacciona en las piedras calizas dando fluoruro cálcico, y en las areniscas dando fluosilicato, en ambos casos en costras muy finas. Con el ácido fluosilícico y los fluosilicatos se obtienen fluoruro cálcico y sílice, pero se forma una costra muy fina y de distinta composición que el sustrato, que normalmente termina desprendiéndose.

e) **Anhídrido carbónico y carbonato:** Empleando estos compuestos se pretende reconvertir el yeso formado como consecuencia de la alteración en carbonato cálcico” (Villegas, Baglioni, & Sameño, 2003)

2.2.3.3 Consolidantes organosilícicos

Se trata de consolidantes cuya acción consiste en formar estructuras moleculares que se asemejen a la de la sílice, como se muestra a continuación:

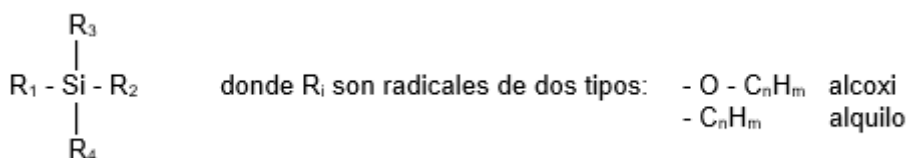
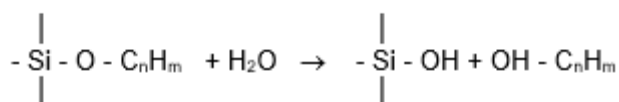


Ilustración 1: Estructura de la sílice

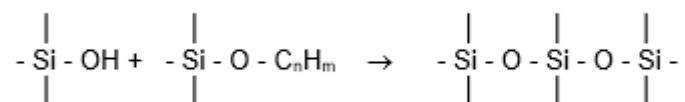
Reciben el nombre de alquilalcoxisilanos debido a los radicales que existen en la molécula.

El primer paso en el proceso de polimerización es la hidrólisis del grupo alcoxi a partir del monómero:



Ecuación 3: Hidrólisis del grupo alcoxi

Posteriormente se produce la polimerización total:



Ecuación 4: Polimerización de los consolidantes organosilícicos

Acabando una vez hayan reaccionado todos los grupos alcoxi.

La caracterización del polímero formado se debe a los grupos alquilo que permanecen sin reaccionar una vez acabada la polimerización:

- Si se parte de un tetraalcoxisilano: se obtiene únicamente un efecto consolidante con una estructura similar a la de la sílice.
- Si se parte de un alquiltrialcoxisilano: se obtiene un producto con propiedades consolidantes e hidrófugas, dada su estructura tridimensional con grupos orgánicos.
- Si se parte de un dialquildialcoxisilano: el resultado es un polímero lineal con dos grupos orgánicos en cada átomo de silicio. Proporcionará un efecto únicamente hidrófugo. (Villegas, Baglioni, & Sameño, 2003)

2.2.3.4 Consolidantes orgánicos. Polímeros sintéticos

Si bien aún se usan consolidantes orgánicos de origen natural, los más empleados son los sintéticos, que aportan, además de su acción consolidante, un carácter hidrófugo debido a la composición orgánica. Pueden aplicarse sobre la piedra ya en forma de polímeros, o hacerlo en forma de monómeros y que se produzca en la propia piedra la polimerización.

Los grandes problemas que presenta la consolidación con productos orgánicos son:

- **Penetración:** la cual viene condicionada por la viscosidad. Si se aplica un polímero, con moléculas grandes y elevada viscosidad, la penetración en la piedra será muy pobre. Sin embargo, si aplicamos monómeros que polimericen en el interior, la mejora en la penetración será notable. Este último caso tiene el inconveniente de lo difícil que resulta una correcta polimerización en el interior de la piedra.
- **Radiación UV:** Afecta prácticamente a todos los polímeros. Sin embargo, algunos como las resinas epoxi, se alteran en mayor medida.

Los grupos que engloban a los diferentes polímeros sintéticos son:

- a) **Ceras:** Supone una de las primeras medidas empleadas en la protección de la piedra. Se trata de un derivado del petróleo, que puede aplicarse disueltas en una solución o fundida. Presenta dos principales desventajas: la adhesión del polvo y el ablandamiento a altas temperaturas.
- b) **Polímeros acrílicos:** Son los más utilizados y se obtienen de los ácidos acrílico y metacrílico. Comercialmente suele encontrarse combinados con otros monómeros.

c) **Resinas epoxi:** Se emplea juntando dos componentes junto a un catalizador que desencadena la reacción en el momento de la aplicación. Principalmente se utiliza como adhesivo o como base para un mortero.

d) **Resinas de estireno poliéster.** Se trata de copolímeros fruto de la combinación de monómeros diferentes. Se aplican disueltos, poniéndolos en contacto con un catalizador en el momento de la aplicación.

2.2.3.5 Productos comerciales

En la tabla 2 se recogen algunos productos comerciales usados para la consolidación de la piedra junto a su naturaleza química:

| <i>Fabricante</i> | <i>Naturaleza química</i> | <i>Producto</i> |
|------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| Ciba | Resina epoxídica | Araldyt AY103 |
| Eurostac | Resina epoxídica cicloalifática | EP 2101/K210 |
| Rhom & Haas | Resina acrílica | Paraloid o Acryloid B72 |
| Albus | Resina acrílica | Albuperl Z4B |
| Wacker Chemie | Silicato de etilo | Wacker OH |
| Goldschmidt | Silicato de etilo | Tegovakon V |
| Rhône-Poulenc | Metil-fenil polisiloxano | Rhòdorsil 11309 |
| | Silicatos de etilo | Rhoximat HD RC-70 |
| | Silicatos de etilo modificados | Rhoximat HD RC-80 |
| Dow Corning | Metil-trimetoxi-silano | Z-6070 |
| | Fenil-trimetoxi-silano | Z-6124 |

Tabla 2: Productos comerciales utilizados en Europa como consolidantes (Esbert, Ordaz, Alonso, & Montoro, 1997, p. 81)

2.2.4 Aplicación de los tratamientos: disolventes y emulsiones

La forma de aplicar los tratamientos puede condicionar en gran medida la evolución de este sobre la piedra, por lo que adquiere una importancia significativa. Como ya se ha comentado, el primer factor que determina la funcionalidad de un tratamiento es la capacidad para penetrar y distribuirse por el interior de la piedra.

Esta penetración estará condicionada principalmente por:

- La concentración, viscosidad y tensión superficial de la solución.
- La porosidad de la piedra.

- El tiempo de contacto entre la piedra y la solución.
- La naturaleza del consolidante y del disolvente.
- Las condiciones de temperatura y humedad relativa del ambiente.

Estos datos son facilitados por los fabricantes en los consolidantes comerciales.

Estos productos suelen aplicarse mediante un nebulizador o mediante un pincel, aunque para ciertas situaciones específicas es habitual el uso de apósitos.

Sin embargo, en el laboratorio los productos suelen aplicarse por: nebulización, capilaridad, autoclave, gota a gota, inmersión total, inmersión total al vacío, etc.; aunque conviene evaluar los tratamientos con la misma técnica que se vaya a emplear en la piedra final.

En investigaciones con finalidad puramente científica, se estudia el comportamiento con diferentes sistemas piedra-tratamiento para establecer patrones de comportamiento de los que se pueda extraer una referencia.

Los disolventes empleados frecuentemente son, alguno de ellos, tóxicos o contaminantes, por lo que se está trabajando en el diseño de un nuevo tipo de producto: las emulsiones acuosas.

Estas emulsiones suelen venir en dos fases: producto activo y agua que sirve como medio emulsionante. Al aplicarlo se vuelve a diluir en agua para facilitar su penetración. El comportamiento de los productos en forma de emulsión parece ser similar al resto que tengan el mismo principio activo.

La principal ventaja que presentan es que no son tóxicas ni contaminantes, pero presentan una caducidad más corta que otros productos, demandando una aplicación lo más próxima a su preparación.

2.2.5 Hidrofugación

Villegas (2003) al respecto de los hidrofugantes, señala:

La humedad es un factor de esencial importancia en el proceso de deterioro de los materiales de construcción. Los hidrófugos son productos incoloros utilizados para reducir la absorción de agua a través de la superficie de los materiales, sin afectar sensiblemente a su aspecto.

La hidrofugación, también llamada protección, se basa en la aplicación de un tratamiento que impida la entrada de agua líquida en la piedra pero que permita la salida del agua en forma de vapor, es decir, que mantenga la "respiración" del material. Este tipo de tratamiento debe utilizarse siempre que el agua sea un factor de alteración importante y complementándolo con medidas que impidan la entrada de agua por otros frentes: resane de cornisas, canalizaciones de los desagües de las cubiertas, etc.

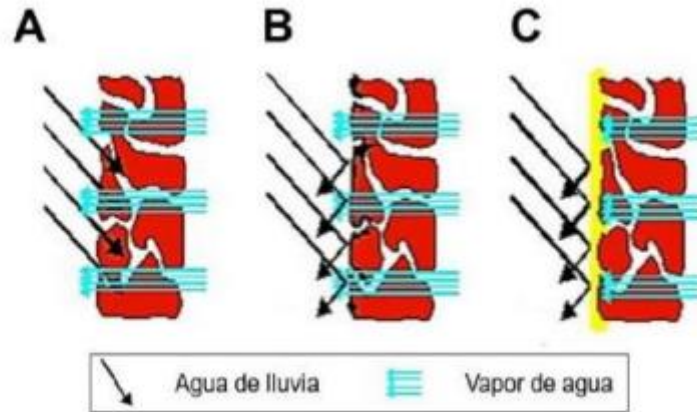


Ilustración 2: Representación de los diferentes comportamientos de superficies pétreas frente a la acción del agua. (A) Pared sin protección, (B) Pared hidrofugada en la que se forma una película superficial que reduce la entrada de agua líquida, permitiendo el intercambio de vapor de agua con el ambiente, (C) Pared impermeabilizada (Hidalgo & Villegas, 2018, p. 24)

No es necesario que la penetración del tratamiento sea demasiado grande dado que la entrada de agua líquida se da en la gran mayoría de los casos en la superficie. Sin embargo, es aconsejable que el tratamiento penetre mínimamente en la piedra. Es importante que la protección se mantenga a pesar de los agentes atmosféricos y sin cambiar el aspecto físico de la piedra tratada.

Es posible conseguir esta protección mediante:

- Taponamiento de los poros y capilares; produciendo una impregnación total del tratamiento ya que se rellenan todos los huecos. Se emplean productos acrílicos y se puede aplicar únicamente a objetos pequeños que permiten someterlos previamente a vacío para asegurar el llenado. El principal inconveniente viene dado porque la ausencia de llenado total en una pequeña zona puede suponer el comienzo de una alteración.
- Creación de una película más o menos adherida a la superficie del material, que aísla a la piedra de los agentes medioambientales. Es difícil conseguir un aislamiento total, y presenta el inconveniente de que, si entra agua al interior de la película, no podría salir fácilmente. Al igual que en el caso anterior, solo es aplicable a objetos de tamaño pequeño.
- Disminución de la energía superficial del soporte; se aumenta el ángulo de contacto provocando que el agua líquida no moje al sustrato, pero permitiendo la salida del vapor de la roca, ya que está no está cubierta.

2.2.5.1 Características de los hidrofugantes

Todos los hidrofugantes deben cumplir (Villegas, Baglioni, & Sameño, 2003):

- Impermeabilidad al agua líquida.
- Permeabilidad al agua vapor saliente de la piedra.
- Estabilidad frente a los agentes de alteración y frente a la radiación UV.
- Reversibilidad o posibilidad de aplicar un nuevo tratamiento encima.
- Buena adhesión al material para que no pueda ser eliminado por la lluvia.
- Suficiente profundidad de penetración.

g) Mantenimiento de la apariencia estética de la piedra. (Villegas Sánchez, 1989)

h) Inexistencia de subproductos perjudiciales en caso de ocurrir una reacción entre la piedra y el producto de tratamiento. (Villegas Sánchez, 1989)

Para que todas estas características se cumplan, las moléculas de los productos hidrófugos deben tener una parte hidrofílica y otra hidrofóbica; la primera estaría en contacto directo con la piedra, dejando pasar el vapor y la segunda daría hacia el exterior, impidiendo la entrada de agua externa, pero sin taponar los poros.

2.2.5.2 Siliconatos

Estos compuestos se forman a partir de monómeros del tipo:

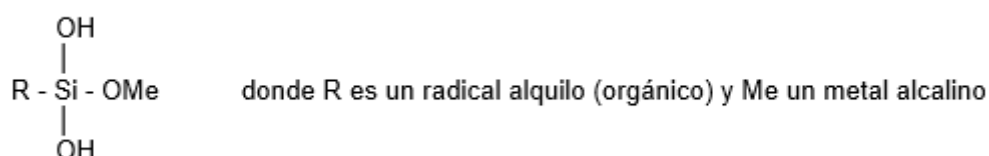
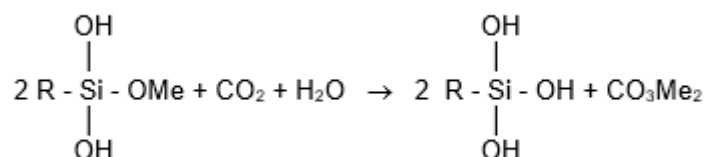


Ilustración 3: Monómero de partida de los silicatos

En el interior de la piedra se produce la primera reacción de la formación de silicatos, que es la hidrólisis:



Ecuación 5: Hidrólisis de los silicatos

Seguidamente se producirá la polimerización, quedando en la cadena un radical alquilo en cada átomo de silicio. Este proceso es muy lento, teniendo mayor éxito en materiales muy porosos. El principal inconveniente es la formación de carbonatos alcalinos, que son muy solubles.

2.2.5.3 Productos organosilícicos

Al igual que se explicó anteriormente al hablar de los consolidantes, estos compuestos están basados en monómeros con radicales alquilo.

2.2.5.4 Polímeros orgánicos

Son los mismos productos que se utilizan como consolidantes. Los más adecuados son aquellos consiguen proporcionar mayor eficacia en la superficie de la piedra.

2.2.6 Sustitución

Se trata de colocar una piedra nueva en el lugar de una en mal estado, que tenga un aspecto similar a la original y unas características petrofísicas acordes al edificio y al ambiente en el que se va a colocar. Es preciso realizar un estudio para determinar cuál es la piedra más adecuada en cada caso.

2.2.7 Reintegración

Ya sea por criterios funcionales o meramente estéticos, la reintegración es una etapa que casi siempre hay que acometer. Ésta, pretende recuperar las formas arquitectónicas ya sea con piedra natural, con morteros, etc. En esta etapa, además, se incluye el relleno de juntas y fisuras con un mortero que debe ser estable y de características compatibles con la piedra que se está trabajando, como también debe asemejarse estéticamente dicha piedra. Para ello se pueden utilizar áridos de la misma piedra original para la fabricación de los morteros.

2.2.8 Mantenimiento y conservación preventiva

Se trata de actividades dedicadas a prolongar los resultados obtenidos durante la restauración, en el caso del **mantenimiento**, y a intentar disminuir la velocidad de deterioro actuando sobre los agentes que lo provocan, en el caso de la **conservación preventiva**. Esta conservación pasiva no suele recogerse en los programas de restauración y conservación del patrimonio pétreo, pero es igualmente importante debido a que los tratamientos tienen un tiempo limitado de efecto.

El mantenimiento engloba revisiones periódicas y un control sobre los factores de alteración relacionados con la propia piedra, mientras que la conservación preventiva se encarga de registrar posibles alteraciones externas como la contaminación ambiental. (Villegas, Baglioni, & Sameño, 2003)

Todos estos tratamientos de mantenimiento y conservación preventiva serán más fácil de llevar a cabo en interiores o en piezas de museo que en exteriores, donde la exposición ambiental es más alta y se puede llegar a requerir el cierre de la pieza como protección a modo de cápsula. (Doehne & Price, 2010, p. 28)

2.3 MÉTODOS Y MATERIALES AVANZADOS PARA LA CONSERVACIÓN DE LA PIEDRA

Se están desarrollando técnicas y metodologías innovadoras en los últimos tiempos que atraen la atención de muchos expertos, que esperan acaben siendo compatibles con las características fisicoquímicas de los sustratos tratados y al mismo tiempo minimice el potencial de alteración. Estos materiales podrían mitigar los efectos indeseables al tiempo que otorga estabilidad a largo plazo y reduce los costos de las intervenciones. Además, se persigue un aumento de la sostenibilidad, una reducción del impacto ambiental y que puedan proporcionar beneficios sociales, ecológicos y económicos. (Hosseini & Karapanagiotis, 2018)

Algunos ejemplos de estas nuevas técnicas y materiales son:

- Nanopartículas (SiO, TiO, ZnO y Ag) que confieren propiedades superhidrófugas, autolimpiantes

y antiincrustantes.

- Consolidante híbrido con tensioactivo que reduce la presión capilar y protege del agrietamiento.
- Nanopartículas inorgánicas para la consolidación y protección antifúngica.
- Inhibición del crecimiento bacteriano con nanopartículas (NPs).
- Biomineracización: Bacterias que generan carbonato cálcico.
- Revestimientos autolimpiantes.
- Morteros geopoliméricos.
- Inhibidores de cristalización de sales (Villegas Sánchez, Clases del Máster en Ingeniería Química, 2021).
- Otros

3 EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO Y ESTUDIOS PREVIOS

3.1 INTRODUCCIÓN

Al intervenir una obra que constituya parte del Patrimonio Histórico, hay que considerar su exposición a agentes externos, llamados factores extrínsecos, que condicionan la evolución que la piedra pueda experimentar a lo largo del tiempo. Paralelamente existen los factores intrínsecos, los cuales están compuestos por aquellos ligados a la estructura y los materiales del propio edificio o la piedra.

Esto supone que exista un tipo de tratamiento para cada piedra y lugar. Es decir, un mismo tipo de estructura y composición no tiene por qué ser tratado igual en dos lugares diferentes porque puede variar del uno al otro las condiciones climáticas, la contaminación, etc. Dada esta multitud de situaciones posibles obliga a tener que realizar una evaluación de los tratamientos previa a su aplicación. (Villegas Sánchez, 2003)

Junto a esta evaluación, llevada a cabo mediante ensayos en laboratorio, es necesario recabar toda la información posible relativa a la obra de arte y entorno, así como de las condiciones ambientales a las que haya estado expuesta, tanto en el pasado como en la actualidad. Además, se debe realizar una inspección ocular del edificio u obra para analizar las características generales observables a simple vista o identificables con medios sencillos, como el color, la composición de la piedra, estado de alteración superficial, tipos de microorganismos que la habitan, etc. Este proceso de examen visual puede repetirse tras realizar los ensayos en laboratorio, consiguiéndose mayor exactitud a saber los resultados de las pruebas. (Martín Pérez, 1993)

3.2 EVALUACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

3.2.1 Metodología general

Para cualquier tipo de obra que sea objeto de estudio, se debe seguir la metodología general para determinar la idoneidad la técnica y producto de tratamiento, según la cual hay que evaluar lo siguiente:

- Compatibilidad entre los productos empleados y la piedra a tratar, así como con otros productos aplicados a la misma pieza en otra fase del proceso.
- Eficacia del tratamiento, para alcanzar los objetivos para los que ha sido utilizado ese producto.
- Capacidad para resistir a los factores de alteración que puedan actuar sobre la obra después del proceso de restauración.

Los ensayos realizados para comprobar los tres puntos anteriores son los mismos que se emplearían para comprobar las propiedades de la piedra, aunque se enfocan de otra forma. Sin embargo, hay un tipo de ensayos que sí están creados con la finalidad concreta de estudiar la alterabilidad de una pieza tratada; estos ensayos se llaman ensayos de alteración acelerada.

Para determinar los tres aspectos que se han enumerado anteriormente, los estudios se llevan a cabo de la siguiente forma:

- Se aplica el tratamiento estudiado sobre probetas que simule las características de la obra que se desea tratar.
- Se estudia el grado de compatibilidad del producto con el material a tratar, de tal forma que se decide si las posibles modificaciones (previamente se elabora una lista con ellas) que pueda provocar sobre éste son aceptables.
- Se comprueba la compatibilidad entre sustancias empleadas en diferentes tratamientos, como pueden ser biocidas aplicados previamente a la consolidación.
- Se evaluará la eficiencia del tratamiento de una manera diferente según para qué sea éste.
 - Consolidantes: midiendo propiedades mecánicas
 - Biocidas: midiendo cantidad de organismos eliminados o la inhibición de la aparición y crecimiento en otros nuevos
 - Hidrófugos: propiedades relacionadas con la absorción de agua
 - Extracción de sales solubles: analizando la presencia de dichas sales en la superficie
- Se determina la capacidad de resistencia que tiene la piedra frente a los agentes de alteración, sometiendo las probetas a efectos de agentes determinados. Para obtener estos resultados a corto plazo se recurre a los ensayos de alteración acelerada. (Villegas, 2003)

3.2.2 Aplicación del tratamiento

Para que los ensayos sean representativos de toda la piedra, dado que esta presenta características muy heterogéneas en sus diferentes puntos, es necesario el uso de un número elevado de probetas de diferentes tamaños y formas, las cuales normalmente son difíciles de conseguir en el propio edificio. Por este motivo se recurre a material de una cantera cuya formación geológica sea semejante a la de la obra.

- Probetas para ensayos para propiedades hídricas (Ontiveros Ortega & Villegas Sánchez, 2006):

La mayoría de las normativas establecen en tres el número mínimo de muestras por cada tipo de piedra, mientras que el tamaño de éstas depende del tipo de material. En el caso de los materiales pétreos suelen emplearse muestras con formas geométricas de los tamaños que se indican a continuación:

 - Cilindros: Diámetro 5 cm, altura 10 cm
 - Discos: Diámetro 5 cm, altura 1 cm
 - Prismas: 11x5x5 cm
 - Cubos: 5x5x5 cm
 - Lajas: 5x5x1 cm

Antes de utilizar la muestra para el ensayo, es necesario eliminar cualquier resto pulverulento, para lo cual se lava con agua y se seca en una estufa a 105°C durante aproximadamente 48 horas hasta alcanzar una variación de peso menor al 0,1%.

- Probetas para ensayos para propiedades mecánicas (Ontiveros Ortega & Villegas Sánchez, 2006):

Las formas generalmente utilizadas para las probetas son cilíndricas, prismáticas y cúbicas, dependiendo su tamaño del tipo de ensayo a realizar. Es necesario que siempre guarden una determinada relación entre la altura y la anchura. De esta forma, dependiendo del ensayo:

- Compresión uniaxial: para probetas cúbicas, deben tener una distancia entre caras opuestas de entre 4 y 8 cm; para probetas cilíndricas la relación altura/diámetro de la base debe ser 1 ó 2; y para probetas paralelepípedicas, las dimensiones deben ser $d=b$ o $d=2b$, siendo b la tercera dimensión.
- Flexión: se recomienda probetas de 20x10x5 cm

Se deben llevar a cabo los ensayos con distintos estados de humedad (natural, seco y saturado) para entender cómo se comportaría el material en diferentes circunstancias ambientales. Por cada tipo de piedra, se recogerán entre 3 y 10 probetas, estableciendo la norma que el número sea 6. (UNE-EN 1926/99).

Es necesario que antes de aplicar el tratamiento se caractericen las probetas para determinar sus propiedades y así observar la modificación que experimentan éstas. Las propiedades medidas dependerán del tipo de tratamiento a aplicar.

Para evaluar la eficacia de la limpieza y de la extracción de sales, puede realizarse un experimento *in situ* en pequeños trozos de la muestra. Sin embargo, para ver compatibilidades con el material y con otros productos, así como la alterabilidad de la piedra en un futuro, se realizan ensayos en probetas de laboratorio. Este mismo criterio se aplica a la aplicación de biocidas, en cuyo caso es necesario aplicar un lavado con agua para eliminar cualquier posible resto del producto.

Para evaluar los tratamientos consolidantes e hidrofugantes se pueden realizar su aplicación de diferentes formas. La inmersión de la probeta en el producto, la absorción capilar, la pulverización o la brocha son algunos de los métodos más parecidos a los que posteriormente se emplearían en un edificio. Puede resultar interesante la aplicación del producto solo a una parte de la probeta, dejando una muestra visual de la interfase entre la piedra tratada y sin tratar, facilitando la observación de algunos mecanismos de alteración.

Además, durante la aplicación de un tratamiento pueden obtenerse algunos datos de utilidad para la aplicación posteriormente sobre la obra, como pueden ser las condiciones de temperatura y humedad más favorables de un producto, tiempos de cada fase de aplicación, consumo del producto, etc.

Es necesario, tras la aplicación de consolidantes o hidrófugos, que se deje un cierto periodo de tiempo para que polimericen y se evapore el disolvente. La volatilidad de éste no debe ser muy alta para ayudar a la fijación sobre los granos, lo que conlleva tiempos mayores de espera. Esta etapa suele llevarse a cabo en condiciones de humedad y temperatura controladas.

Para determinar los resultados, se realizan mediciones del peso de las probetas periódicamente. En aquellos casos en los que se emplean monómeros, el proceso durará al menos 15 días, mientras que, en el caso de polímeros, 5 días, aunque son datos aproximados ya que la volatilidad del disolvente puede hacer que varíen.

Una vez finalizado el tratamiento sobre la probeta, es posible observar otros parámetros útiles en la aplicación sobre la piedra de la obra final a tratar, como pueden ser la profundidad de penetración de los consolidantes e hidrófugos, las características finales tras la aplicación de biocidas o procesos de limpieza, el incremento de peso, etc.

El tratamiento de limpieza puede alterar a la superficie de la piedra por diferentes mecanismos (mecánicos, en tratamientos abrasivos; químicos en la utilización de productos de esta naturaleza; térmicos, al aplicar láser; etc.). Dichas alteraciones se estudian por técnicas microscópicas como la técnica electrónica de barrido, combinable para detectar reacciones químicas con el microanálisis por EDX (Espectroscopia de

rayos X de energía Dispersiva).

Para determinar la profundidad de penetración de un tratamiento se corta la probeta por su mitad y se estudia mediante métodos diversos (absorción de agua, calcinación, microscopía electrónica, etc.) aportando información muy útil sobre la técnica y tratamiento aplicado:

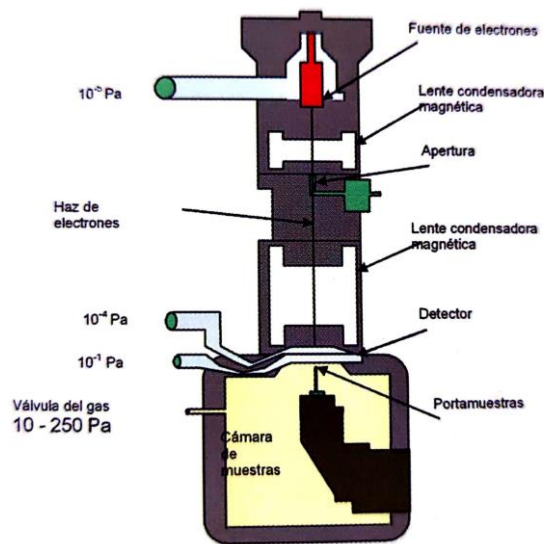
- Idoneidad del disolvente: cuanto más volátil, menos penetración
- Tiempo de contacto: a menor tiempo de contacto, menor penetración
- Concentración de la disolución: si la concentración es muy alta en relación a la porosidad de la piedra, penetrará menos

A veces es necesario aplicar más de una vez el tratamiento para conseguir la penetración adecuada.

La variación de peso de las probetas después de aplicar el tratamiento depende de dos factores: la porosidad de la propia probeta y de las características del producto de tratamiento (cantidad de principio activo y su forma, es decir, si es un monómero, oligómero o un polímero).

Para estudiar la morfología de la película se estudia mediante la técnica SEM (Microscopía Electrónica de Barrido), mediante la cual se puede observar si (Villegas Sánchez, Metodología para la evaluación y estudio previo de tratamientos, 2003):

- El producto consolidante o hidrofugante recubre los granos de piedra constituyente de forma uniforme, pero sin taponar los poros, lo que impediría la salida de vapor de la piedra hacia el exterior.
- Se forman fisuras a través de la película del producto que puedan suponer vías de entrada para agentes externos, disminuyendo la efectividad del tratamiento.



Escaneado con CamScanner

Ilustración 4: Esquema de un ESEM. En este tipo de SEM es posible variar la presión en la columna del microscopio, de forma que ésta sea muy cercana a la atmosférica en la cámara portamuestras (tomado de Rodríguez-Navarro & Doehne, 1999) (IAPH, 2006, p. 53)



Ilustración 5: Equipo SEM comercial: FEG modelo SIRION de FEI Company (Illescas Salinas, 2012, pp. 74-75)

3.2.3 Compatibilidad con el material

3.2.3.1 Análisis de color y aspecto superficial

A la hora de evaluar un tratamiento, uno de los primeros factores que se debe tener en cuenta es la posible variación de características intrínsecas de la piedra debido a la aplicación del producto o la técnica de utilización. Aspectos superficiales como el color pueden variar debido a cambios en la forma en la que refleja la luz. Estas variaciones son cuantificables mediante cartas de patrones de color o de forma instrumental. Los instrumentos utilizados para este fin pueden ser un colorímetro o un espectrofotómetro UV-Vis.

Es posible detectar pequeños cambios de color mediante la observación en el microscopio, ya que pueden formarse cristales de sales disueltas. A continuación, se expone un ejemplo de un tratamiento con nanopartículas en el que se puede observar la aparición de manchas de color (Becerra, Zaderenko, & Ortiz, 2019):

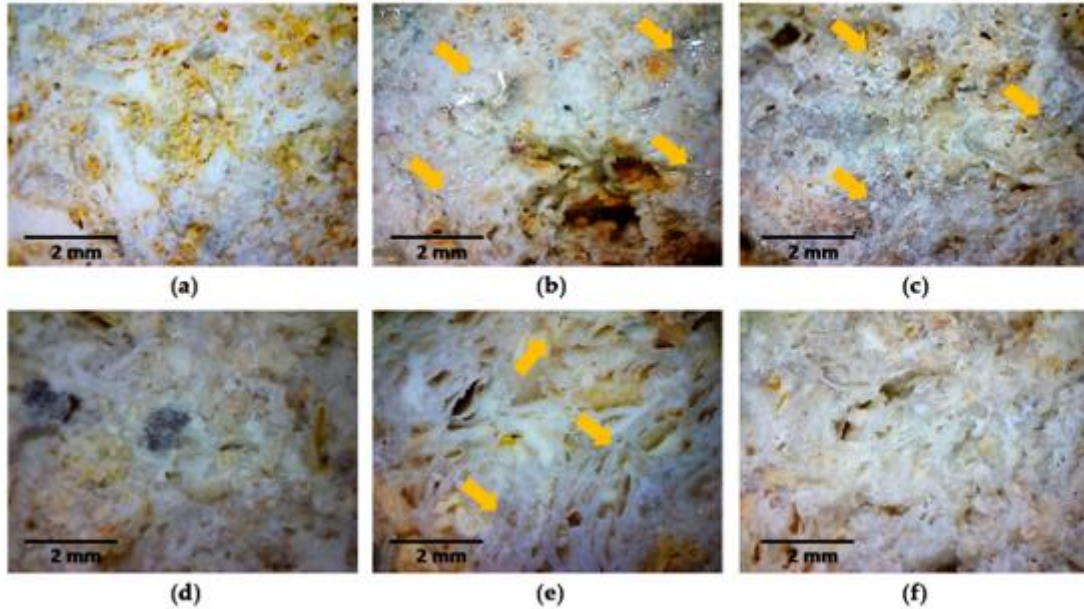


Ilustración 6: *Imágenes de las superficies de la piedra después de las aplicaciones de un tratamiento con nanopartículas tomadas con un microscopio digital de mano con un aumento de 40x. Caliza de la cantera de Espera: (a) sin tratar (b) y (c) con tratamientos diferentes. Calcarenita de Puerto de Santa María: (d) sin tratar (e) y (f) con tratamientos diferentes. Se pueden apreciar pequeños cristales blancos, por ejemplo, en (b).*

Los cambios en la apariencia física de la piedra pueden variar dependiendo del tratamiento:

- En la limpieza y la aplicación de biocidas, los cambios se deben principalmente a la eliminación de suciedad y organismos en la superficie. Sin embargo, es posible identificar variaciones debido a reacciones químicas, deposición de algún componente, etc., derivadas de los productos aplicados.
- En la consolidación e hidrofugación, la variación más frecuente suele ser el oscurecimiento y brillantez de la pieza debido a la permanencia de producto en su interior, aunque acaban atenuándose después de un corto periodo de tiempo.

| Tratamiento | Y | x | y |
|------------------------|----------|----------|----------|
| Sin tratar | 37,06 | 0,3554 | 0,3662 |
| Tegovakon | 37,48 | 0,3518 | 0,3627 |
| Tegosivin HL100 | 36,11 | 0,3545 | 0,3648 |
| Consolidante OH | 40,20 | 0,3475 | 0,3615 |
| BS 28 | 37,06 | 0,3532 | 0,3647 |
| ARD 55050 | 32,04 | 0,3563 | 0,3676 |
| Paraloid B72 | 26,31 | 0,3659 | 0,3707 |

Tabla 3: Resultados de pruebas de color (coordenadas CIE) en probetas de Guadix (Villegas, 2003, p. 198)

3.2.3.2 Análisis de propiedades físicas

Para evaluar la compatibilidad del tratamiento, otras propiedades que pueden proporcionar información valiosa son las físicas: porosidad, porometría, superficie específica, permeabilidad a gases y vapores.

La mayor fuente de posibles variaciones viene ligada a los tratamientos con consolidantes e hidrofugantes, ya que conlleva que los poros de la piedra contengan en su interior el producto del tratamiento, teniendo este una interacción con el aire ambiente y el agua diferente a la que tiene la propia piedra.

La variación de la porosidad depende directamente de la cantidad de producto que permanece en el material, que se verá afectada las características del propio producto y por la porosidad original de la piedra.

Sin embargo, más importante que la porosidad en sí, es la variación en los tamaños de los poros de la pieza. Los microporos (menos de una micra) son muy susceptibles a alteraciones como cristalización de sales, por lo que, si al rellenar los poros con producto de tratamiento se disminuye el espacio libre en éstos, se estará aumentando la alterabilidad del material. Esta última situación también se mostraría con una disminución de la superficie específica, índice que indica el área expuesta al ambiente, por lo que a menor superficie específica, menor capacidad de respiración de la piedra. (Villegas Sánchez, 2003)

Cálculo de la porosidad

Las rocas naturales, al ser agregados de diferentes minerales dispuestos aleatoriamente, contiene huecos en su interior, es decir, poros. Como todo cuerpo poroso, el material presentará dos densidades que se deben diferenciar: la densidad real, que es la densidad media de sus partículas sólidas, y la densidad aparente, que engloba también el volumen de poros. Esta segunda indica la porosidad de la piedra, por lo que es un valor importante para entender la circulación del agua y el aire en el interior del material.

Se puede calcular la densidad aparente dividiendo la masa de la probeta por el volumen ocupado en seco, y expresándose en tanto por ciento (%).

Tipos de ensayos para el cálculo de la porosidad:

- Microscopía óptica: permite la visualización de los poros en una sección bidimensional y la cuantificación del área correspondiente a cada tipo de poro en un rango de tamaños en las 2,5 y las 10000 micras. Los principales inconvenientes que presenta es que no permite cuantificar por debajo de las 2 micras y que, al ser tan delgada la capa que se estudia en cada medida, hacen falta un gran número de éstas para que el estudio sea representativo.
- Microscopía electrónica: esta técnica mejora a la anterior ya que permite el análisis en secciones tridimensionales. En este caso es posible trabajar en un rango de tamaños más pequeño, entre 0,1 y 500 micras. Ambas microscopías permiten digitalizar las imágenes, permitiendo su cuantificación con exactitud, y posibilita la diferenciación entre los poros y la piedra mediante la aplicación de resinas coloreadas.
- Microscopía confocal láser: es la más avanzada de las tres. Se inyecta en los poros de la piedra una resina con una sustancia fluorescente a la luz láser. Permite visualizar imágenes tridimensionales y efectuar cortes, lo que deja de manifiesto la geometría y la distribución de los poros.

Además, es posible realizar el cálculo de la porosidad mediante métodos indirectos, es decir, aquellos que permite el cálculo de ésta a partir de la determinación experimental de otras propiedades fisico-químicas:

- Absorción forzada de agua a vacío: es el método más importante dentro de los indirectos. La característica calculada en este método es el contenido máximo de agua que es capaz de retener una roca rellenando todos sus poros. Basándose en las normas UNE-EN 1936/99 y Rilem: Comm 25-PEM: Se toman de 3 a 6 probetas de forma cúbica, cilíndrica o prismática, de mínimo 25 mL, se secan hasta que no exista variación de masa a unos 70°C. Tras ello se pesan y se introducen durante unas 24 horas en un recipiente a vacío para eliminar el aire de los poros. Se sumergen totalmente en agua desmineralizada a 20°C y se dejan otras 24 horas. Posteriormente se restablece la presión atmosférica y se dejan de nuevo 24 horas. Se sacan y se pesan (pesada hidrostática), se secan con un paño y se vuelve a pesar (pesada saturada). Con los datos obtenidos se realizan los siguientes cálculos:

Ecuación 6: Porosidad abierta:

$$n_0(\%) = \frac{M_s - M_0}{M_s - M_h} \times 100$$

Ecuación 7: Densidad aparente:

$$d_{ap} \left(\frac{g}{cm^3} \right) = \frac{M_0}{M_s - M_h}$$

Ecuación 8: Contenido de agua a saturación:

$$W_s(\%) = \frac{M_s - M_0}{M_0} \times 100$$

Donde M_0 corresponde al peso seco, M_h , al peso saturado sumergido (pesada hidrostática) y M_s , al peso saturado al aire.

- Otros: Método de succión, absorción de N_2 , porosimetría o intrusión de Hg (MIP), difracción de rayos X de bajo ángulo, etc. (IAPH, 2006, pp.56-57)

Un ejemplo de cálculo de porosidad:

| Muestra de roca | Consumo (%) | Materia seca (%) | Porosidad total (%) |
|------------------------|--------------------|-------------------------|----------------------------|
| Sin tratar | - | - | 33,50±3,65 |
| TV100 | 13,84±1,09 | 7,86±0,45 | 26,68±1,89 |
| BS290 | 7,01±1,51 | 1,42±0,48 | 30,38±2,59 |
| UCAT-o | 14,56±0,62 | 8,40±0,39 | 27,51±1,96 |
| UCAT-10Po | 14,20±0,64 | 8,29±0,46 | 24,95±4,61 |
| UCAT-2o | 14,91±0,67 | 8,51±0,42 | 22,96±4,41 |
| UCAT-5P2o | 15,01±0,67 | 8,08±0,42 | 22,22±0,91 |
| UCAT-10P2o | 14,89±0,59 | 8,11±0,49 | 23,07±1,10 |

Tabla 4: Valores de consumo y materia seca de los diferentes tratamientos aplicados sobre la calcarenita de Snata Pudia y valores de porosidad total obtenidos mediante MIP (Illescas Salinas, 2012, p. 205)

3.2.3.3 Análisis de propiedades hídricas

Las propiedades hídricas están fuertemente condicionadas por la porosidad y porometría de la piedra, pero también influye las características superficiales de los productos que se apliquen y cómo se distribuyan estos por el interior de la piedra. En caso de producirse una alteración en la permeabilidad y en la higroscopicidad de la pieza con respecto a su estado sin el tratamiento, se podrían llegar a producir acumulaciones de humedades en zonas concretas y cristalización de sales en la interfase, creando problemas de separación de placas.

En este sentido, uno de los parámetros a tener en cuenta más relevantes, es la velocidad de evaporación de agua. No solo para tratamientos destinados puramente a una acción hidrofugante sino también para consolidantes que puedan producir dificultades a la hora de que el agua y el vapor de agua circulen por los poros hacia el exterior. (Villegas Sánchez, Metodología para la evaluación y estudio previo de tratamientos, 2003)

Cálculo de la velocidad de evaporación

Este ensayo está basado en la dinámica que siguen los materiales como la piedra a la hora de secarse. Este secado se divide en dos etapas: En la primera la probeta está saturada de agua, por lo que en su interior se mueve el agua líquida, que se evapora al llegar a la superficie exterior. Así, la velocidad de secado durante esta primera etapa será constante (y característica de cada tipo de piedra). La segunda etapa se produce cuando el contenido de agua en el interior de los poros es menor que cierto valor límite (contenido de agua crítico, también propio de cada tipo de material), lo que supone discontinuidades en la película de agua líquida, provocando que la salida del agua en forma de vapor se produzca desde el interior de la piedra. A partir de ese momento, la velocidad de secado cae significativamente y el contenido en agua se mantiene casi estable durante largo tiempo.

Los tratamientos suelen disminuir la velocidad de secado y aumentar el contenido en agua crítico, lo que supone que el agua se retenga durante más tiempo en el interior pudiendo provocar alteraciones.

➤ Procedimiento de ensayo:

El proceso será en un lugar con ausencia de corrientes de aire y a unas condiciones de temperatura y humedad controladas de unos 20°C y un 50% respectivamente.

Se saturan las muestras en agua a vacío para facilitar que se llenen por completo los poros. Una vez saturadas, se secan superficialmente con un paño y se pesan, colocándolas posteriormente en un soporte con rejilla para que a lo largo de toda su superficie se produzca la evaporación de igual forma. Cada cierto intervalo de tiempo (intervalos iguales), se pesan las probetas hasta alcanzar un equilibrio, es decir, que la diferencia entre una pesada y la anterior sea inferior a un 0,1%.

Los resultados obtenidos mostrarían una curva de evaporación relacionando el contenido en agua de la muestra en función del tiempo. La velocidad de evaporación del agua se puede calcular con la pendiente del tramo lineal, y el contenido de agua crítico será el contenido residual de agua (%) una vez alcanzado el equilibrio (Ontiveros Ortega & Villegas Sánchez, 2006)

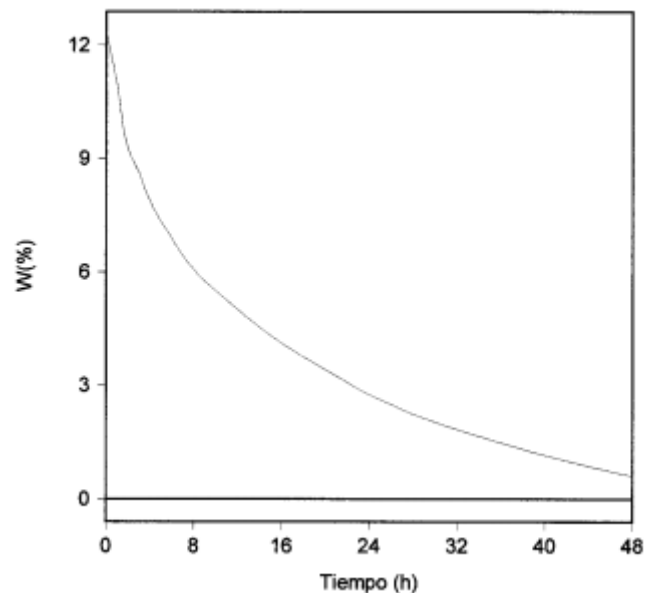


Ilustración 7: Curva de evaporación del agua (Ontiveros & Villegas, 2006, p.42)

3.2.4 Eficacia del tratamiento

Para determinar la eficacia de un tratamiento se mide alguna de las características principales que se quiere conseguir con su aplicación. Sin embargo, también hay que tener en cuenta el comportamiento de un tratamiento está supeditado a las condiciones ambientales. Por esta razón, el estudio de la eficacia de los tratamientos puede usarse para obtener información acerca de cuáles son las condiciones externas más adecuadas para su utilización.

Para tratamientos de **limpieza** y tratamientos de **extracción de sales**, la eficacia se valora realizando medidas en el propio edificio, y al completar el tratamiento, se toman muestras para que sean estudiadas en el laboratorio donde se determina la eliminación de suciedad de la capa superficial.

La eficacia de los tratamientos **biocidas** se determina cuantificando la cantidad de organismos presentes, mediante inspección visual o con microscopía óptica o electrónica, que posibilita el estudio a diferentes niveles de profundidad.

Los productos **hidrófugos** deberán impedir la entrada de agua desde el exterior, pero sin imposibilitar la

salida de vapor para evitar que se produzcan acumulaciones de agua en el interior. Por tanto, para medir la eficacia hay que estudiar propiedades que indiquen la facilidad o dificultad que pueda tener el agua para moverse a través de la piedra.

El principal mecanismo estudiado para ello es la absorción que puede medirse por inmersión (a presión atmosférica, a vacío, a presión, a ebullición) o por capilaridad:

- Por inmersión:

Este ensayo tiene como objetivo determinar la capacidad natural de la muestra para absorber agua. Esta absorción libre depende de dos factores principalmente: de las características del material y del tiempo de inmersión (resultando un comportamiento más homogéneo del material para tiempos de inmersión más altos).

El coeficiente de saturación se define como el cociente de el volumen de agua absorbida por la probeta durante 48 horas sumergida en agua a presión atmosférica entre el volumen total de poros. Esta relación se denomina *absorción de agua* según la norma ASTM/1978; según la norma RILEM (1980), en el caso de inmersión gradual durante el primer día, se denomina *coeficiente Mishwald*; para tiempos largos en los que se permite alcanzar valores de equilibrio, se denomina *capacidad de absorción* según la norma ICR (1981).

- Procedimiento de ensayo

Las probetas son sumergidas en agua destilada sobre un soporte que protege de cualquier contacto con la superficie, y se dejan a unos 21°C el tiempo necesario. Las probetas se van sacando, secando con un paño húmedo y pesando cada cierto periodo de tiempo, volviendo a introducir las probetas en el agua tras la pesada. Estas pesadas deberán realizarse cada vez más espaciadas en el tiempo a medida que avanza el ensayo. Cada pesada indica el peso húmedo de la probeta (M_i). El ensayo debe durar al menos 7 días, finalizando si al término de estos días la diferencia entre pesadas con 24 horas de espaciado es inferior al 1%.

Los resultados obtenidos, representando la variación del contenido en agua (% en peso) frente al tiempo, muestran una curva en la que se puede observar un carácter lineal al principio del ensayo. Con la pendiente de este tramo recto se obtiene la velocidad de absorción, característica de cada material. A partir de un determinado valor, la curva se hace asintótica coincidiendo con la saturación máxima $W(\text{max.})$ de la piedra.

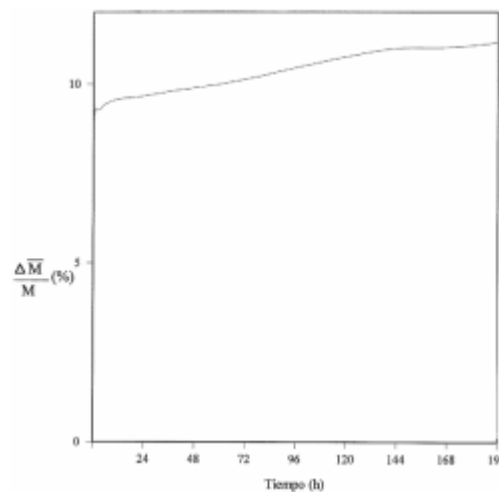


Ilustración 8: Contenido en agua (% p/p) en función del tiempo

La cantidad de agua absorbida se calcula como:

Ecuación 9: Cantidad de agua absorbida

$$W_i(\%) = \frac{M_i - M_0}{M_0} \times 100$$

El coeficiente de saturación (S_i) se calcula:

Ecuación 10: Coeficiente de saturación

$$S_i = \frac{M_i - M_0}{M_s - M_0} \times 100$$

Donde M_i es el peso en el tiempo t_i , M_s es el peso saturado M_0 el peso seco.

○ Por capilaridad:

La absorción capilar constituye el mecanismo principal de transporte de agua y sales, desde el exterior de la roca hasta el interior de ella por ósmosis y forésis. Mediante este ensayo se puede determinar la tendencia del material a permitir la entrada de agua por capilaridad y evaluar las posibles alteraciones debidas a ella.

Los problemas que asociados a la capilaridad se debe a:

- Cristalización de sales
- Acción de hidrólisis
- Oxidaciones e hidrataciones de los componentes minerales que conforman el material
- Circulación de agua en el interior de la piedra a través de los poros

La fuerza de succión que se experimenta al poner en contacto un material poroso con agua depende del diámetro de poro y de la naturaleza de la superficie del material. Teniendo en cuenta estas variables, se puede expresar la altura de ascenso capilar mediante la Ley de Javin:

Ecuación 11: Ley de Javin para el cálculo de la altura de ascenso capilar:

$$H = \frac{2 \cos \theta}{r \gamma}$$

Donde H representa la altura de ascenso capilar, θ el ángulo de contacto líquido-sólido, r el radio de poro y γ la viscosidad.

Es posible calcular también la cantidad de agua absorbida en un determinado periodo de tiempo por una probeta prismática inicialmente seca, que se pone en contacto con una superficie de agua libre:

Ecuación 12: Cantidad de agua absorbida por capilaridad:

$$m = A\sqrt{t}$$

Siendo m la cantidad de agua absorbida en Kg/m^2 , t el tiempo en segundos y A el coeficiente de absorción de agua.

- Procedimiento de ensayo:

Las probetas utilizadas deben ser de base plana y mantener una sección constante, siendo recomendables las formas cilíndricas o prismática, con su sección más larga perpendicular a la superficie del líquido. El ensayo se debe desarrollar en unas condiciones controladas de temperatura y humedad relativa, siendo éstas en torno a 20°C y 20% respectivamente. Se colocan las probetas en una bandeja donde previamente se ha introducido al fondo algún material poroso formando una delgada capa. Sobre esta capa se coloca un papel de filtro de al menos 1 cm de grosor. Se añade

agua destilada a la bandeja de forma que vaya rellenando la parte ocupada por el material poroso hasta llegar al papel. Con ayuda de un paño húmedo se secan las probetas y se realizan pesadas cada cierto tiempo, siendo aconsejable realizar el mayor número de pesadas en la primera hora. Se repiten las medidas hasta que la variación de peso sea mínima. Además, se mide la altura que alcanza el agua de las cuatro caras de la probeta y se realiza una media.

Los datos obtenidos se pueden representar en una curva que relaciona la variación de peso por unidad de superficie con la raíz cuadrada del tiempo:

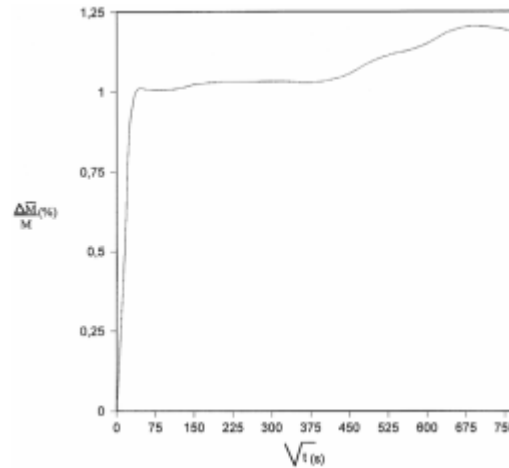


Ilustración 9: Absorción por capilaridad de una probeta expresada como la variación de la masa de agua en % respecto a la raíz del tiempo

Calculándose la variación de peso:

Ecuación 13: Variación de peso por capilaridad:

$$\Delta M_i (g/cm^2) = \frac{M_i - M_0}{S}$$

Donde M_i es el peso en el tiempo t_i , M_0 es el peso seco y S la superficie de absorción. (Ontiveros Ortega & Villegas Sánchez, 2006)

Además de los mecanismos vistos anteriormente para estudiar la capacidad que tiene una piedra para que el agua viaje por sus poros, podemos destacar otros dos ensayos que dan información sobre la hidrofugación superficial:

- Velocidad de absorción de gotas:

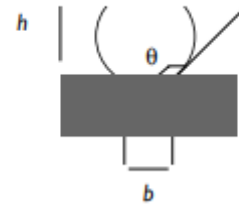
La velocidad de absorción de gota de agua es el tiempo necesario para que una determinada cantidad de agua sea absorbida por una superficie. Es un ensayo muy útil a la hora de evaluar el comportamiento hidrófugo de un tratamiento.

- Procedimiento de ensayo:

Para este ensayo se utiliza una probeta seca, con una superficie plana horizontal y lo suficientemente grande para separar las gotas de agua al menos medio centímetro. Se coloca una microbureta de 1 mL a 1 cm de la superficie de la muestra y se colocan gotas de 0,01 mL. El tiempo que tarde en ser absorbida será la velocidad de ensayo y se denomina t_x .

○ **Ángulo de contacto:**

Esta medida determina el grado de hidrorrepelencia de la superficie de un material. El ángulo de contacto de una gota de agua se define con la expresión siguiente, explicándose sus variables en la ilustración 10:



Ecuación 14: Ángulo de contacto de gota:

$$\operatorname{tg} \frac{\theta}{2} = \frac{2h}{b} \rightarrow \theta = 2 \cdot \operatorname{arctg} \left(\frac{2h}{b} \right)$$

Ilustración 10: Medida del ángulo de contacto de gota

Donde θ es el ángulo de contacto, h la altura de la gota y b la longitud de la base de contacto con la superficie.

- Procedimiento de ensayo:

Se mide la altura (h) y la anchura de la base en contacto (b) de cada probeta, repitiéndose al menos el procesamiento 5 veces por probeta. Una vez calculado el ángulo de contacto de cada prueba, se realiza una media. (Ontiveros Ortega & Villegas Sánchez, 2006)

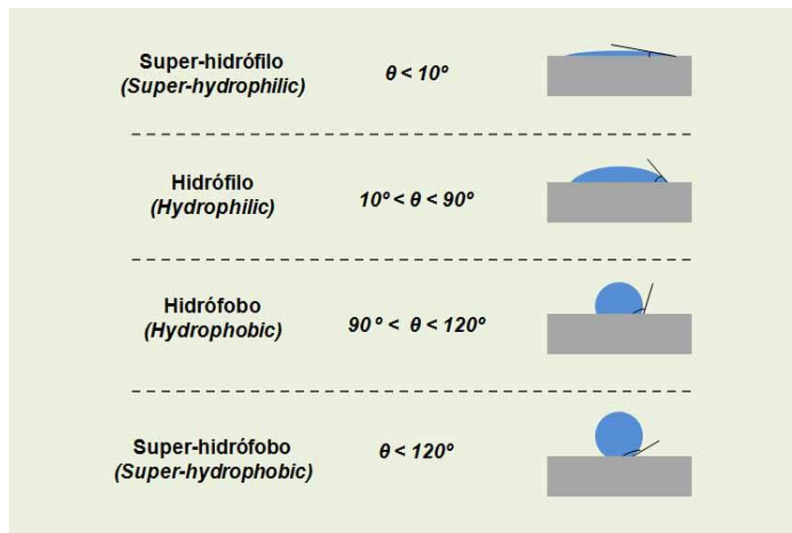


Ilustración 11: Hidrorrepelencia en función del ángulo de contacto de la gota de agua (ATRIA Innovation, 2016)

En cuanto a los **consolidantes**, ya que su finalidad principal es restaurar o mejorar la cohesión del material, se evalúa su eficacia estudiando la modificación de características mecánicas:

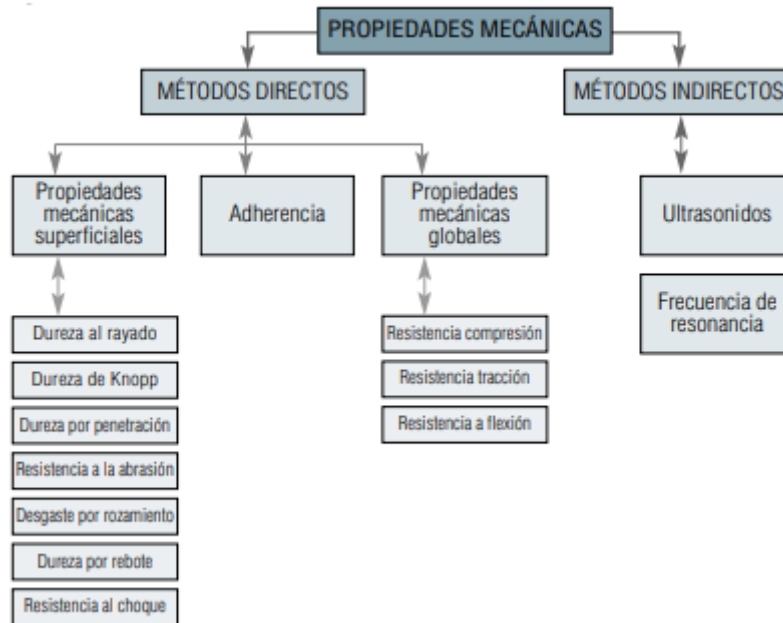


Ilustración 12: Ensayos para determinar las diferentes propiedades mecánicas de un material (Ontiveros Ortega & Villegas Sánchez, 2006)

Hay dos grandes grupos de métodos para medir las propiedades mecánicas: los métodos directos y los métodos indirecto. Entre los primeros se pueden encontrar ensayos como los de resistencia a la compresión, a la tracción, a la flexión, etc., pero no se suele recurrir ellos debido a su carácter destructivo sobre la pieza y al requerimiento de varias probetas de gran tamaño. Por el contrario, los métodos indirectos son muy empleados a la hora de evaluar la eficacia de un consolidante.

Los ensayos indirectos que se pueden llevar a cabo para la determinación de las propiedades mecánicas de un material son:

- Velocidad de propagación del sonido: Ultrasonidos

Es la técnica no destructiva más empleada en los ensayos realizados para analizar los materiales del Patrimonio, pudiendo detectar propiedades tanto en el seno como en la superficie de un material. Se utilizan vibraciones elásticas con frecuencias de onda superiores a los 20 KHz, rango de frecuencias imperceptible para el oído humano.

Para la propagación de estas ondas ultrasónicas es necesario un medio material que lo permita. Al actuar una fuerza externa sobre una partícula del material, ésta se desplaza de su posición de equilibrio propiciando el movimiento de otras partículas adyacentes a ella. Esto da lugar a una reacción en cadena que permite dicha propagación. Existen dos tipos de ondas:

- Internas: se propagan en el interior de los materiales. Son de tipo longitudinal, propagándose paralelas al avance de la onda y tienen mayor velocidad que las siguientes.
- De superficie: como su nombre indica, se propagan en la superficie y su dirección de transmisión es perpendicular a la propagación de la onda.

Esta técnica está muy desarrollada en materiales cerámicos y metales, con alta conductividad ultrasónica y distancias cortas de recorrido de onda. Se usa también en materiales como rocas ornamentales, pero se aplica con mayor dificultad por su baja conductividad y por la mayor distancia de recorrido de las ondas.

Las ondas ultrasónicas experimentan fenómenos de reflexión, refracción y difusión, dependiendo de la impedancia acústica del medio. Por este motivo, cuando el haz de ultrasonido encuentra una superficie

que separa dos materiales con diferente impedancia, el haz se divide en los 3 fenómenos anteriores. La impedancia de un medio se calcula mediante la siguiente expresión:

Ecuación 15: Calculo de la impedancia

$$Z = C \cdot \rho$$

Donde Z es la impedancia, C la velocidad de propagación de la onda y ρ la densidad del material por el que se transmite.

- Procedimiento de ensayo:

Conforme recoge la norma UNE 14579/05 para la determinación de la velocidad de propagación de las ondas ultrasónicas a través de la piedra natural, se deben tomar muestras de forma regular (diámetro mínimo de 5 cm para probetas cilíndricas y sección mínima de 7 x 7 cm para paralelepípedos). La esbeltez de las probetas debe oscilar entre 1 y 4, utilizando un número de probetas no inferior a 5.

Se colocan los palpadores del emisor y del receptor en tres configuraciones diferentes: en caras opuestas, en caras contiguas y en la misma cara.

La velocidad de propagación se calcula:

Ecuación 16: Velocidad de propagación de los impulsos ultrasónicos:

$$v = \frac{L}{t}$$

Donde v es la velocidad a calcular, L la longitud del camino recorrido en metros y t el tiempo de propagación en segundos. (Ontiveros Ortega & Villegas Sánchez, Programa de normalización de estudios previos y control de calidad de las intervenciones. Propiedades mecánicas 2ª Parte, 2006)

Para estudiar el comportamiento de los tratamientos consolidantes las propiedades mecánicas superficiales pueden proporcionar más información que las anteriores, ya que los productos aplicados suponen una fina capa en la superficie de la piedra. Las más empleadas son:

- Dureza al rayado:

Este ensayo está basado en la propiedad de los materiales de rayar o ser rayado. Para determinar esta propiedad, se evalúa la presión requerida para realizar un rayado, así como por el tamaño de rayado bajo una carga fija. Esta técnica tiene 3 limitaciones principales: se necesitan un gran número de medidas en una misma probeta, no se puede aplicar sobre materiales demasiado duros y son difíciles de normalizar. Para su normalización se emplea el aparato de Martens.

- Procedimiento de ensayo:

El aparato de Martens se compone de un pequeño carro que se desplaza sobre dos ruedas arañando la probeta con una punta de acero tratada o de diamante de forma piramidal. El proceso se efectúa con un ángulo de 90° en la punta, sobre la cual se deja actuar una carga determinada. Se realiza un total de cien medidas por cada tipo de piedra sobre un mínimo de 5 muestras y posteriormente se calcula la media.

- Dureza a la abrasión:

Este método se utiliza para saber la resistencia de un material a las pisadas, la cual depende de la dureza de los componentes del material y de la fortaleza de las uniones entre ellos.

El ensayo de dureza viene normalizado por la normal ASTM C448-64, mediante la cual:

El aparato consta de una pista de rozamiento que gira a una velocidad mínima de 1 m/s; 2 portaprobetas solidarios a los ejes de deslizamiento y diametralmente opuestos sobre el bastidor, centrado sobre la superficie de rozamiento; un dispositivo que permite comprimir las probetas entre los platos; otro que permite verter de manera uniforme el abrasivo, y agua en la superficie de rozamiento. Las probetas se someten a un recorrido de mil metros, tras lo cual se extraen de la máquina y se limpian. Se requiere al

menos dos probetas de 7 cm de arista, Se determina su volumen inicial mediante pesada hidrostática y la superficie a desgastar con un calibre.

El resultado se puede expresar mediante la expresión:

Ecuación 17: Desgaste lineal por abrasión:

$$D = \frac{v_i - v_f}{A}$$

Donde v_i es el volumen inicial, v_f el volumen final y A la superficie de las caras de las probetas en contacto (en mm) (Ontiveros Ortega & Villegas Sánchez, 2006).

3.2.5 Resistencia al deterioro: Ensayos de alteración acelerada

Tras la aplicación de los ensayos anteriores para medir sus características, se deben someter las probetas a ensayos de alteración acelerada en los que se recrean las condiciones reales a las que estará expuesta la obra. Nacen de la necesidad de disminuir los plazos para obtener cambios en las características con respecto a ensayos a la intemperie. Aunque también se somete la probeta a las circunstancias reales, el grado de alteración es muy pequeño. Por eso se reproducen artificialmente, obteniendo grados de alteración mayores en menos tiempo.

Una de las limitaciones que tienen estos ensayos es que pueden no representar fielmente la situación real, ya que se aplican ensayos aislados para cada factor de alteración, sin tener en cuenta efectos sinérgicos de distintos factores. Ante esto, muchos autores realizan ciclos en los que van alternando distintos factores de alteración, y así acercarse lo máximo posible a la superposición de posibles acciones de deterioro real. (Villegas Sánchez, 2003)

Para cada estudio, se debe seleccionar los ensayos con una relación más directa con las características del ambiente donde se encuentre la piedra. Estos ensayos se valoran de la siguiente manera (Esbert, Ordaz, Alonso, & Montoro, 1997):

- Observación antes, durante y después del tratamiento de la morfología de las probetas objeto de ensayo.
- Descripción de las modificaciones y su posible relación con los ciclos.
- Pérdidas de materiales durante y tras los ensayos.
- Comparación de las propiedades físicas que se han seleccionado, antes y después de realizar el ensayo.

Existen cinco tipos básicos de ensayos acelerados (Villegas Sánchez, 2003):

- Heladicidad
- Cristalización de sales
- Ciclos termohigrométricos
- Ensayos de radiación UV
- Ataque químico con soluciones o atmósferas contaminadas

- Heladicidad:

Este ensayo persigue reproducir las condiciones climáticas a las que está sometida la piedra o crear condiciones más severas para así obtener resultados con mayor brevedad, permitiendo así estudiar daños causados por el hielo.

Se trata de un ciclo en el que se incluye una etapa de hielo y otra de deshielo. La primera se lleva a cabo al aire con la muestra saturada de agua, y se recrean temperaturas bajas, en torno de -15°C a -25°C . La segunda se realiza o al aire o en agua, variando la temperatura desde 1°C a la temperatura ambiente. Cada 5 ciclos se secan las probetas a 65°C y se evalúan. (Villegas, 2000)

La evaluación suele realizarse mediante pesadas de la muestra, debido a una posible pérdida de peso, y mediante observación, ya sea a simple vista o con microscopio, mediante la cual encontrar alguna fisura provocada por el hielo.

“En muchas ocasiones, después de un número relativamente elevado de ciclos no se manifiestan alteraciones macroscópicas, debiendo medirse posteriormente diversas características del material para determinar el efecto del ensayo” (Mavrov 1983, Villegas 2000).

A continuación, en la Ilustración 13, siguiendo las indicaciones anteriores, se expone un ejemplo de los resultados obtenidos al comparar la absorción de un material antes y después de este ensayo.

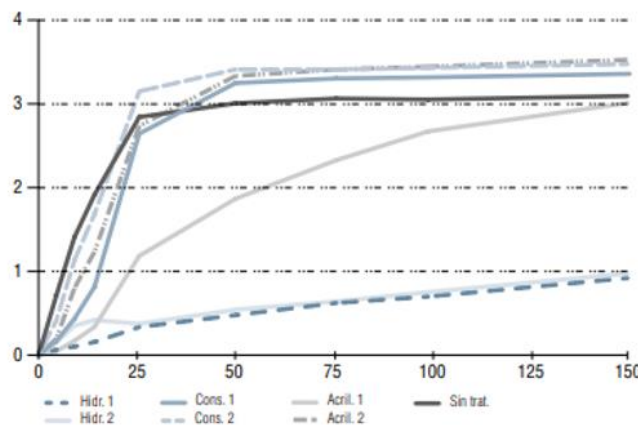


Ilustración 13: Absorción de agua (en % en peso) antes (1) y después (2) del ensayo de heladicidad frente al tiempo (en horas)

- Cristalización de sales

Mediante este ensayo se persigue simular las tensiones creadas en el interior de los poros de la piedra debido a las dilataciones que provocan la cristalización o la hidratación de sales, pudiendo llegar a romperse la piedra. Se realizan sucesivas inducciones de cristalización y solubilización de una sal en el interior de una muestra. Para ello se impregna la probeta de sal y posteriormente se seca, repitiéndose el ciclo un número determinado de veces. Esta impregnación puede darse por inmersión, capilaridad o niebla salina.

Las sales más comunes son los sulfatos (principalmente el sulfato sódico SO_4Na_2), los cuales cristalizan con un gran número de moléculas de agua (por ejemplo, el sulfato sódico se une con 10 moléculas de agua para formar $\text{SO}_4\text{Na}_2 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$), provocando un fuerte aumento de volumen con respecto al de la sal inicial. El sulfato sódico está altamente indicado para simular este tipo de situaciones, ya que su volumen experimenta un crecimiento del 308%.

Mientras que las concentraciones no influyen en la severidad del ensayo, la temperatura sí es una variable muy determinante, ya que su cristalización se produce a bajas temperaturas.

Para el secado existen dos opciones: realizarlo a 65°C , lo que conlleva que el tiempo para lograr el secado

sea largo pudiendo ser más que la del propio ciclo, o a 105°C se pueden degradar las muestras con tratamientos orgánico debido a la alta temperatura.

Para acelerar el proceso se puede trabajar a vacío. Resulta importante conseguir la eliminación total del agua antes de realizar el siguiente ciclo. (Villegas, 2003)

Para llevar un control de cualquier alteración que pueda aparecer a lo largo del ciclo, se puede actuar con alguno de los siguientes métodos (Villegas, 2000):

- Observación visual de las alteraciones macroscópicas.
- Variación de peso de las muestras.
- Variación en las propiedades físicas: porosidad, porometría.
- Variación de las propiedades mecánicas.
- Variación de las propiedades hídricas para el caso de probetas hidrofugadas.

○ Ciclos termohigrométricos

Estos ensayos sirven para estudiar los efectos de los cambios de temperatura y humedad sobre los materiales pétreos.

Existen 3 formas para conseguir reproducir una determinada situación de humedad:

- Mediante una cámara climática, exponiendo la probeta a una atmósfera húmeda relativa elevada.
- Por inmersión en agua normalmente a temperatura ambiente.
- Con niebla, manteniendo las proximidades de la muestra y ésta misma a una temperatura inferior a la del resto del ambiente, para provocar condensaciones.

Aunque normalmente se persigue alcanzar el equilibrio en estos ciclos, en el caso de los termohigrométricos son muy poco severos y muy lentos, por lo que la mayoría de las piedras no se alteran en estas condiciones.

Normalmente no se producen alteraciones macroscópicas, por lo que para evaluar los resultados debe recurrirse a determinar las propiedades físicas, hídricas y mecánicas y ver las variaciones sufridas.

En la figura siguiente se recogen las curvas de absorción de agua por inmersión para probetas de arenisca de Constantina (Sevilla) tratadas con diferentes productos, antes y después de un ensayo. Se puede apreciar cómo ningún producto cambia su comportamiento, lo cual es frecuente dada la suavidad de este ensayo. Aquí no se produjeron alteraciones macroscópicas (Villegas 2000).

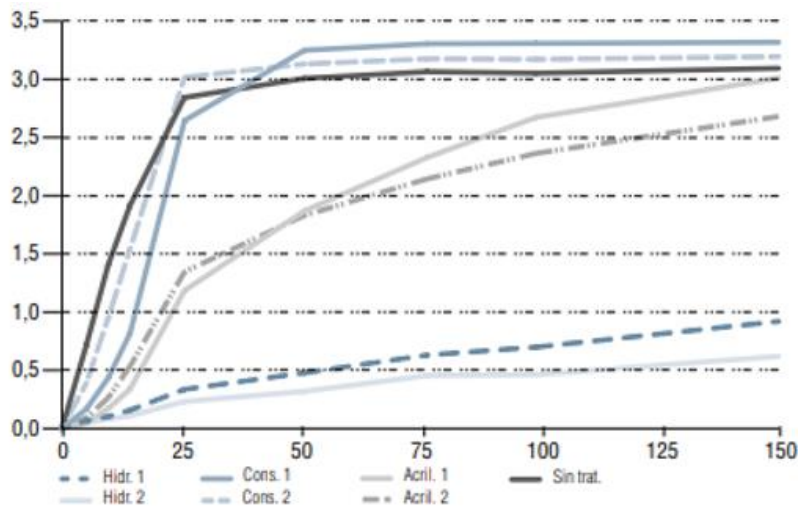


Ilustración 14: Absorción de agua (en % en peso) antes y después del ensayo termohigrométrico frente al tiempo (en horas) (Villegas, 2000)

- Ensayos de radiación UV

En estos ensayos se determina como actúa la radiación sobre los materiales, en especial aquellos que llevan tratamiento de tipo orgánico. Se emplea radiación con una energía justa para alterar sólo determinados enlaces químicos presente en compuestos orgánicos. Los inorgánicos no se ven afectados.

La mayoría de las veces este ensayo se reduce a la aplicación de radiación UV sobre una pieza durante un periodo prolongado de tiempo. También es frecuente verlo combinado con un ciclo termohigrométrico.

La evaluación de los resultados se realiza determinando las variaciones en las propiedades de las muestras, ya que no aparecen alteraciones macroscópicas.

- Ataque químico con soluciones (atmósferas simuladas):

Estos ensayos se centran principalmente en exponer a la piedra a agentes existentes en el medio como consecuencia de la contaminación, que sumado a los a los agentes meteorológicos, multiplican la velocidad de deterioro. Los agentes contaminantes más peligrosos son aquellos capaces de reaccionar con los compuestos de la piedra, como los gases ácidos.

Cuando se comenzaron a investigar estos agentes se le prestó mucha atención al anhídrido sulfuroso, capaz de formar ácido sulfúrico en contacto con la piedra. Pero en la actualidad se estudian otros tipos de contaminantes como los óxidos o ácidos de nitrógeno.

Una forma aproximada de simular estos ataques químicos es simular el ataque químico con soluciones que contengan ácido sulfúrico en distintas concentraciones. Las soluciones se pueden aplicar tanto por inmersión como por capilaridad. Lógicamente la acción que hace el líquido sobre la piedra no será igual que cuando el agente contaminante se encuentre en forma gaseosa.

Para solucionar esto y acercarse más a la situación real se emplean nieblas o lluvias ácidas. Estos ensayos se llaman ensayos en atmósferas contaminadas. Éstos están más próximos a la realidad, pero rara vez se aplica simultáneamente otro contaminante.

La humedad de las muestras es un factor muy importante, ya que los ensayos, en su gran mayoría, se desarrollan con humedades relativas altas y pulverizando agua para simular la lluvia.

Se ha desarrollado un sistema que permite simular la acción de todos los factores de alteración, siendo de este modo el tipo de ciclo que mejor reproduce las condiciones reales de exposición. Permite la generación

de atmósferas contaminantes, controlado las variables ambientales y permitiendo el empleo de radiación UV. (Villegas Sánchez, 2003)

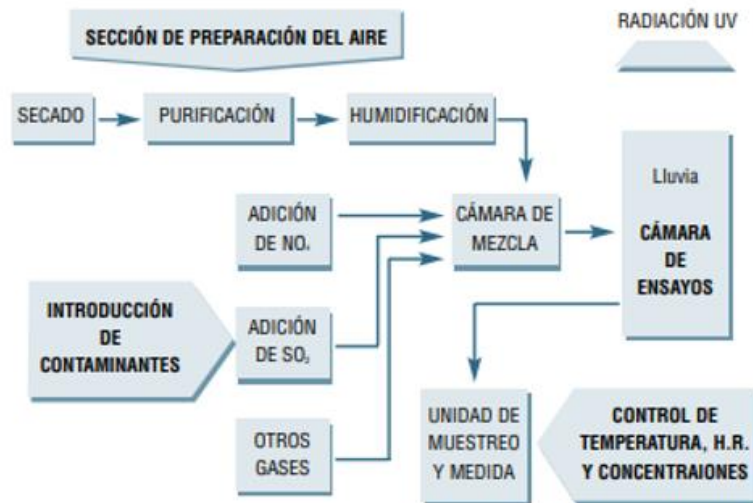


Ilustración 15: Esquema de cámara de simulación de atmósferas contaminadas (Adaptación de Vale, 1982)

4 BIOMINERALIZACIÓN: BACTERIAS CAPACES DE PRODUCIR CARBONATO DE CALCIO

4.1 INTRODUCCIÓN

La aplicación de microbios al patrimonio siempre ha estado asociada a una acción destructiva, por lo que se ha dejado de lado su potencial papel como contribuyentes en la protección y conservación de monumentos. Sin embargo, en los últimos años se ha ido reconociendo el papel de estos microorganismos en la restauración del patrimonio y la piedra. (Dakal & Cameotra, 2012).

Las bacterias son capaces de modificar la química de su entorno por la liberación de metabolitos, como resultado de su metabolismo natural. Esto, junto con la contribución de estructuras (células, membranas, restos celulares, etc.) que funcionan como núcleos de cristalización, dan lugar a la formación del mineral. Estos minerales pueden ser de tipos muy diversos, así como los materiales que pueden consolidarse con ellos. (González-Muñoz, 2008)

La primera vez que se utilizaron bacterias para la conservación del patrimonio cultural se llevó a cabo por un grupo francés pionero que desarrolló una tecnología llamada Calcite Bioconcept. Esta nueva tecnología consistía en la aplicación de cepas de cultivo biocalcificantes que se pulverizaban sobre la superficie de la piedra y se alimentaban posteriormente mediante un medio de cultivo. Como resultado obtuvieron la aparición de una capa calcárea que revestía la piedra llamada biocalcina. Este revestimiento estaba formado por CaCO_3 mezclado con los propios cuerpos bacterianos.

Para conseguir un mayor rendimiento, se realizó un cribado preliminar de bacterias aisladas de entornos de carbonato natural, lo cual permitió seleccionar la cepa de *Bacillus cereus*, que producía la amonificación de aminoácidos (Castanier et al., 2000). La primera aplicación de esta bacteria se realizó sobre un área de 50 m² en la torre de la iglesia de Saint Médard en Thours, en 1993, y se obtuvieron resultados muy satisfactorios: no había variaciones de color y de otras características externas, mientras que la absorción de agua fue cinco veces menor. Además, Clacite Bioconcept Company se encargó de tratar las fachadas de muchos edificios históricos franceses. Por otro lado, otros grupos de investigación han realizado estudios para mejorar el método anterior con diferentes microorganismos, en diferentes condiciones y con diferentes vías metabólicas, obteniéndose resultados similares.

Sin embargo, estos métodos presentaban los siguientes inconvenientes: la capa fina del nuevo biocemento, la posible formación de endosporas y la obstrucción de los poros de la piedra por una biopelícula incontrolada de *Bacillus*.

A lo largo de las últimas dos décadas, la Universidad de Granada ha estado desarrollando y mejorando esta tecnología, consiguiendo solucionar los problemas presentados hasta la fecha en los estudios anteriores. Promueven el uso de *Mixococcus xanthus*, una bacteria gramnegativa, no patógena (en sustitución de *Bacillus*), aplicada junto a nutrientes que activan la amonificación de aminoácidos (Rodríguez Navarro et al. 2003). El resultado es un cemento de carbonato coherente, formado de granos de calcita en los poros, pero sin taponarlos, a una profundidad de más de 500 micras. Además, no se encontraron mixosporas en los

medios de cultivo probados.

El desarrollo de este método dio un paso más con la tecnología propuesta por Jiménez-López et al. en 2007, que propuso la bioprecipitación del carbonato de calcio fomentada por la propia comunidad bacteriana que habitaba la piedra, con la ventaja de no tener que introducir microorganismos exógenos. Inicialmente, las losas de piedra caliza porosa de la cantera se sumergieron en una solución tamponada nutritiva M-3P con/sin *M. xanthus* (Jimenez-Lopez et al., 2008). En las muestras tratadas se pudo comprobar un crecimiento muy elevado de CaCO_3 , sin que los poros se hubiesen taponado, lo que significa que no es necesaria la introducción de bacterias externas para la precipitación del carbonato. Al evaluar la resistencia a la tensión mecánica, estas muestras resultaron más resistentes que las probetas esterilizadas de control, manteniendo la distribución de tamaños.

El tratamiento con medio de cultivo M-3P se probó in situ, con y sin *M. xanthus*, sobre piedra calcarenita en descomposición, en: Monasterio de San Jerónimo, Hospital Real y Capilla Real (roundi et al., 2010; Rodríguez -Navarro et al., 2015). Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento similar al de las pruebas de laboratorio. Se comprobó un incremento de la población bacteriana después de la aplicación del tratamiento, que con el tiempo alcanzó valores similares a los registrados previamente al tratamiento. (Narvasi, Mastromei, & Perito, 2020)

La gran mayoría de microorganismos empleados en restauración precipitan carbonato cálcico, independientemente del grupo taxonómico al que pertenezcan. A continuación, se adjunta la Tabla 5, en la que se reflejan los tipos de microorganismos empleados en restauración (Dakal & Cameotra, 2012):

| No. | Organisms | Phylum | Role/Applications | References |
|-----|-------------------------------------|------------|---|--|
| 1 | <i>Bacillus amillo-liquifaciens</i> | Firmicutes | Conservation of ornamental stones | Lee 2003 [51] |
| 2 | <i>Bacillus cereus</i> | Firmicutes | Biocement (Biocalcin) formation and limestone consolidation | Orial et al. 1993 [52] Casteneir et al. 2000 [18] |

| | | | | |
|----|------------------------------------|----------------|--|--|
| 3 | <i>Bacillus lentus</i> | Firmicutes | Biocement (Biocalcin) formation and limestone consolidation | Dick et al. 2006 [53] Sarda et al. 2009 [40] |
| 4 | <i>Bacillus megaterium</i> | Firmicutes | Calcite Precipitation | Cacchio et al. 2003 [34] |
| 5 | <i>Bacillus pasteurii</i> | Firmicutes | Biocement formation and consolidation of sand column and repair of concrete cracks | Sarda et al. 2009 [40] |
| 6 | <i>Bacillus pumilus</i> | Firmicutes | Calcite precipitation | Baskar et al. 2006 [21] |
| 7 | <i>Bacillus sphaericus</i> | Firmicutes | Concrete consolidation Biocement (Biocalcin) formation | Hammes et al. 2003 [20] Muyneck et al. 2008a, b [17, 24] Dick et al. 2006 [53] |
| 8 | <i>Bacillus thuringiensis</i> | Firmicutes | Calcite precipitation | Baskar et al. 2006 [21] |
| 9 | <i>Bacillus subtilis</i> | Firmicutes | Reduction in water absorption of "Pietra di Lecce", a calcareous stone thereby rendering consolidation | Tiano et al. 1999 [14] |
| 10 | <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> | Proteobacteria | Removal of black crust from marble surface | Gauri et al. 1992 [54] |
| 11 | <i>Desulfovibrio vulgaris</i> | Proteobacteria | Removal of black crust from marble surface | Cappitelli et al. 2007 [12] |
| 12 | <i>Halobacillus trueperi</i> | Proteobacteria | Biominalization | Rivadeneira et al. 2004 [55] |
| 13 | <i>Morcella sp.</i> | Ascomycetes | Formation of carbonate concretions | Masaphy et al. 2009 [56] |
| 14 | <i>Myxococcus xanthus</i> | Proteobacteria | Consolidation of ornamental stones Bioconservation of cultural heritage structures | Rodriguez-Navarro et al. 2003 [57] Jroundi et al. 2010 [30] |
| 15 | <i>Pseudomonas cepacia</i> | Proteobacteria | Biocleaning, restoration and removal of animal glue from fresco | Ranalli et al. 2005 [5] |
| 16 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Proteobacteria | Biocleaning and restoration of fresco Calcite precipitation | Anderson et al. 1992 [58] Ranalli et al. 2005 [5] |

| | | | | |
|----|-------------------------------------|----------------|--|------------------------------|
| 17 | <i>Pseudomonas halophila</i> | Proteobacteria | Calcite precipitation | Rivadenerya et al. 2006 [59] |
| 18 | <i>Pseudomonas flavescens</i> | Proteobacteria | Biocleaning, restoration and removal of animal glue from fresco | Ranalli et al. 2005 [5] |
| 19 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> | Proteobacteria | Biocleaning, restoration and removal of animal glue from fresco | Ranalli et al. 2005 [5] |
| 20 | <i>Rhodococcus erythropolis</i> | Actinobacteria | Consolidation of "Pietra di Lecce", a calcareous stone | Sprocati et al. 2008 [60] |
| 21 | <i>Thiobacillus sp.</i> | Proteobacteria | Removal of fouled layer of lichen from weathered concrete specimens | De Graef et al. 2005 [61] |
| 22 | <i>Pseudomonas and Bacillus sp.</i> | Proteobacteria | Removal of phenantrene deposit from weathered stones | Saiz-Jimenez, 1997 [62] |
| 23 | <i>Pseudomonas sp.</i> | Proteobacteria | Removal of nitrates from the weathered stones | Ranalli et al., 1997 [63] |
| 24 | <i>Pseudomonas sp.</i> | Proteobacteria | Limestone consolidation | Zamarreño et al., 2009 [35] |
| 25 | <i>Acinetobacter</i> | Proteobacteria | Limestone consolidation | Zamarreño et al., 2009 [35] |
| 26 | <i>Micrococcus</i> | Actinobacteria | Reduction in water absorption of "Pietra di Lecce", a calcareous stone thereby rendering consolidation | Tiano et al., 1999 [14] |

Tabla 5: Bioprotectores de los monumentos patrimoniales (Dakal & Cameotra, 2012)

Las bacterias del filo Firmicutes, principalmente, *Bacillus*, producen una precipitación de carbonato cálcico impulsado por la ayuda de la enzima ureasa, operando anaeróbicamente. La precipitación formada recibe el nombre de Biocemento.

Entre las pertenecientes al filo Proteobacteria, se encuentran reductoras de sulfato y azufre (reduciendo a sulfuro) y reductoras de nitrato (reduciendo a nitrógeno gaseoso o a óxido nítrico). Esta característica es muy útil en multitud de situaciones, como por ejemplo, en las estatuas de mármol que se encuentran a la intemperie, vulnerables a las adversidades ambientales y a la lluvia ácida. El ácido sulfúrico de la lluvia ácida reacciona con el carbonato cálcico del mármol y lo transforma en sulfato cálcico dihidratado, más conocido como yeso. Gauri y colaboradores comprobaron el papel de las bacterias reductoras de sulfato en la eliminación de las incrustaciones de yeso de una estatua de mármol al convertir el yeso en calcita. (Dakal & Cameotra, 2012).

4.2 PROCESO DE BIOMINERALIZACIÓN

La mineralización de carbonato de calcio bacteriano está regulada por cuatro factores clave (Narvasi, Mastromei, & Perito, 2020):

- Concentración de calcio.
- Concentración de carbono inorgánico disuelto.
- Grado de acidez o alcalinidad del medio.
- Disponibilidad de sitios de nucleación.

El principal tipo de bacterias empleadas en los procesos de biomineralización son las mixobacterias (bacterias gramnegativas que se deslizan por el suelo). Las células de estas mixobacterias son bastones largos y delgados con una longitud de 3-12 μm y un diámetro de 0,7-1,2 μm (Ilustración 16a). Son especialmente abundantes en suelos ricos en materia orgánica como suelos cultivados y madera en descomposición. Las mixobacterias viven formando grandes comunidades conocidas como enjambres y se alimentan degradando una gran variedad de macromoléculas como proteínas, almidón, lípidos, ácidos nucleicos e incluso celulosa ya que producen una gran variedad de sustancias hidrolíticas extracelulares. Además, disponen de recursos de adaptación al medio que le permiten sobrevivir. Si el medio tiene suficiente aporte de nutrientes siguen un ciclo de vida vegetativo en el que las células se alargan y se dividen por fisión binaria dando lugar a dos células hijas. Por el contrario, cuando las condiciones son adversas y no disponen de los nutrientes necesarios, las células inician un ciclo de desarrollo, que es muy singular entre los procariontes: las células dentro de un enjambre se mueven hacia ciertos puntos originando estructuras multicelulares, que se conocen como cuerpos fructíferos, observables a simple vista (Ilustración 16b). Dentro de los cuerpos fructíferos, las células se diferencian y originan mixosporas, etapas latentes y resistentes a diversas condiciones de estrés como la desecación, la irradiación UV y la sonicación. (Jiménez-López, Jroundi, Rodríguez-Gallego, Arias, & González-Muñoz, 2007)

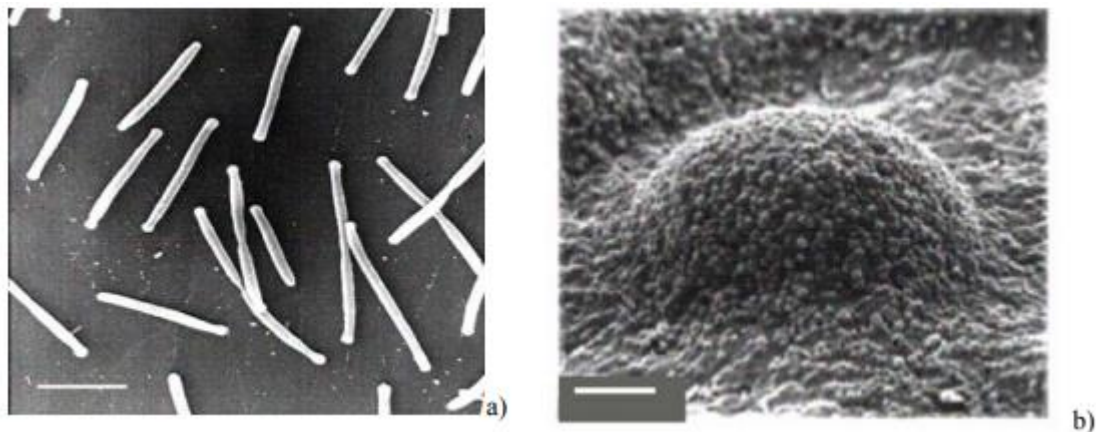


Ilustración 16: a) Microfotografía de microscopía electrónica de barrido (SEM) de células vegetativas de *Myxococcus xanthus*. (La barra representa 2 μm). b) Microfotografía SEM de un cuerpo fructífero de *M. xanthus*. (La barra representa 10 μm)

4.2.1 Producción de carbonatos:

Los dos tipos de polimorfos más comunes del carbonato de calcio son la calcita y la aragonita. Sin embargo, se ha descubierto recientemente, gracias a ensayos en laboratorio, que la formación de vaterita es más común de lo que se creía. Pero no es el único descubrimiento al que se ha llegado: la vaterita puede conducir a una mejor comprensión de la mineralización del carbonato procedente microbiano y ayudar a detectar indicios de vida, tanto en la Tierra como en otros planetas. Además, puede solucionar el problema del polimorfismo del carbonato de calcio, ya que se ha demostrado que *M. xanthus* tiende a inducir la precipitación de vaterita principalmente, el polimorfo más estable del carbonato de calcio (Jiménez-López, Jroundi, Rodríguez-Gallego, Arias, & González-Muñoz, 2007).

La vaterita inducida por *A. xanthus* muestra una morfología esférica y similar a la de las lentejas, como se muestra en la siguiente ilustración:

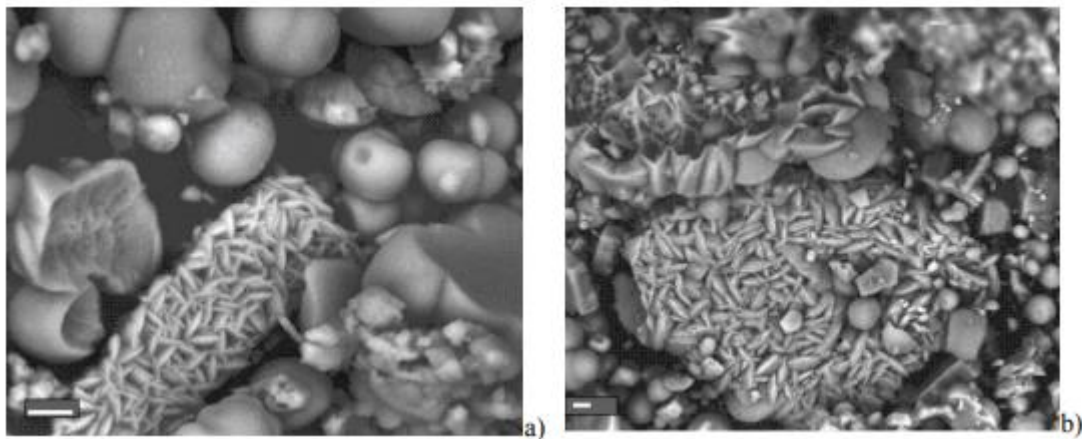
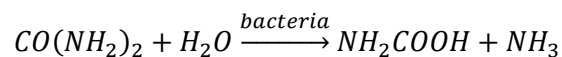


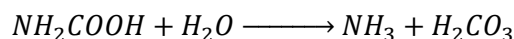
Ilustración 17: a) y b) Microfotografías SEM de cristales de vaterita inducidos por M. xanthus en medio de cultivo M3-P. (La barra representa 5 µm). La vaterita muestra una morfología esférica y una apariencia similar a la de las lentejas.

El mecanismo de precipitación de carbonatos más sencillo de controlar que permite producir grandes cantidades en poco tiempo es a través de la hidrólisis de la urea, llevado a cabo por bacterias ureolíticas. Durante la actividad de la ureasa microbiana, se produce la reacción intracelular que se expone a continuación, en la cual un mol de urea se hidroliza a 1 mol de amoníaco y 1 mol de carbamato, que se hidroliza espontáneamente para formar ácido carbónico y otro mol adicional de amoníaco (Dhami, Sudhakara Reddy, & Mukherjee, 2013).

Ecuación 18: Hidrólisis de la urea 1:

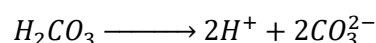


Ecuación 19: Hidrólisis de la urea 2:

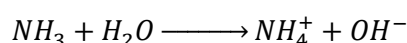


Los productos resultantes se equilibran en agua, formándose así 1 mol de amonio y aniones de hidróxido que se traducen en un aumento del pH del medio, y el carbonato reacciona con calcio para formar el carbonato de calcio en esas condiciones de alcalinidad, según las siguientes ecuaciones:

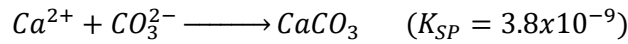
Ecuación 20: Formación de carbonato a partir de ácido carbónico:



Ecuación 21: Formación de aniones de hidróxido que elevan el pH del medio:



Ecuación 22: Formación de carbonato de calcio a partir de carbonato. (Ksp es la constante del producto de solubilidad):



Existen algunas cepas microbianas aerobias gramnegativas que solo pueden utilizar aminoácidos como su única fuente de energía para iniciar la biomineralización del carbonato de calcio. Como se muestra en la Ilustración 18, el dióxido de carbono y el amoníaco se producen por desaminación oxidativa de aminoácidos. El amoníaco (ecuación 21) aumenta la alcalinidad en el microambiente alrededor de la célula, mientras que el CO₂ se disuelve y se transforma en HCO₃⁻ o CO₃²⁻ a un pH más alto. Aquí también, la presencia de calcio y un ambiente alcalino favorece la precipitación de carbonato cálcico por nucleación heterogénea en las paredes celulares bacterianas (Rodríguez-Navarro et al. 2003).

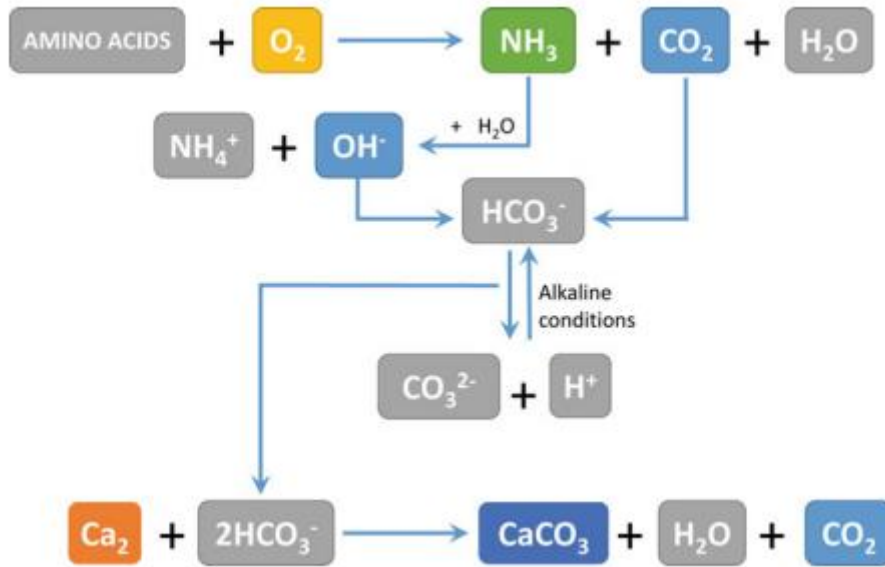


Ilustración 18: Proceso de bioprecipitación de carbonato cálcico a partir de aminoácidos (Jroundi, Gonzalez-Muñoz, & Rodríguez-Navarro, 2021)

Se atribuye a las bacterias que su principal función es crear el ambiente alcalino para favorecer la reacción principal a través de diversas actividades fisiológicas. Pero lo cierto es que, además de esta función, también es importante para la precipitación del calcio: las bacterias contienen en su superficie grupos cargados negativamente, lo que, a un pH neutro, haría que los iones metálicos con carga positiva se unan a ella, favoreciendo la nucleación heterogénea (Bäuerlein, 2003). De esta forma, los cristales de carbonato se desarrollan sobre la pared externa de las células bacterianas por estratificación sucesiva. Tras un tiempo, la célula bacteriana queda encapsulada, limitando la transferencia de nutrientes y acabando en la muerte celular.

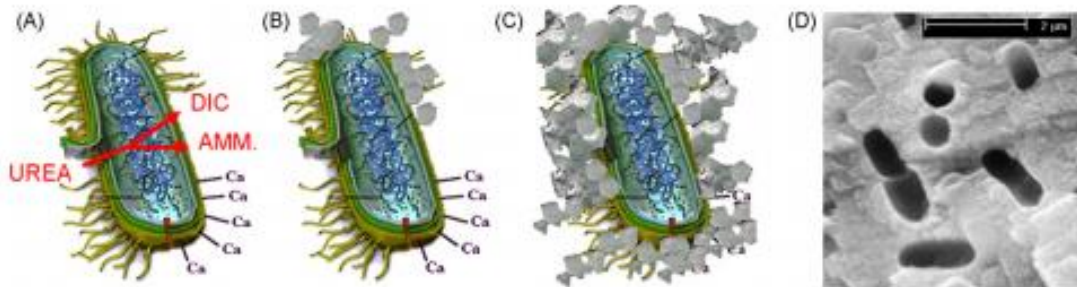
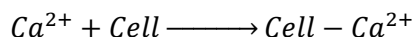


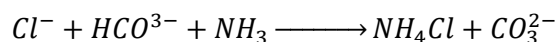
Ilustración 19: Proceso de formación de carbonato de calcio sobre la pared bacteriana inducido por la urea. DIC es el carbonato inorgánico disuelto y AMM el amoníaco (Muyneck, Belie, & Verstraete, 2009).

La precipitación del CaCO_3 en un medio urea- CaCl_2 se produciría de la siguiente forma:

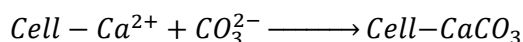
Ecuación 23: Captación del ion de calcio por la bacteria:



Ecuación 24: Formación del carbonato y cloruro amónico:



Ecuación 25: Formación de carbonato de calcio en la superficie de la célula:



Algunos autores ponen en duda el papel de bacterias, opinando que se trata de un subproducto indeseado y accidental del metabolismo bacteriano (Knorre & Krumbein, 2000)

4.3 ENSAYOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los tratamientos convencionales, tanto orgánicos como inorgánicos, empleados para la consolidación de piedras ornamentales, tienen varias desventajas: incompatibilidad a largo plazo del sustrato y el cemento nuevo utilizado para la consolidación, taponamiento de poros inducidos por el nuevo cemento, aceleración de la alteración de la piedra, etc. Las incompatibilidades observadas han propiciado la búsqueda y desarrollo de nuestros tratamientos de conservación para la protección de consolidación de la piedra, siendo los métodos biológicos más adecuados que los tradicionales. Pero, ¿son éstos realmente la mejor opción? A continuación, se exponen unos ensayos en los que se determina la viabilidad de estos métodos evaluando diferentes características de la piedra en diferentes circunstancias tratada con biomineralización.

4.3.1 Consolidation of quarry calcarenite by calcium carbonate precipitation induced by bacteria activated among the microbiota inhabiting the stone (Jimenez-Lopez, Jroundi, Pascolini, Rodríguez-Navarro, & al., 2008)

En el año 2008 la Universidad de Granada llevó a cabo un estudio sobre piedra caliza sin eliminar la comunidad bacteriana natural de la misma. El carbonato de calcio que se producía era compatible con el sustrato y consolidó la piedra sin taponar poros. Se trata del primer estudio que propone el uso de un medio de cultivo bacteriano no inoculado en la consolidación de piedras. La aplicación de los medios de cultivos especificados en este estudio se propone como un procedimiento en la protección eficaz de la piedra caliza ornamental.

4.3.1.1 Materiales y métodos

Los experimentos de biomineralización se realizaron sumergiendo losas de piedra esterilizadas y no esterilizadas en dos medios de cultivos diferentes: uno estéril y otro inoculado con *M. xanthus*. El medio de cultivo activa de forma focalizada entre todos los microorganismos existentes en la piedra, aquellos con potencial para precipitar carbonato de calcio y, por tanto, aumentar la consolidación del material tratado.

Para evaluar el potencial de precipitación de carbonato de calcio de las bacterias activadas de la comunidad microbiana y los efectos sobre la consolidación, se utilizaron variaciones en propiedades químicas del medio, así como propiedades físicas y mecánicas de la piedra.

1. Losas, inóculo y medios de cultivo

Para las pruebas de biomineralización se utilizó piedra calcarenita de cantera de La Escríbanía (Escúzar, España), una piedra caliza bioclástica porosa. El sur de España, más concretamente la zona de Granada y sus alrededores, es muy conocido por su legado arquitectónico y escultórico, con el material de construcción predominante, la calcarenita, extraída de la cantera de Escúzar. El edificio ornamental más antiguo en el que está documentado el uso de calcarenita de la cantera de Escúzar data del siglo VIII. Se optó por utilizar piedra de este lugar debido a la importancia de esta cantera y la posibilidad de que de ella salieran nuevas piedras para reemplazar las piedras dañadas.

Se cortaron 36 losas de piedra de 2x5x0,5 cm con una sierra de diamante y se pesaron. Se esterilizaron 18 placas de piedra y las otras 18 no. Para minimizar la alteración, se esterilizaron calentando las losas con vapor de agua a 100 °C durante 1 hora, 4 días seguidos, con almacenamiento intermedio a temperatura ambiente.

El microorganismo utilizado fue *M. xanthus* (cepa 422 proporcionada por la Colección Española de Cultivos Tipo, Burjasot, Valencia, España). Para la preparación del inóculo, se cultivó *M. xanthus* en medio líquido CT (Rodríguez-Navarro et al., 2003). Se incubó en un agitador rotatorio (18.85 rad s) durante 48 h a 28 °C para alcanzar una fase tardía de crecimiento exponencial con una densidad celular de aprox. 3×10^8 células ml^{-1} .

Las pruebas de biomineralización se realizaron en tres medios líquidos:

- M-3 [1 wt% Bacto Casitone, 1 wt% $\text{Ca}(\text{CH}_2\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,2 wt% $\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada, pH 8; Rodríguez-Navarro et al., 2003]
- M-3P [1wt% Bacto Casitone, 1 wt% $\text{Ca}(\text{CH}_2\text{-COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,2 wt% $\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$, 10 mM tampón de fostato en agua destila, pH 8; Rodríguez-Navarro et al., 2003]
- CC [0.3 wt% Bacto Casitone, 0.4 wt% $\text{Ca}(\text{CH}_2\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,1 wt% CaCl_2 0.3% NaHCO_3 , 0,1 wt% extracto de levadura en agua destilada, pH 8; Ben Chekroun, 2000].

Se prepararon medios de cultivo sólidos M-3, M-3P y CC añadiendo agar-agar al 18% en peso al medio de cultivo líquido.

2. Procedimientos experimentales

Se llenaron quince matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo líquido M-3 filtrado. A continuación, el medio de cultivo se esterilizó en autoclave durante 20 min a 120°C. Una vez esterilizados, seis de los matraces Erlenmeyer, que contenían M-3 estéril, se inocularon con 2 ml de cultivo de *M. xanthus*, quedando sin inocular los nueve restantes.

De los 6 inoculados, en tres de ellos se introdujeron calcarenita estéril (una losa por frasco), mientras que en los tres restantes se introdujeron tres placas de calcarenita no estéril. Con respecto a los nueve matraces sin inocular, tres no recibieron losas (control), tres recibieron losas estériles y tres recibieron losas no estériles.

Este mismo procedimiento se llevó a cabo con los otros dos medios de cultivo (M-3P y CC).

Todos los matraces Erlenmeyer se incubaron en la oscuridad a 28°C durante 30 días en un agitador rotatorio a 5,97 rad/s. La tasa de evaporación se midió pesando cada matraz cada 24 h.

Todas las losas (tanto esterilizadas como no esterilizadas) que están sumergidas en cualquier medio de cultivo se denominan aquí "losas tratadas" frente a las losas "no tratadas", que son losas en bruto a las que no se les dio ningún tratamiento.

A intervalos de tiempo predeterminados (0, 1, 3, 5, 7, 10, 15 y 30 días) se extrajo una alícuota de 7 ml de medio de cultivo de los matraces Erlenmeyer en condiciones asépticas. Se preparó una serie de diluciones decimales a partir de 500 μl de la muestra y luego se colocó un volumen de 100 μl de cada dilución en los correspondientes medios de cultivo sólidos M-3, M-3P y CC esparciendo el volumen de manera homogénea

sobre la superficie de la muestra. Se incubaron placas de Petri que contenían medios de cultivo inoculados a 28°C durante 4 días. Se realizó una siembra en medio de cultivo sólido para determinar el tamaño de la población bacteriana. El resto de la alícuota se filtró a través de una membrana Millipore de 0,2 micras y se mantuvo en refrigeración en viales sellados para análisis químico. Al final del experimento (30 días), se retiraron 2 ml del medio de cultivo de los matraces en condiciones asépticas y se centrifugaron a 1571,05 rad/s durante 5 min, y el sedimento se almacenó a -80°C para análisis moleculares adicionales de la microbiota creciendo en los medios de cultivo. Se recogieron losas de piedra, se enjuagaron dos veces con agua destilada y se secaron en un horno a 40°C durante 48 h. Finalmente, se pesaron.

4.3.1.2 Resultados y discusión

Los medios de cultivo utilizados en los experimentos tenían una composición particular que debía cumplir con dos objetivos importantes: (1) promover el crecimiento de esas bacterias, entre la comunidad microbiana que habita la piedra, capaces de inducir la precipitación de carbonato cálcico; y (2) para prevenir la producción de ácidos que pueden formarse debido a la naturaleza de la actividad metabólica de las bacterias activadas, ya que la producción de ácidos detendría la formación de carbonato de calcio y/o conduciría a la disolución del carbonato de calcio previamente formado. Para ello, se excluyeron los carbohidratos del medio de cultivo, mientras que se introdujo una digestión pancreática de caseína (y extracto de levadura en medio CC) como fuente de carbono y nitrógeno. La eliminación de carbohidratos como fuente de carbono excluyó el crecimiento de microorganismos que producen ácidos orgánicos como resultado del metabolismo de esos carbohidratos, y se fomentó el crecimiento de aquellos que usan aminoácidos. Esto es importante ya que la desaminación oxidativa de los aminoácidos da como resultado una liberación de amoníaco, que alcaliniza el medio de cultivo, y es esta alcalinización la que luego favorece la formación de carbonato cálcico.

Además, la alcalinización limita el crecimiento de hongos, que preferentemente crecen en condiciones más ácidas.

Cabe señalar que la mayoría de los métodos propuestos hasta ahora para consolidar piedra ornamental basados en la aplicación de un medio de cultivo inoculado con bacterias utilizan medios de cultivo que contienen una cantidad considerable de carbohidratos.

No se detectó crecimiento en los medios de cultivo estériles que contenían cálculos estériles y solo se detectó el crecimiento de *M. xanthus* en medios de cultivo inoculados con *M. xanthus* que contenían cálculos estériles. Esto indica que el método de esterilización utilizado fue eficaz. Por el contrario, se detectó crecimiento microbiano en los medios de cultivo sólidos inoculados con muestras recolectadas de experimentos que contenían placas no estériles sumergidas en medios de cultivo estériles e inoculados con *M. xanthus*, lo que indica que esos medios de cultivo fueron capaces de activar las bacterias pertenecientes a la comunidad microbiana de la piedra.

Se realizó una identificación filogenética de las bacterias activadas con el fin de evaluar si la aplicación de los medios de cultivo había potenciado el crecimiento de algún microorganismo que pudiera ser potencialmente peligroso para la consolidación del material. En la piedra sin tratamiento, se detectaron bacterias presentes en acuíferos contaminados y relacionadas con la contaminación fecal. Sin embargo, al estudiar la piedra con el tratamiento, aparecieron bacterias grampositivas de baja G+C, miembros de las Bacillales y *Oceanobacillus*, que son bacterias que pueden usar aminoácidos como fuente de carbonato de calcio, siendo altamente efectiva su contribución. Ninguna de las bacterias activadas parece ser potencialmente peligrosa para la consolidación del cálculo.

El estudio de la producción de carbonato de calcio por las diferentes bacterias aisladas de los medios de cultivo en los que se trataron los cálculos no estériles muestra que todos los aislados fueron capaces de inducir la precipitación de carbonato de calcio en los medios de cultivo M-3 y M-3P. La única diferencia fue en el momento en que cada aislado produjo los cristales y la masa relativa de producción de carbonato (Tablas 6 y 7). Se observaron tipos de colonias similares en los dos medios de cultivo. Las diferencias entre ellos se relacionaron con la cantidad relativa de cristales producidos, que fue mayor en M-3 que en M-3P.

Los cristales comenzaron a aparecer dentro de la colonia. Durante las primeras etapas aparecieron principalmente en los bordes, pero con el tiempo, la producción de cristales de carbonato de calcio se extendió a toda la colonia e incluso a los medios de cultivo que la rodean. Dado que la producción de cristales de carbonato de calcio ocurre como resultado del metabolismo bacteriano, ocurrirá donde los metabolitos están más concentrados (dentro de la colonia) y luego en cualquier lugar (en la colonia o incluso en el medio de cultivo). El hecho de que todas las bacterias aisladas de los medios de cultivo (M-3 y M-3P) en los que se sumergieron los cálculos no estériles fueron capaces de inducir la precipitación de carbonato cálcico en esos medios es muy importante, ya que demuestra que (1) la aplicación de los medios de cultivo especificados en nuestro estudio sólo activa el crecimiento de bacterias productoras de carbonato de calcio entre la comunidad microbiana que habita la piedra; y (2) dicha activación tiene un papel favorable en la consolidación del cálculo.

| Isolate | Calcium carbonate production over time (days) | | |
|--------------------|---|-----|-----|
| | 1 | 4 | 6 |
| Nst-a | ++ | ++ | +++ |
| Nst-b | +++ | +++ | +++ |
| Nst-c | + | ++ | +++ |
| Nst-e | + | ++ | +++ |
| Nst-d ^a | - | - | - |

-: No crystals detected.
 +: Low production of crystals.
 ++: Moderate production.
 +++: Intensive production.
^a The isolate Nst-d produced crystals of calcium carbonate at 10 days.

Tabla 6: Producción de cristales de carbonato de calcio a lo largo del tiempo por aislamientos de experimentos que contienen calcarenita no estéril sumergida en medios de cultivo estériles M-3 y M-3P

| Isolate | Calcium carbonate production over time (days) | | |
|------------|---|-----|-----|
| | 1 | 4 | 6 |
| Nst + Mx-a | +++ | +++ | +++ |
| Nst + Mx-b | +++ | +++ | +++ |
| Nst + Mx-c | + | + | + |
| Nst + Mx-d | +++ | +++ | +++ |
| Nst + Mx-e | + | +++ | +++ |

-: No crystals detected.
 +: Low production of crystals.
 ++: Moderate production.
 +++: Intensive production.

Tabla 7: Producción de cristales de carbonato de calcio a lo largo del tiempo por aislamientos de experimentos que contienen calcarenita no estéril sumergida en medios de cultivo M-3 y M-3P inoculados con *M.xanthus*

4.3.1.3 Evolución de la química de los medios de cultivo

Los valores de pH de los medios de cultivo estériles que no contenían placas de piedra (controles) fueron casi constantes durante todo el experimento. Las variaciones estuvieron en el rango de $\pm 0,1$ unidades de pH. Los valores de pH de los medios de cultivo estériles que contienen placas estériles variaron dentro de $\pm 0,3$ unidades de pH y fueron más bajos que los de los controles. Sin embargo, este no fue el caso de las pruebas que contenían placas estériles en las que los medios de cultivo se inocularon con *M. xanthus*. En el último caso, los valores de pH oscilaron dentro de los primeros 10-15 días y luego aumentaron drásticamente a valores finales de 9.62, 9.00 y 9.69 a los 30 días para las pruebas de M-3, M-3P y CC, respectivamente. Los valores máximos de pH se observaron en medios de cultivo inoculados con *M. xanthus* que contenían cálculos no estériles, alcanzando valores finales de 9,85, 10,37 y 10,28 para los medios de cultivo M-3, M-3P y CC, respectivamente. Se midieron tasas de evaporación de aproximadamente 0,5 ml al día a lo largo

de todo el curso de los experimentos.

En cuanto a la formación de carbonato de calcio, se puede determinar mediante la disminución de los valores de Ca_{Taq} a lo largo del tiempo.

Solo se detectó una ligera disminución en Ca_{Taq} en los experimentos de control (con la excepción del medio de cultivo M-3), mostrando una precipitación limitada de carbonato de calcio. En losas estériles que contienen M-3 estériles hubo una disminución en Ca_{Taq} de 43% con respecto al valor inicial, mientras que en losas estériles que contienen M-3P y CC estériles, las reducciones en Ca_{Taq} fueron inferiores al 5%. Por el contrario, se observó una disminución del 98% de los valores iniciales en las pruebas en las que *M. xanthus* y / o la comunidad microbiana estaban presentes, lo que demuestra una precipitación de carbonato de calcio muy notable. Esta disminución se produjo principalmente durante los primeros 15 días del experimento, permaneciendo los valores casi constantes a partir de entonces. En resumen, la disminución de Ca_{Taq} fue más importante en la siguiente secuencia (de mayor a menor): (a) medios inoculados con *M. xanthus* que contienen cálculos no estériles; (b) medios de cultivo estériles que contienen cálculos no estériles; (c) medios inoculados con *M. xanthus* que contienen cálculos estériles; y finalmente. (d) medios de cultivo estériles que contienen cálculos estériles. Sin embargo, los valores finales para (a), (b) y (c) son muy similares (Ilustración 20). Por tanto, la presencia de *M. xanthus* y/o bacterias activadas de la comunidad microbiana del cálculo parecen ser cruciales para inducir una precipitación notable de carbonato de calcio.

Ca_{Taq} y los datos de pH demuestran que la presencia de estas bacterias activadas produjo la alcalinización que propició la precipitación del carbonato de calcio. Aunque se observaron aumentos en los valores de pH cuando *M. xanthus* o la comunidad microbiana estaban presentes, fue en su presencia combinada donde tales aumentos fueron más importantes. Estos resultados sugieren que entre *M. xanthus* y la comunidad microbiana de piedra existe un esfuerzo cooperativo en la mejora de la precipitación de carbonato de calcio.

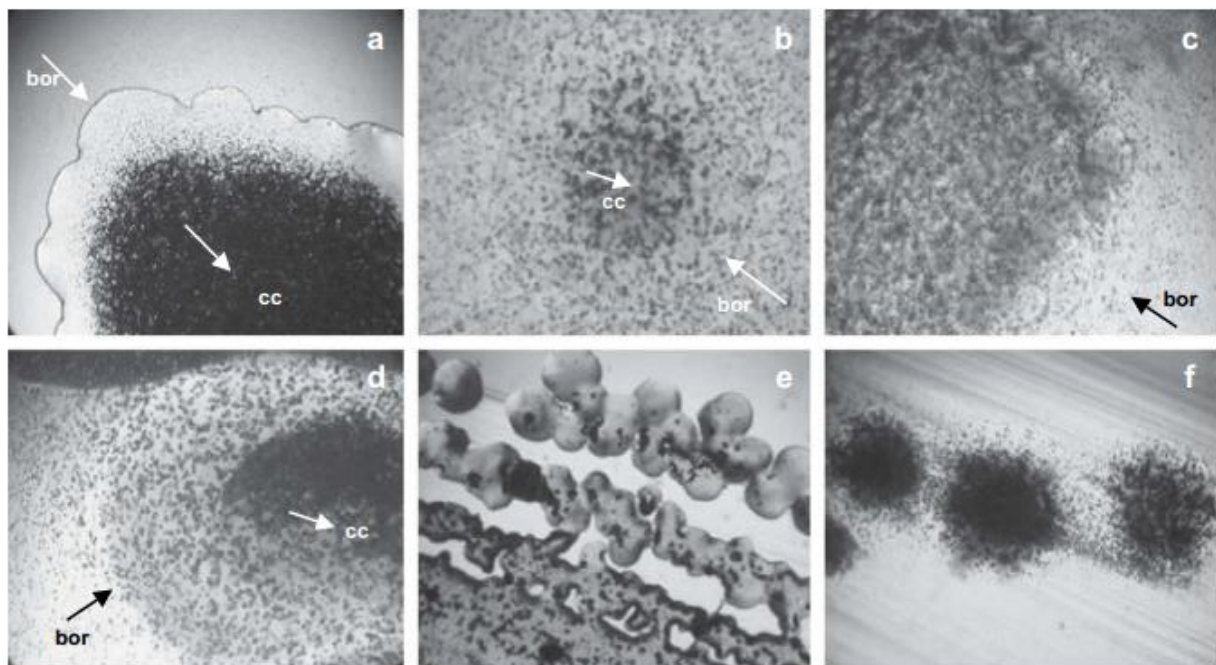


Ilustración 20: *Imágenes microscópicas ópticas de colonias de diferentes aislamientos que muestran producción de carbonato cálcico, (a) colonia con producción considerable de carbonato cálcico; (b) notable precipitación de carbonato de calcio dentro de la colonia y también en el medio de cultivo circundante; (c) borde de una colonia que muestra una intensa precipitación de carbonato de calcio; (d) precipitación intensa de carbonato de calcio en el interior y los bordes de una colonia e incluso en el medio de cultivo adyacente; (e): colonias que muestran pocos cristales de carbonato de calcio; (f) colonias que muestran una producción notable de carbonato de calcio. Las áreas mineralizadas dentro de las colonias aparecen oscuras.*

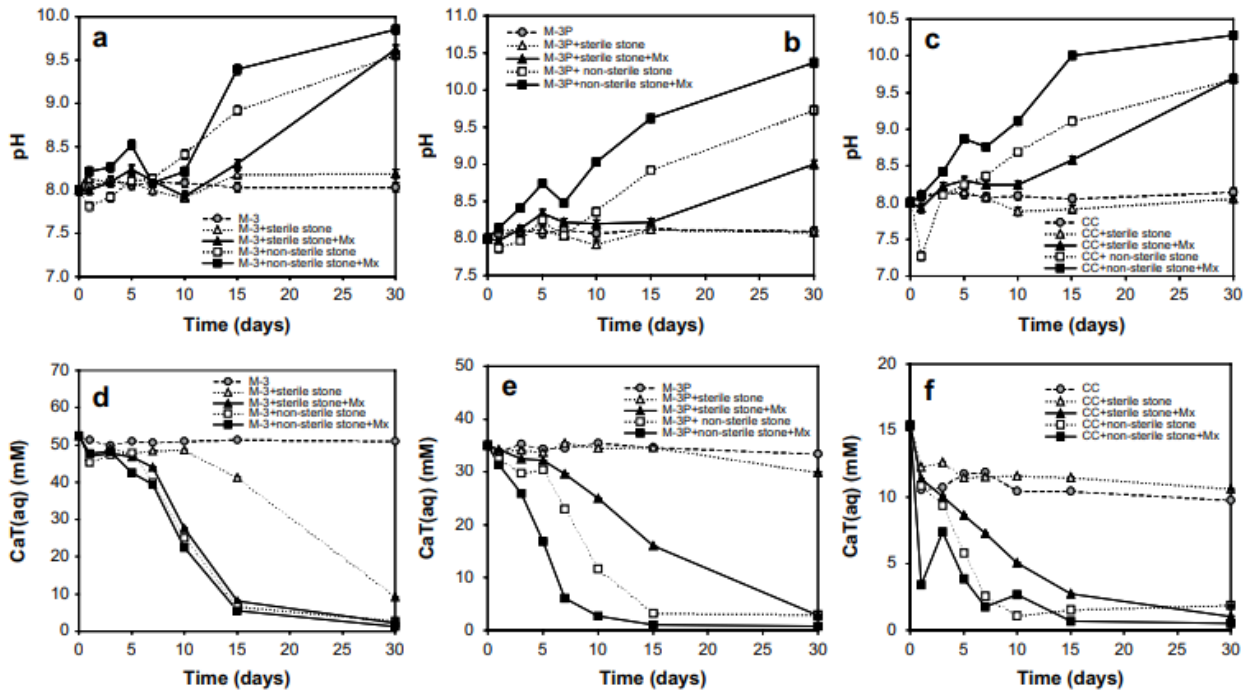


Ilustración 21: pH y concentración de calcio medidos en el medio durante el transcurso del tiempo de los experimentos para M-3: (a) y (d), para M-3P: (b) y (e) y para CC: (c) y (f)

Curiosamente, y como ocurrió en el caso del pH, aunque la precipitación de carbonato de calcio ocurrió cuando *M. xanthus* y / o la comunidad microbiana estaban presentes en la solución, dicha precipitación se incrementó en presencia de ambos. En todos los casos, la comunidad microbiana que habita la piedra parece favorecer la precipitación de carbonato de calcio de una manera más eficiente que *M. xanthus*.

4.3.1.4 Conclusiones

Los resultados de este estudio muestran que los medios de cultivo probados fueron capaces de activar solo bacterias productoras de carbonato de calcio dentro de la comunidad microbiana de la piedra caliza porosa probada.

Aunque ha quedado demostrado en la calcarenita de la cantera de Escúzar, también puede emplearse con éxito en piedra de una gama más amplia de ubicaciones, ya que las bacterias productoras de carbonato se encuentran comúnmente en ellas.

Una de las ventajas de este método es que no introduce ningún microorganismo nuevo en el cálculo que se está tratando. Esto puede ser menos arriesgado que el método utilizado anteriormente para consolidar piedra ornamental mediante la aplicación de un medio de cultivo inoculado con bacterias.

4.3.2 Consolidation of ornamental stone by microbial carbonatogenesis (Jroundi, E.J., Rodríguez-Navarro, & González-Muñoz, 2010)

La misma Universidad de Granada también estudió en el año 2010 el tratamiento aplicado en diferentes zonas del Monasterio de San Jerónimo en Granada (España), edificio datado del siglo XVI. Promovió el desarrollo de bacterias heterótrofas capaces de inducir carbonatogénesis, sin alterar el aspecto de la superficie de la piedra ni inducir efectos secundarios.

4.3.2.1 Materiales y métodos

1. Piedra

Se realizaron tratamientos de consolidación *in situ* sobre diferentes zonas de la piedra que presentaban diferente grado de alteración. La piedra con la que está construido el monasterio es calcarenita bioclástica de color beige extraída de las canteras de Santa Pudía (Escúzar, Granada). Tiene una porosidad media de aprox. 28% y un grado limitado de cementación, lo que hace que sea muy susceptible a los factores ambientales.

2. Tratamiento

Los tratamientos se realizaron en dos zonas que se diferencian por su posición -ya que se encuentran a diferente altura respecto del suelo y con diferente orientación-, el grado de alteración de la piedra y la presencia de sales:

- La primera zona tiene orientación sureste y se localiza a 20 m de altura en el Ábside de la Capilla de San Jerónimo. En este sector, los bloques de piedra muestran desintegración granular (lijado), picaduras en la superficie y una pérdida general de relieve superficial. A efectos prácticos, a lo largo de este ensayo se le llamará a esta zona como "Ábside".
- La segunda zona tratada está ubicada a nivel del suelo (Puerta en el área del patio) y muestra un lijado más extenso y una pérdida masiva de granos de piedra. Esta zona está afectada por una intensa erosión salina. A esta área se le llamará "Puerta".

En el "Ábside", la zona seleccionada se delimitó en tres sectores y en la "Puerta" en dos, realizándose de manera diferente el tratamiento en el lado izquierdo y el derecho.

Se aplicó agua destilada en el Sector I del "Ábside" (control). El Sector II (Ábside) y el lado izquierdo de la "Puerta" recibieron un inóculo de *M. xanthus* (Cepa ATCC19368 número 422 de la Colección Española de Cultivos Tipo) en fase exponencial de crecimiento ($\sim 10^9$ células / ml) en conjunto con una solución nutricional esterilizada M3-P (Rodríguez-Navarro et al. 2003). El Sector III (Ábside) y el lado derecho de la "Puerta" solo se trataron con M3-P estéril.

La aplicación de la solución se realizó mediante la técnica de aspersion (Tiano et al. 2006), realizándose dos veces al día durante los 6 días de tratamiento para mantener una humedad constante. En el caso del tratamiento con *M. xanthus*, el inóculo se aplicó solo el primer día y se empleó M3-P estéril durante los días restantes. Las áreas tratadas permanecieron cubiertas con una lámina de aluminio/plástico (no en contacto directo con la superficie de la piedra para permitir la circulación del aire), para evitar la desecación durante el proceso y el impacto directo de la luz solar sobre la superficie de la piedra, durante los 6 días de tratamiento más 3 días más hasta que las piedras se secaron por completo.

Para el estudio de la microbiota activada, como consecuencia del tratamiento:

Se recolectaron muestras en el primer y último día de tratamiento utilizando trozos de papel de filtro estériles (de 1 x 2 cm de tamaño) colocados durante 5 min en diferentes puntos de las superficies de piedra humidificadas. Luego, cada papel de filtro se colocó asepticamente en 1 ml de medio de cultivo M3-P para ser procesado en el laboratorio. Para imitar la situación de alta concentración de sal en la piedra en las áreas de "Puerta", además de las muestras mencionadas anteriormente, se recogieron otros papeles de filtro de igual forma pero posteriormente se les agregaron 1 ml de solución salina (NaCl, 0,9%).

Para estudiar la evolución de la microbiota con el tiempo:

Se recolectó 1 g de muestra de piedra de cada área antes y después del tratamiento (tras 6 meses y tras 1 año), y se inocularon diferentes medios de cultivo para analizar el número total de bacterias, la presencia de oxidantes de azufre, de bacterias nitrificantes (Soriano & Walker, 1968), de bacterias productoras de ácido (suplementado el medio de cultivo con una fuente de carbono fermentable) y de hongos. La identificación de las bacterias aisladas se realizó mediante técnicas moleculares.

Para estudiar la evolución estética:

Se realizaron mediciones de color en varios puntos (al menos tres puntos en cada uno de los cinco Sectores) utilizando un espectrofotómetro y geometría de reflectancia difusa.

Para cuantificar el aumento de la dureza superficial:

Se optó por utilizar la denominada prueba de cinta Peeling (Tiano et al. 2006). Se pegaron varios trozos de cinta adhesiva de 7 x 3,5 cm sobre la superficie a ensayar y se retiraron rápidamente. Esta operación se realizó antes de que comenzara el tratamiento y después de que se completara. Cada cinta se pesó antes y después de la aplicación para determinar la cantidad de material eliminado.

La eficacia de consolidación se calculó como la reducción de peso del material eliminado después del tratamiento. Teniendo en cuenta que las cintas adhesivas eliminan los granos de carbonato de la superficie sueltos o mal cementados, las variaciones en la masa de granos eliminados por las cintas Peeling permiten cuantificar la consolidación superficial real conseguida por el tratamiento.

Las muestras de cálculos se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) antes y después del tratamiento.

4.3.2.2 Resultados

1. Bioconsolidación de piedras

Los resultados de la prueba de la cinta Peeling se presentan en la Tabla 8. El tratamiento con la solución nutricional (con y sin inóculo de *M. xanthus*) produjo una reducción de más del 50% de pérdida de peso en comparación con las áreas no tratadas o de control. A pesar de que el cálculo de calcarenita es muy heterogéneo, los resultados demuestran que el tratamiento fortaleció la estructura de la piedra.

| | Control | <i>M. xanthus</i> treatment | M3-P treatment |
|------|---------|--------------------------------|-------------------|
| Apse | 59 ± 39 | 22 ± 19 | 25 ± 10 |
| Gate | 49 ± 39 | 40 ± 34 | 13 ± 7 |

Tabla 8: Disminución de peso (g/m^2) tras la prueba de cinta Peeling sobre la piedra tratada. Apse es el "Ábside" y Gate la "Puerta".

Las mediciones de color antes y después del tratamiento de los bloques de piedra de calcarenita no muestran diferencias significativas en los valores de L, a* y b* (En el espectrofotómetro se seleccionó el espacio de color CIE-La*b*). Estos resultados confirman que el tratamiento no altera la apariencia de la piedra calcarenita.

El análisis SEM muestra una gran diferencia entre cálculos de control y tratados (Ilustración 22). Las piedras tratadas muestran la presencia de grandes capas biomineralizadas de sustancias exopoliméricas que cubren los granos de carbonato de la superficie de la piedra.

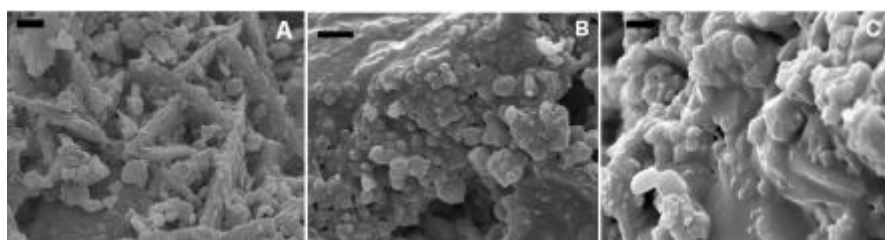


Ilustración 22: Muestra de piedra del "Ábside". A) Antes del tratamiento; B) Tratada con M3-P + *M.xanthus*; C) Tratada únicamente con M3-P. Escala de la barra: 4 micras

2. Bacterias activadas durante el tratamiento

El recuento de colonias de muestras recolectadas de las áreas tratadas, así como los porcentajes de bacterias carbonatogénicas se muestran en las Tablas 9 y 10. Se observa que la carga bacteriana aumentó con los días de tratamiento, produciendo y la mayoría de estas bacterias cristales de carbonato de calcio. En el caso de las colonias bacterianas aisladas de las áreas con alta concentración de sal, el 86,28% pudo crecer en medio M3-P.

| | | A | B |
|---------------------------|----------|-----------------------|-----------------------|
| Counting | T=0 days | 2.33 x 10 | 2.1 x 10 |
| | T=6 days | 3.6 x 10 ³ | 3.8 x 10 ³ |
| % Carbonatogenic bacteria | | 95.45 | 97.36 |

Tabla 9: Recuento de colonias bacterianas (ufc/ml) y % de bacterias carbonatogénicas en el “Ábside”. A) Tratada con *M.xanthus* + M-3P; B) Tratada únicamente con M-3P

| | | A1 | B1 | A2 | B2 |
|---------------------------|----------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Counting g | T=0 | 1.3 x 10 ⁴ | 1.2 x 10 ² | 2.66 x 10 | 1.33 x 10 |
| | T=6 days | 3.5 x 10 ⁴ | 2.72 x 10 ⁴ | 3.56 x 10 ⁴ | 2.56 x 10 ⁴ |
| % Carbonatogenic bacteria | | 86.36 | 98.24 | 92.68 | 95 |

Tabla 10: Recuento de colonias bacterianas (ufc/ml) y % de bacterias carbonatogénicas en la “Puerta”. A) Tratada con *M.xanthus* + M-3P; B) Tratada únicamente con M-3P. A1,B1) Inoculadas en medio sólido M3-P; A2,B2) Inoculadas en medio sólido MH (para muestras de las áreas salinas)

3. Evolución de la microbiota después del tratamiento

El número total de bacterias no se alteró (-5×10 ufc /ml). Además, no se detectaron oxidantes de azufre, bacterias nitrificantes u hongos después del tratamiento. En la Tabla 11 se muestra el porcentaje de bacterias que producen ácidos.

| Treatment | Acid producing bacteria | |
|----------------|------------------------------------|----------------|
| | <i>M. xanthus</i> + M3-P treatment | M3-P treatment |
| Before | 50% | 50% |
| After 6 months | 33% | 25% |
| After 1 year | 71% | 0% |

Tabla 11: Porcentaje de bacterias productoras de ácido (cultivadas en medio suplementado con glucosa)

Estos resultados muestran que las principales bacterias desarrolladas en el medio M3-P (que no incluye glucosa) son carbonatogénicas. Sin embargo, cuando se inoculan en un medio con glucosa, algunas de ellas pueden producir ácidos que pueden provocar efectos indeseados de deterioro. Esto demuestra claramente que el medio sin glucosa es más adecuado que el medio que contiene glucosa utilizado en otros estudios.

La identificación molecular de bacterias aisladas del ábside muestra que todas las bacterias cultivables recolectadas eran heterótrofas y estaban presentes de forma natural en este entorno. Siendo la mayoría de ella Proteobacterias.

Los estudios en la zona de la puerta, tanto de la evolución microbiota como la identificación bacteriana, no se han realizado aún en este ensayo.

4.3.2.3 Conclusiones

Se pudo comprobar (mediante una observación prolongada hasta tres años después del tratamiento) que la consolidación resultó duradera y eficaz para la piedra calcarenita tratada tras la aplicación de solución nutricional.

Toda la microbiota cultivable activada era carbonatogénica. Existían -y estaban activadas- bacterias calcificantes en la piedra, independientemente de la presencia de altas concentraciones de sal. No se detectó desarrollo de comunidades microbianas peligrasas durante o después del tratamiento.

Estos resultados confirman que la activación con medio de cultivo adecuado (sin glucosa) de la microbiota carbonatogénica que habita en piedras ornamentales de carbonato en descomposición es un tratamiento de conservación eficaz para su aplicación *in situ*.

4.3.3 Influence of pore structure on the effectiveness of a biogenic carbonate surface treatment for limestone conservation (De Muynck, Leuridan, Van Loo, Verbeken, & al., 2011)

En 2011, la Universidad de Gante realizó un estudio en el que se aplicó un tratamiento de biodeposición ureolítica a cinco tipos de piedra caliza con el fin de investigar el efecto de la estructura de los poros sobre el rendimiento protector de un tratamiento de superficie mediante biomineralización del carbonato. Éste se evaluó mediante procesos de transporte y degradación, visualizándose la profundidad a la que llega el tratamiento por medio de microtomografía.

El tamaño de los poros afecta en gran medida a la adsorción bacteriana y, por lo tanto, la ubicación y la cantidad de carbonato precipitado. Este estudio indicó que en la piedra macroporosa, la formación de carbonato biogénico ocurrió en mayor medida y a mayores profundidades que en la piedra microporosa. Por tanto, se alcanzó mayor rendimiento protector en las muestras macroporosas.

Hasta ahora, en muchos estudios de biodeposición, la distribución de cristales biogénicos se evaluó solo mediante la investigación microscópica de la superficie exterior. En tales experimentos, Zamarreño et al. (2009) observaron que los cristales biogénicos se formaban preferentemente alrededor y dentro de los espacios porosos abiertos. Su tratamiento de biodeposición dio como resultado una disminución del tamaño de los poros de aproximadamente un 50% sin bloquear los poros completamente, y a partir de esta información, los autores concluyeron que su tratamiento era seguro para fines de conservación.

Sin embargo, existen muy pocos estudios que aborden la formación de cristales biogénicos por el interior de la piedra. A partir de un análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) de secciones transversales de piedra tratada con biodeposición, se ha observado precipitación a profundidades de aproximadamente 100 μm para el tratamiento con Calcite Bioconcept. Rodríguez-Navarro et al. (2003) observaron precipitación a profundidades superiores a 500 μm en una calcarenita bioclástica macroporosa, pero no profundizaron en la relación que existe entre la profundidad de penetración y el desempeño del tratamiento de biodeposición. Considerando todo lo anterior, parece que el efecto de consolidación de muchos procedimientos de biodeposición será bastante limitado en profundidad.

Para todo tipo de tratamientos superficiales, la profundidad de penetración depende de una variedad de parámetros: las condiciones climatológicas, la viscosidad, tensión superficial, velocidad de deposición, procedimiento de aplicación y velocidad de evaporación del disolvente. También hay que tener en cuenta que afectará a la profundidad de penetración ya que condiciona el transporte de líquidos dentro de la piedra, así como el de las bacterias (que también se verá afectado por la absorción de las bacterias a la matriz mineral).

El transporte de bacterias se produce en poros cuyo diámetro es aproximadamente dos veces mayor que el de las bacterias, mientras que la adsorción de bacterias se rige por una variedad de factores físicos (medio

poroso, temperatura y tasa de transporte), químicos (pH) y microbiológicos (hidrofobicidad, cargas superficiales, etc.).

El objetivo de este estudio fue investigar cómo la estructura de los poros influye en la profundidad de penetración y en el rendimiento de un tratamiento de biomineralización.

4.3.3.1 Materiales y métodos

1. Microorganismos

Las bacterias utilizadas fueron *Bacillus sphaericus* LMG 22257 (Colecciones coordinadas belgas de microorganismos, Gante, Bélgica). El medio de cultivo líquido utilizado consistió en 20 g/litro de extracto de levadura y 20 g litro de urea, estabilizándose en autoclave durante 20 min a 120 ° C. Se añadió urea después de esterilizar en autoclave mediante filtración a través de un filtro estéril de 0,22 µm.

En todos experimentos, los cultivos de *B. sphaericus* se obtuvieron a partir de un cultivo madre a 80 ° C. Se incubaron durante 24 ha 28 ° C en un agitador a 100 rpm. El cultivo se realizó en condiciones estériles.

2. Piedras

Se realizaron experimentos en cinco tipos de piedra caliza francesa, incluidos Massangis, Euville y Aubigny, con menor porosidad, y Savonnières y Avesnes, con mayor porosidad. Éstas fueron seleccionadas basándose en la disponibilidad y el uso histórico del Patrimonio belga, además de procurar que tuvieran diferentes tipos de estructuras de poros.

- Aubigny: una piedra caliza oolítica.
- Savonnières: una piedra caliza oolítica con un cemento de calcita esparcido que contiene entre un 98 y un 99% de carbonato de calcio y está formado por bioclastos y oolitos con núcleos disueltos.
- Massangis: una piedra caliza oolítica compuesta principalmente de carbonato de calcio, pero puede haber dolomita y óxido de hierro. Los núcleos de los oolitos no se disuelven, a diferencia de los de Savonnières. Además de los fragmentos oolíticos, también se pueden encontrar bioclastos, junto con un cemento micrítico de grano fino.
- Euville: una piedra caliza crinoidea que consta de aproximadamente 98 carbonato de calcio y contiene una gran cantidad de fragmentos crinoideos que están cementados por una masa microcristalina.
- Avesnes: contiene típicamente todas las cantidades de glauconita, cuarzo detrítico, hoclastos y minerales opacos en un cemento de micrita. Esta piedra puede clasificarse como wackestone bioclástica.

Para estos experimentos, se cortaron bloques de piedra en probetas de diferentes dimensiones:

- Prismas de 40 x 20 x 10 mm
- Cubos de 40 mm de lado
- Cilindros de 4 a 5 mm de diámetro y hasta 8 mm de altura.

Antes de todos los experimentos, las muestras se almacenaron en un horno a 80 °C hasta que la variación entre pesadas con 24 horas de diferencia fuera inferior a 0,1.

3. Procedimiento de tratamiento por biodeposición

Para la biodeposición se incuban las probetas en una sala a 28°C y condiciones estándar al aire libre (no estériles).

El primer paso realizado fue sumergir los cálculos durante 24 horas en un cultivo de *B. sphaericus* de 1 día de edad. Tras esto, las muestras se retiraron de la solución de cultivo y se limpiaron suavemente con una toalla de papel para eliminar el exceso de líquido de la superficie.

En el segundo paso, las muestras se sumergieron durante 4 días en un medio de biodeposición que contenía 20 g por litro de urea y 50 g por litro de CaCl₂·2H₂O.

En ambos pasos se midió el pH de los diferentes líquidos antes y después de la inmersión de las probetas. Éstas se trataron por un lado (inmersión parcial) o por todos los lados (inmersión completa) dependiendo del parámetro de durabilidad a ensayar:

Los cubos se sumergieron completamente (para experimentos de ataque con sal y de congelación y descongelación) o se sumergieron a una profundidad de aproximadamente 1 cm (para experimentos de absorción de agua y comportamiento de secado), mientras que los prismas se sumergieron completamente en recipientes de aluminio conteniendo 200 ml de biodeposición o medio de cultivo. Los cilindros para análisis microtomográficos se trataron junto con los prismas (es decir, completamente sumergidos en los mismos recipientes al mismo tiempo). A continuación, las muestras se dejaron secar durante 3 días a 28°C antes de ser almacenadas en un horno a 80 ° C hasta obtener un peso constante.

| Stone type (mean % porosity ± SEM) and treatment | pH ^a | | | | Weight gain | |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|-------|------------------------------|------------------------------|
| | Step 1 | | Step 2 | | Absolute (g, %) ^b | Relative (%; %) ^b |
| | Initial | Final | Initial | Final | | |
| Less porous | | | | | | |
| Massangis (9.98 ± 0.66) | | | | | | |
| Medium | 6.89 | 7.73 | 7.41 | 6.81 | 0.07 ± 0.01 (27) | 0.37 ± 0.04 (25) |
| Bacteria in saline | 6.65 | 7.8 | NA ^d | NA | 0.00 ± 0.00 (0) | 0.00 ± 0.00 (0) |
| Bacteria in culture liquid | 9.45 | 7.89 | NA | NA | 0.03 ± 0.00 (12) | 0.16 ± 0.02 (11) |
| Biodeposition with supernatant | 9.42 | 9.04 | 7.41 | 6.86 | 0.09 ± 0.02 (34) | 0.46 ± 0.09 (31) |
| Biodeposition with bacteria in saline | 6.65 | 7.8 | NA | 5.5 | 0.22 ± 0.03 (83) | 1.11 ± 0.13 (74) |
| Biodeposition with bacteria in culture liquid | 9.43 | ND ^e | ND | ND | 0.27 ± 0.01 | 1.49 ± 0.04 |
| Aubigny (14.12 ± 0.34) | | | | | | |
| Medium | 6.89 | 7.72 | 7.41 | 6.77 | 0.12 ± 0.01 (22) | 0.71 ± 0.07 (24) |
| Bacteria in saline | 6.65 | 7.85 | NA | NA | 0.00 ± 0.00 (1) | 0.02 ± 0.01 (1) |
| Bacteria in culture liquid | 9.45 | 7.11 | NA | NA | 0.06 ± 0.01 (11) | 0.38 ± 0.05 (13) |
| Biodeposition with supernatant | 9.42 | 8.74 | 7.41 | 6.73 | 0.21 ± 0.03 (38) | 1.29 ± 0.16 (43) |
| Biodeposition with bacteria in saline | 6.65 | 7.85 | NA | 5.54 | 0.39 ± 0.03 (71) | 2.18 ± 0.18 (72) |
| Biodeposition with bacteria in culture liquid | 9.43 | ND | NA | ND | 0.55 ± 0.02 | 3.02 ± 0.13 |
| Euville (17.24 ± 0.59) | | | | | | |
| Medium | 6.89 | 7.69 | 7.41 | 7.52 | 0.11 ± 0.02 (16) | 0.67 ± 0.14 (20) |
| Bacteria in saline | 6.65 | 7.85 | NA | NA | 0.00 ± 0.01 (0) | 0.00 ± 0.03 (0) |
| Bacteria in culture liquid | 9.45 | 7.58 | NA | NA | 0.05 ± 0.01 (8) | 0.33 ± 0.05 (10) |
| Biodeposition with supernatant | 9.42 | 8.99 | 7.41 | 6.98 | 0.17 ± 0.02 (26) | 1.03 ± 0.10 (30) |
| Biodeposition with bacteria in saline | 6.65 | 7.85 | 7.41 | 5.8 | 0.39 ± 0.04 (61) | 2.15 ± 0.24 (63) |
| Biodeposition with bacteria in culture liquid | 9.43 | ND | ND | ND | 0.64 ± 0.08 | 3.40 ± 0.29 |
| More porous | | | | | | |
| Savonnieres (30.92 ± 0.14) | | | | | | |
| Medium | 6.89 | 7.6 | 7.41 | 6.79 | 0.20 ± 0.03 (30) | 1.48 ± 0.20 (33) |
| Bacteria in saline | 6.65 | 7.8 | NA | NA | 0.00 ± 0.00 (0) | 0.00 ± 0.03 (0) |
| Bacteria in culture liquid | 9.45 | 7.65 | NA | NA | 0.08 ± 0.01 (13) | 0.63 ± 0.12 (14) |
| Biodeposition with supernatant | 9.42 | 9.11 | 7.41 | 6.93 | 0.20 ± 0.02 (31) | 1.49 ± 0.13 (33) |
| Biodeposition with bacteria in saline | 6.65 | 7.8 | 7.41 | 5.74 | 0.63 ± 0.05 (97) | 4.73 ± 0.40 (105) |
| Biodeposition with bacteria in culture liquid | 9.43 | ND | NA | ND | 0.65 ± 0.01 | 4.51 ± 0.05 |
| Avesnes (32.10 ± 0.05) | | | | | | |
| Medium | 6.89 | 7.68 | 7.41 | 6.78 | 0.22 ± 0.01 (36) | 1.74 ± 0.15 (40) |
| Bacteria in saline | 6.65 | 7.65 | NA | NA | -0.01 ± 0.00 (-1) | -0.07 ± 0.02 (-2) |
| Bacteria in culture liquid | 9.45 | 7.97 | NA | NA | 0.10 ± 0.02 (16) | 0.71 ± 0.08 (16) |
| Biodeposition with supernatant | 9.42 | 8.97 | 7.41 | 6.63 | 0.31 ± 0.06 (51) | 2.32 ± 0.25 (53) |
| Biodeposition with bacteria in saline | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Biodeposition with bacteria in culture liquid | 9.43 | ND | ND | ND | 0.61 ± 0.01 | 4.34 ± 0.05 |

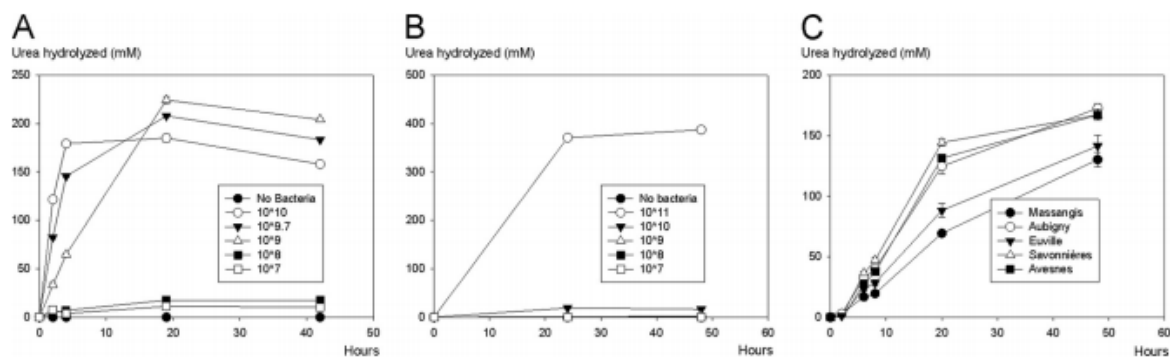
Tabla 12: Aumento de peso de las piedras calizas y valores de pH para diferentes tipos de tratamientos de biodeposición.

Caracterización de la piedra: La estructura de poros de los diferentes cálculos se estudió mediante porosimetría de intrusión de mercurio (MIP). Los análisis de MIP se realizaron en prismas no tratados, mientras que la porosidad de los cubos de piedra secados al horno se determinó mediante saturación con agua al vacío.

Caracterización de la actividad ureolítica en el interior de la piedra: La actividad ureolítica de los diferentes cálculos se determinó mediante medidas de conductividad con un multímetro: Se sumergieron completamente seis prismas de cada tipo de cálculo durante 24 h en un cultivo de *B. sphaericus* de 1 día. A continuación, los prismas se limpiaron suavemente con una toallita de papel y se almacenaron por separado en matraces Erlen Meyer que contenían 100 ml de una solución de urea (20 g/litros de urea y 8,5 g/litros de NaCl). Los experimentos se realizaron en condiciones estacionarias y no estériles. Se midieron la conductividad y el pH de la solución, en momentos puntuales del proceso.

Se realizó una caracterización de la capa de reposición mediante un análisis SEM, un análisis microtomográfico por rayos X, un cálculo de la variación de peso mediante la diferencia de peso antes y después del tratamiento, un análisis espectrofotométrico y un estudio de sonicación.

4.3.3.2 Resultados



*Ilustración 23: Influencia del número de células (A), la presencia de calcio (B) y el tipo de piedra (C) sobre la cantidad de urea hidrolizada por la bacteria *B. sphaericus**

Como se puede observar en la ilustración 23, el cálculo de cal que se había sumergido en cultivos de *B. sphaericus* mostró actividad ureolítica al transferirse a una solución que contenía urea. La velocidad de reacción y la cantidad de urea hidrolizada depende también del tipo de piedra, siendo Messangis y Euville las de menor tasa (ambas poco porosas)

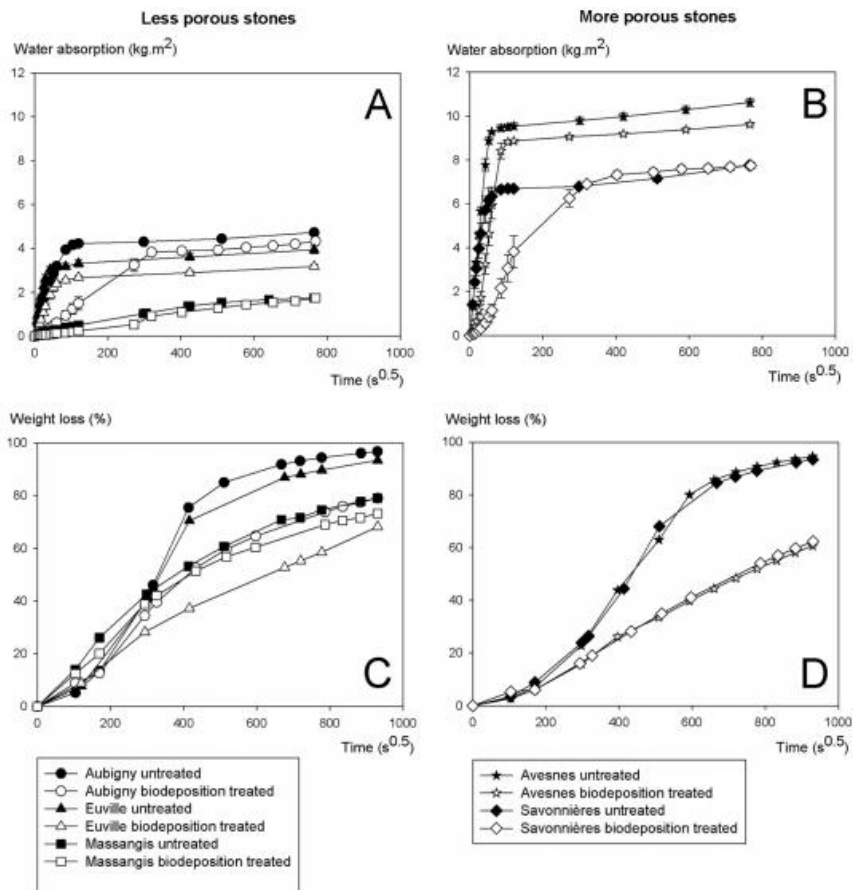


Ilustración 24: Influencia de la porosidad en la capacidad de absorción de agua (A y B) y la evaporación de ésta (C y D) (en términos de pérdida de peso) para diferentes tipos de piedra

Todos los cálculos tratados mostraron una disminución de la tasa de absorción de agua (Ilustración 24 A y B), mientras que se disminuyó también la velocidad de secado, acentuándose el efecto en las piedras más porosas (Ilustración 24 C y D).

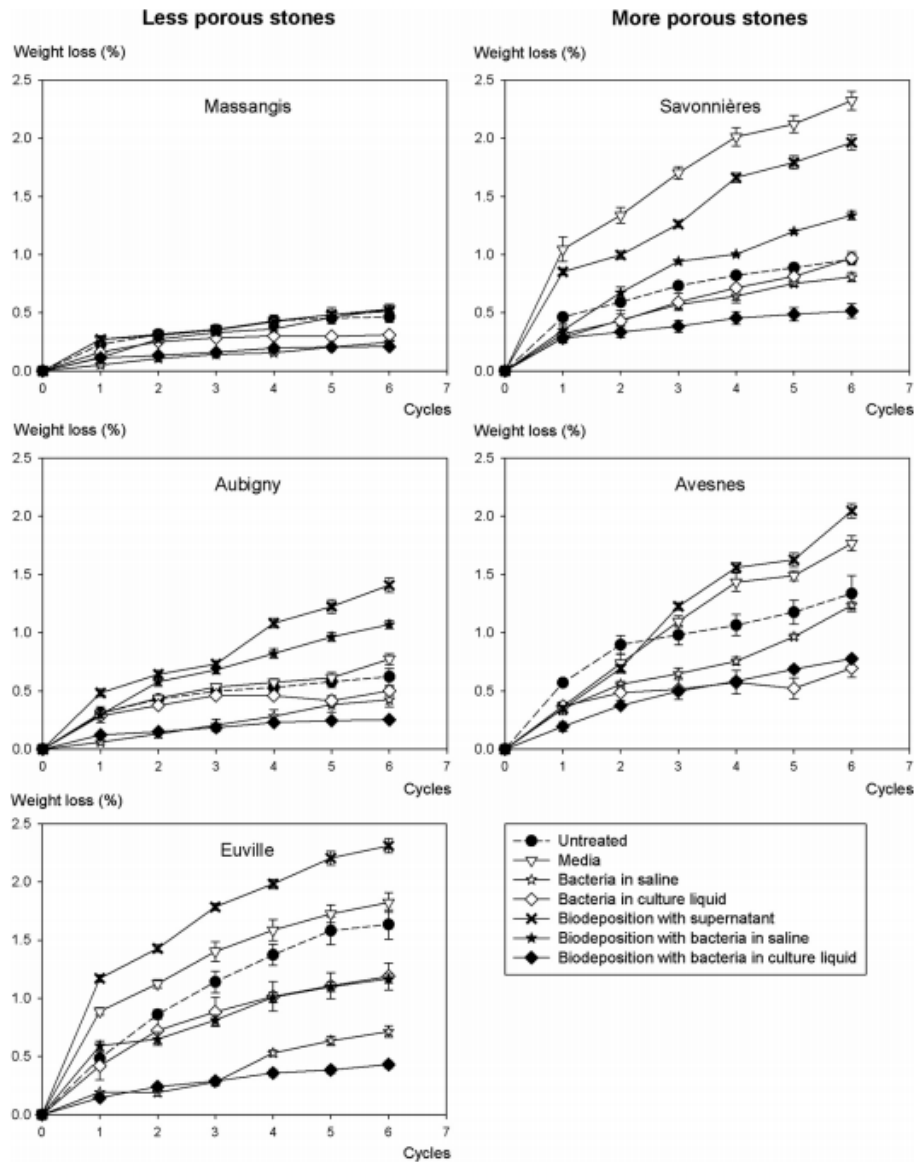


Ilustración 25: Influencia de la porosidad a la resistencia a la sonicación (en términos de pérdida de masa provocada por este fenómeno) para los diferentes tipos de piedra en diferentes medios.

Los cálculos tratados mostraron en torno a un 50 % menos de pérdida de peso tras la sonicación que las no tratadas, lo que induce a pensar que los cristales de carbonato biogénicos estaban firmemente adheridos a la superficie de la piedra.

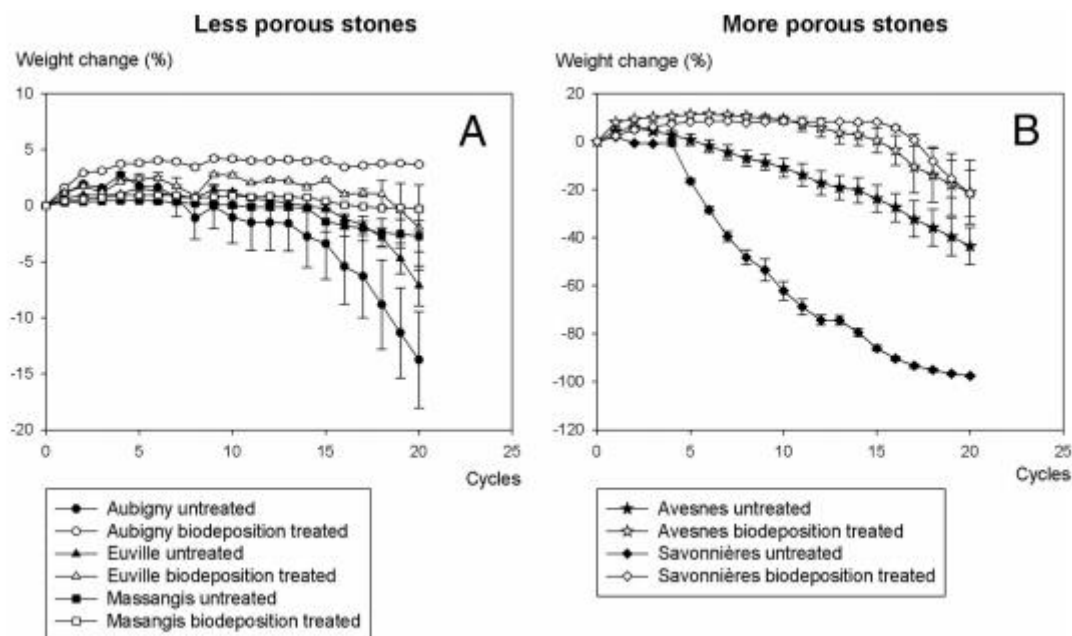


Ilustración 26: Influencia de la porosidad al ataque salino (en términos de pérdida de peso tras la congelación y descongelación -menor pérdida de peso supone una mayor resistencia-)

El tratamiento de biodeposición dio como resultado una mayor resistencia de la piedra al ataque de la sal, siendo el efecto más pronunciado para las piedras más porosas. Los Savonnières tratados con biodeposición permanecieron prácticamente intactos después de 15 ciclos de exposición al sulfato de sodio, pero sigue siendo un resultado aceptable dado que los cálculos no tratados se degradaron en gran medida.

4.3.3.3 Conclusiones:

El objetivo principal que se ha perseguido en este estudio es la influencia de la estructura de los poros en la profundidad de penetración, así como en la eficiencia del tratamiento de biomineralización.

La estructura de los poros que presenta una piedra afecta al transporte bacteriano, y por ende a la cantidad y distribución de los cristales de carbonato de calcio formado gracias a dichas bacterias. Además de la estructura de poros, este transporte bacteriano depende de la absorción de bacterias a la matriz mineral. Esto último, se ve afectado por características físicas, químicas y microbiológicas, pero debido a que todas las piedras usadas en el ensayo consisten principalmente en carbonato, los factores fisicoquímicos no son los que más afectan a la precipitación biogénica, centrándose así la atención sobre aquellos relacionados con la microbiología.

Este trabajo de investigación se ha limitado a evaluar el tratamiento en condiciones controladas y óptimas. En un futuro se plantea el estudio en circunstancias que se asemejen más a las reales, y se le dará mayor importancia al tipo de medio de cultivo que tiene una gran influencia en la apariencia visual de la piedra tratada.

Éste es el primer estudio en el que se trata la penetración del tratamiento de biomineralización en la piedra. Se observaron los mayores efectos de penetración en Euville y Savonnières, del orden de 2 mm superior que en los tratamientos anteriores de biodeposición.

Aunque se observaron diferencias en la profundidad de penetración entre los 5 tipos de piedra, no fue así para el efecto consolidante, tratados mediante sonicación. Podría significar que el ensayo de sonicación no es lo suficientemente sensible para detectar variaciones en ensayos a esas profundidades.

La mayor cantidad de carbonato biogénico se produjo en la piedra con mayor número de poros

(Savonnières), siendo razonable el resultado ya que la absorción de células bacterianas se ve facilitado al haber un mayor espacio en los poros. Esta mayor presencia de cristales de carbonato dio lugar a una menor absorción de agua, lo que supone un aumento en la resistencia ante procesos de degradación derivados del agua (congelación, ataque de sales transportadas por el agua, etc.).

4.3.4 TABLA RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ESPERIMENTOS

| <i>Ensayos</i> | <i>Año</i> | <i>Tipo de piedra</i> | <i>Contenido bacteriano de las probetas</i> | <i>Medio de cultivo</i> | <i>Conclusiones</i> |
|---|------------|--|---|--|---|
| Consolidation of quarry calcarenite by calcium carbonate precipitation induced by bacteria activated among the microbiota inhabiting the stone | 2008 | Calcarenita bioplástica | <ul style="list-style-type: none"> - Estériles - Sin inocular - M. xanthus | <ul style="list-style-type: none"> - M-3 (líquido y sólido) - M-3P (líquido y sólido) - CC (líquido y sólido) | <ul style="list-style-type: none"> - Promueve el crecimiento de bacterias de la piedra que precipitan carbonato cálcico a partir de aminoácidos - Evita la formación de ácidos - A mayor pH, mayor consolidación - La alcalinidad producida limita el crecimiento de hongos - Se consolida la piedra |
| Consolidation of ornamental stone by microbial carbonatogenesis | 2010 | Calcarenita bioplástica | <ul style="list-style-type: none"> - Blanco - Sin inocular - M.xanthus | M-3P | <ul style="list-style-type: none"> - Mayor dureza superficial con respecto a la piedra sin tratar - No se producen variaciones de color - Se aumenta la población bacteriana y el porcentaje de ellas que son carbonatogénicas, en concreto, proteobacterias - Se activan bacterias que precipitan el carbonato independientemente de la presencia de sales - No se hallan bacterias peligrosas - Buen método para su aplicación <i>in situ</i> |
| Influence of pore structure on the effectiveness of a biogenic carbonate surface treatment for limestone conservation | 2011 | Calizas menos porosas (Massangis, Euville y Aubigny) y calizas más porosas (Savonnières y Avesnes) | B. sphaericus | Levadura + Urea | <ul style="list-style-type: none"> - Mayor producción de carbonato biogénico en las piedras con mayor número de poros - Menor absorción del agua en piedras con mayor número de poros debido a la mayor formación de cristales en ellos |

Tabla 13: Resumen de los ensayos de biomineralización

4.4 ÚLTIMOS AVANCES

Los ensayos estudiados anteriormente se centran en dos modos de aplicación de la técnica: la inoculación de bacterias externas a la piedra junto a un medio de cultivo favorable para su desarrollo y la inyección de un medio de cultivo estéril que propicie el crecimiento de la comunidad bacteriana autóctona en la piedra a tartar. Sin embargo, estos dos métodos presentan rendimientos limitados cuando se aplican en situaciones de alta erosión por sal. Se sabe que la meteorización por sal es altamente perjudicial y suele suponer un taponamiento parcial de los poros debido a las sales solubles, que además puede inhibir la proliferación de bacterias carbonatogénicas.

Como solución, recientemente se propuso un nuevo modo de aplicación de esta técnica: se extrajeron muestras de una piedra dañada por el ataque de sales y se llevaron a un laboratorio donde se introdujeron en un medio de cultivo. Transcurridas 24 horas, se habían incubado una gran población de bacterias autóctonas de la propia piedra, que posteriormente se aplicó sobre la pieza original *in situ*. Los resultados obtenidos fueron mejores, en el caso de piezas con este tipo de ataques, que con los dos métodos de aplicación anteriores. Sorprendentemente, tal tratamiento ayuda a reducir la cantidad de microorganismos nocivos implicados en el biodeterioro, probablemente porque están en desventaja competitiva con las bacterias carbonatogénicas activadas selectivamente por el tratamiento. Esto es de gran interés, ya que implica que el tratamiento de conservación bacteriana no solo ayuda a proteger y consolidar el sustrato tratado, sino que también reduce los posibles procesos de biodeterioro microbiano.

La facilidad de aplicación del segundo método lo lleva a ser el más funcional en la mayoría de los casos. Sin embargo, este tercer método sería el recomendable para aquellas situaciones de alto ataque salino. La limitación de estos dos métodos radica en la necesidad de presencia de bacterias autóctonas en la piedra, aunque los estudios han demostrado que en casi todos los sustratos en la superficie de la Tierra existen bacterias carbonatogénicas (Jroundí, Gonzalez-Muñoz, & Rodriguez-Navarro, 2021).

4.5 VENTAJAS E INCONVENIENTES

El método de biomineralización presenta un gran número de ventajas, aunque también algunos inconvenientes, que se detallan a continuación (Hansen, Doehme, Fidler, et al., 2003):

Ventajas:

- Compatible ambiental y físicamente con piedra caliza y yeso.
- Menor impacto ambiental por escasa utilización de sustancias contaminantes y la reducción de gasto energético (Flores, 2015).
- Económicamente más rentable (Flores, 2015).
- Reduce la permeabilidad al agua de la piedra mientras mantiene su transpiración para permitir el intercambio de gases (González-Muñoz, 2008).
- Mejora la química de la precipitación aprovechando el proceso biológico.
- Forma un calcio coherente, bien cementado y una estructura de carbonato fuertemente adherida al sustrato.
- Mediante la utilización de las bacterias y los medios de cultivo apropiados se pueden personalizar el tipo de cemento y la textura.
- No altera el color de la piedra ni tapa los poros naturales (González-Muñoz, 2008).

Desventajas:

- Funciona mejor en piedra recién limpiada.
- Limitada profundidad de penetración.

- Puede promover más tipos de crecimiento biológico en superficies.

4.6 INVESTIGADORES Y PROYECTOS EUROPEOS

Exista un gran número de investigadores y equipos de investigación que trabajan en el desarrollo de esta técnica de una u otra manera, alguno de ellos, en el marco de una serie de proyectos europeos. Dentro de estos proyectos se han destacado los siguientes (González-Muñoz, 2008):

- Equipo de investigación de Adolphe, Castanier, Loubière, Le Métayer-Levrel y colaboradores (grupo francés).
- Research team of González-Muñoz and Rodríguez-Gallego (group of the Universidad de Granada, Spain).
- Group of Verstraete (Ghent University, Bélgica).
- Group of Bang (Escuela de Minas y Tecnología de Dakota del Sur, EE. UU.).
- Proyecto BIOBRUSH (http://www.heritage.xtd.pl/pdf/Bio_3_May.pdf), coordinador Eric (Universidad de Portsmouth, Reino Unido). En el marco de este proyecto, el grupo de Claudia Sorlini (Università degli Studi di Milano, Italia).
- Proyecto BIOREINFORCE <http://www.ub.es/rpat/bioreinforce/bioreinforce.htm>), coordinador Piero norte Tirano (Instituto para la Conservación y Valorización del Patrimonio Cultural, G Sesto Fiorentino, Italia). En el marco de este proyecto, el grupo de Brunella Perito y Giorgio Mastromei th (Universidad de Florencia, Italia).

Una empresa privada española con la que ha sido posible contactar y que utiliza este método para la restauración y conservación de la piedra en monumentos es K-BYO Biological (K-BYO Biological, 2021). Esta empresa granadina trabaja con un producto llamado Myxostone M3P, una solución acuosa de componentes orgánicos e inorgánicos que actúa como medio de cultivo natural, sin aditivos ni conservantes, totalmente ecológico que sirve de alimento para la bacteria *Myxococcus xanthus*. Es interesante destacar que el producto es solo el medio, pero no contiene ninguna bacteria; las bacterias que se reproducirán y llevarán a cabo la biomineralización son únicamente las autóctonas que ya se encuentren en la propia piedra. Este cultivo es el resultado de investigaciones llevadas a cabo por la Universidad de Granada durante más de 20 años.

Este producto es aplicable a cualquier tipo de roca (calcárea porosa alterada, calcárea porosa de cantera, morteros tradicionales de cal y bastardos, morteros a base de cemento Portland, piedra arenisca, etc.) siempre que exista población de estas bacterias carbonatogénicas. También se ha demostrado su efectividad en mármol, en yesos y, gracias a unos ensayos recientes, también en tapiales.

Su uso es más eficaz en piedras con alta porosidad, ya que estos poros facilitan la expansión de la población bacteriana. Para piedra calcárea porosa, las condiciones óptimas de porosidad se darían en un rango de entre 10 y 35%, mientras que para un mortero tradicional a base de cal sería entre 15 y 40%.

A la hora de aplicar el producto, se debe llevar a cabo un estudio previo para asegurar la presencia de bacterias carbonatogénicas.

La superficie a tratar debe estar limpia y si la piedra contiene sales hay que eliminarlas, ya que la sal ocupa los huecos y los cristales formados en la mineralización de las bacterias no se unen entre sí y no forman una estructura sólida.

Si en el proceso de limpieza de la piedra se utilizan biocidas, deberá esperarse 3 meses antes de proceder a la aplicación de Myxostone M3P, para permitir la regeneración natural de la microbiota.

El producto se debe aplicar mediante un atomizador o spray sobre la superficie de la piedra cada 12 horas (2 veces al día normalmente, o las necesarias para mantener la piedra saturada) a lo largo de un periodo de entre 7 y 10 días. A los 5 o 6 días comienza a verse los nuevos cristales de carbonato cálcico. Si se aplica a piezas pequeñas o en condiciones de laboratorio, se sugiere proceder de la misma forma que para en grandes superficies o *in situ*. Aunque no se han descrito efectos nocivos en contacto con la piel, se recomienda el uso de un equipo de seguridad adecuado (guantes, mascarilla, ropa protectora, etc)

El rango óptimo de temperatura y humedad es de 18 a 22°C y de 50 a 80% respectivamente. Además, exponer la zona tratada durante el tratamiento a radiación sola u otras fuentes luminosas podría causar que el producto no funcionara. Algunas bacterias producen un pigmento anaranjado para protegerse de los rayos ultravioletas, lo que produce un indeseable cambio estético en la piedra.

Para mantener las condiciones ambientales que se indican anteriormente, es importante realizar un encapsulado de la zona, donde, además, mantener una concentración de CO₂ estable.

El Myxostone M3P ha sido utilizado en diferentes monumentos de interés como en las columnas de mármol del Patio de los Leones de la Alhambra de Granada (España), el Alcázar de Córdoba (España), la Basílica de Fátima en Ourém (Portugal), el Palacio da Pena en Sintra (Portugal), o en el pilar de la fuente del Palacio de Carlos V de la Alhambra de Granada (España). De este último, se exponen a continuación imágenes comparativas entre antes y después de la aplicación del tratamiento:



Ilustración 27: Muestra de los efectos del tratamiento Myxostone M3P sobre calcarenita bioclástica de un pilar de la fuente del Palacio de Carlos V en la Alhambra de Granada. Lupa de 800 aumentos (KBYOBIOLOGICAL, 2021).

PIEDRA TRATADA PIEDRA NO TRATADA



Ilustración 28: Muestra de los efectos del tratamiento Myxostone M3P sobre calcarenita bioclástica de un pilar de la fuente del Palacio de Carlos V en la Alhambra de Granada. Lupa de 800 aumentos (KBYOBIOLOGICAL, 2021).

5 CONCLUSIÓN

La biomineralización del carbonato de calcio puede ser una alternativa ecológica a los tratamientos convencionales existentes, debido a su bajo impacto ambiental, además de por su capacidad para formar una capa de CaCO_3 compatible y coherente con la piedra tratada, mostrando además unas cualidades estéticas similares a las originales.

Un punto común de posible mejora futura para este tipo de tecnologías es el rendimiento de consolidación de la piedra, que aún no es comparable al de los polímeros sintéticos. A pesar de ello, los efectos consolidantes mostrados son muy positivos y mejoran la cohesión de los elementos que conforman la obra o la pieza.

Un factor importante a la hora de sus aplicaciones es el estudio y selección previa del tipo de piedra a tratar, ya que la estructura de poros afecta en gran medida a la profundidad de penetración y al rendimiento del tratamiento.

A día de hoy, se han realizados estudios, tanto en laboratorio como *in situ*, en los que se demuestra el potencial de las aplicaciones bacterianas con el fin de que se produzca la precipitación del carbonato de calcio, llegándose incluso a desarrollar productos de biomineralización por parte de algunas empresas y aplicándolos en procesos de restauración del Patrimonio Cultural.

Además, ha quedado demostrado que no es necesaria la inoculación de bacterias externas a la propia microbiota de la piedra, ya que éstas pueden precipitar el carbonato de calcio si se les proporciona un medio óptimo con los nutrientes necesarios para su supervivencia y reproducción.

Sin embargo, la aplicación de estos mecanismos en edificios y piezas reales no está aún demasiado extendida, por lo que se dispone de pocos casos y se desconoce la evolución real a largo plazo.

Algunos autores plantean preguntas como: de dónde procede el calcio del carbonato, cómo se controla la velocidad de reacción, cómo afectan las limitaciones climáticas o si es posible la formación de una capa de carbonato de calcio uniforme teniendo en cuenta la distribución aleatoria que suelen tener las bacterias. Por todo esto, parece razonable concluir que es un método potencialmente capaz de solucionar muchos de los problemas que suponían los métodos convencionales, pero que aún necesitan un mayor periodo de investigación.

Índice de ilustraciones

| | |
|--|----|
| Ilustración 1: Estructura de la sílice | 17 |
| Ilustración 2: Representación de los diferentes comportamientos de superficies pétreas frente a la acción del agua. (A) Pared sin protección, (B) Pared hidrofugada en la que se forma una película superficial que reduce la entrada de agua líquida, permitiendo el intercambio de vapor de agua con el ambiente, (C) Pared impermeabilizada (Hidalgo & Villegas, 2018, p. 24)..... | 21 |
| Ilustración 3: Monómero de partida de los silicatos | 22 |
| Ilustración 4: Esquema de un ESEM. En este tipo de SEM es posible variar la presión en la columna del microscopio, de forma que ésta sea muy cercana a la atmosférica en la cámara portamuestras (tomado de Rodríguez-Navarro & Doehne, 1999) (IAPH, 2006, p. 53) | 28 |
| Ilustración 5: Equipo SEM comercial: FEG modelo SIRION de FEI Company (Illescas Salinas, 2012, pp. 74-75) | 29 |
| Ilustración 6: Imágenes de las superficies de la piedra después de las aplicaciones de un tratamiento con nanopartículas tomadas con un microscopio digital de mano con un aumento de 40x. Caliza de la cantera de Espera: (a) sin tratar (b) y (c) con tratamientos diferentes. Calcarenita de Puerto de Santa María: (d) sin tratar (e) y (f) con tratamientos diferentes. Se pueden apreciar pequeños cristales blancos, por ejemplo, en (b). ... | 30 |
| Ilustración 7: Curva de evaporación del agua (Ontiveros & Villegas, 2006, p.42)..... | 34 |
| Ilustración 8: Contenido en agua (% p/p) en función del tiempo | 35 |
| Ilustración 9: Absorción por capilaridad de una probeta expresada como la variación de la masa de agua en % respecto a la raíz del tiempo..... | 37 |
| Ilustración 10: Medida del ángulo de contacto de gota | 38 |
| Ilustración 11: Hidrorrepelencia en función del ángulo de contacto de la gota de agua (ATRIA Innovation, 2016)..... | 38 |
| Ilustración 12: Ensayos para determinar las diferentes propiedades mecánicas de un material (Ontiveros Ortega & Villegas Sánchez, 2006) | 39 |
| Ilustración 13: Absorción de agua (en % en peso) antes (1) y después (2) del ensayo de heladicidad frente al tiempo (en horas)..... | 42 |
| Ilustración 14: Absorción de agua (en % en peso) antes y después del ensayo termohigrométrico frente al tiempo (en horas) (Villegas, 2000) | 44 |
| Ilustración 15: Esquema de cámara de simulación de atmósferas contaminadas (Adaptación de Vale, 1982)..... | 45 |
| Ilustración 16: a) Microfotografía de microscopía electrónica de barrido (SEM) de células vegetativas de <i>Myxococcus xanthus</i> . (La barra representa 2 μ m). b) Microfotografía SEM de un cuerpo fructífero de <i>M. xanthus</i> . (La barra representa 10 μ m)..... | 50 |
| Ilustración 17: a) y b) Microfotografías SEM de cristales de vaterita inducidos por <i>M. xanthus</i> en medio de cultivo M3-P. (La barra representa 5 μ m). La vaterita muestra una morfología esférica y una apariencia similar a la de las lentejas. | 51 |
| Ilustración 18: Proceso de bioprecipitación de carbonato cálcico a partir de aminoácidos (Jroundi, Gonzalez-Muñoz, & Rodríguez-Navarro, 2021) | 52 |

| | |
|---|----|
| Ilustración 19: Proceso de formación de carbonato de calcio sobre la pared bacteriana inducido por la urea. DIC es el carbonato inorgánico disuelto y AMM el amoniaco (Muyneck, Belie, & Verstraete, 2009). | 52 |
| Ilustración 20: Imágenes microscópicas ópticas de colonias de diferentes aislamientos que muestran producción de carbonato cálcico, (a) colonia con producción considerable de carbonato cálcico; (b) notable precipitación de carbonato de calcio dentro de la colonia y también en el medio de cultivo circundante; (c) borde de una colonia que muestra una intensa precipitación de carbonato de calcio; (d) precipitación intensa de carbonato de calcio en el interior y los bordes de una colonia e incluso en el medio de cultivo adyacente; (e): colonias que muestran pocos cristales de carbonato de calcio; (f) colonias que muestran una producción notable de carbonato de calcio. Las áreas mineralizadas dentro de las colonias aparecen oscuras..... | 57 |
| Ilustración 21: pH y concentración de calcio medidos en el medio durante el transcurso del tiempo de los experimentos para M-3: (a) y (d), para M-3P: (b) y (e) y para CC: (c) y (f) | 58 |
| Ilustración 22: Muestra de piedra del "Ábside". A) Antes del tratamiento; B) Tratada con M3-P + M.xanthus; C) Tratada únicamente con M3-P. Escala de la barra: 4 micras..... | 60 |
| Ilustración 23: Influencia del número de células (A), la presencia de calcio (B) y el tipo de piedra (C) sobre la cantidad de urea hidrolizada por la bacteria <i>B. sphaericus</i> | 65 |
| Ilustración 24:Influencia de la porosidad en la capacidad de absorción de agua (A y B) y la evaporación de ésta (C y D) (en términos de pérdida de peso) para diferentes tipos de piedra | 66 |
| Ilustración 25:Influencia de la porosidad a la resistencia a la sonicación (en términos de pérdida de masa provoca por este fenómeno) para los diferentes tipos de piedra en diferentes medios..... | 67 |
| Ilustración 26:Influencia de la porosidad al ataque salino (en términos de pérdida de peso tras la congelación y descongelación -menor pérdida de peso supone una mayor resistencia-) | 68 |
| Ilustración 27: Muestra de los efectos del tratamiento Myxostone M3P sobre calcarenita bioclástica de un pilar de la fuente del Palacio de Carlos V en la Alhambra de Granada. Lupa de 800 aumentos (KBYOBIOLOGICAL, 2021)..... | 73 |
| Ilustración 28: Muestra de los efectos del tratamiento Myxostone M3P sobre calcarenita bioclástica de un pilar de la fuente del Palacio de Carlos V en la Alhambra de Granada. Lupa de 800 aumentos (KBYOBIOLOGICAL, 2021)..... | 74 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Características de los consolidantes (Villegas, 1989)..... | 15 |
| Tabla 2: Productos comerciales utilizados en Europa como consolidantes (Esbert, Ordaz, Alonso, & Montoro, 1997, p. 81) | 19 |
| Tabla 3: Resultados de pruebas de color (coordinadas CIE) en probetas de Guadix (Villegas, 2003, p. 198) | 31 |
| Tabla 4: Valores de consumo y materia seca de los diferentes tratamientos aplicados sobre la calcarenita de Snata Pudia y valores de porosidad total obtenidos mediante MIP (Illescas Salinas, 2012, p. 205) | 33 |
| Tabla 5: Bioprotectores de los monumentos patrimoniales (Dakal & Cameotra, 2012) | 49 |
| Tabla 6: Producción de cristales de carbonato de calcio a lo largo del tiempo por aislamientos de experimentos que contienen calcarenita no estéril sumergida en medios de cultivo estériles M-3 y M-3P | 56 |
| Tabla 7: Producción de cristales de carbonato de calcio a lo largo del tiempo por aislamientos de experimentos que contienen calcarenita no estéril sumergida en medios de cultivo M-3 y M-3P inoculados con <i>M.xanthus</i> | 56 |
| Tabla 8: Disminución de peso (g/m^2) tras la prueba de cinta Peeling sobre la piedra tratada. Apse es el “Ábside” y Gate la “Puerta”. | 60 |
| Tabla 9: Recuento de colonias bacterianas (ufc/ml) y % de bacterias carbonatogénicas en el “Ábside”. A) Tratada con <i>M.xanthus</i> + M-3P; B) Tratada únicamente con M-3P..... | 61 |
| Tabla 10: Recuento de colonias bacterianas (ufc/ml) y % de bacterias carbonatogénicas en la “Puerta”. A) Tratada con <i>M.xanthus</i> + M-3P; B) Tratada únicamente con M-3P. A1,B1) Inoculadas en medio sólido M3-P; A2,B2) Inoculadas en medio sólido MH (para muestras de las áreas salinas)..... | 61 |
| Tabla 11: Porcentaje de bacterias productoras de ácido (cultivadas en medio suplementado con glucosa)..... | 61 |
| Tabla 12: Aumento de peso de las piedras calizas y valores de pH para diferentes tipos de tratamientos de biodeposición. | 64 |
| Tabla 13: Resumen de los ensayos de biomineralización | 70 |

Índice de ecuaciones

| | |
|---|----|
| Ecuación 1: Formación de carbonato a partir de hidróxido de calcio (Esbert, Ordaz, Alonso, & Montoro, 1997, p. 78) | 16 |
| Ecuación 2: Formación de carbonato a partir de hidróxido de bario | 17 |
| Ecuación 3: Hidrólisis del grupo alcoxi | 17 |
| Ecuación 4: Polimerización de los consolidantes organosilícicos | 18 |
| Ecuación 5: Hidrólisis de los silicatos | 22 |
| Ecuación 6: Porosidad abierta: | 32 |
| Ecuación 7: Densidad aparente: | 32 |
| Ecuación 8: Contenido de agua a saturación: | 32 |
| Ecuación 9: Cantidad de agua absorbida | 36 |
| Ecuación 10: Coeficiente de saturación | 36 |
| Ecuación 11: Ley de Javin para el cálculo de la altura de ascenso capilar: | 36 |
| Ecuación 12: Cantidad de agua absorbida por capilaridad: | 36 |
| Ecuación 13: Variación de peso por capilaridad: | 37 |
| Ecuación 14: Ángulo de contacto de gota: | 38 |
| Ecuación 15: Calculo de la impedancia | 40 |
| Ecuación 16: Velocidad de propagación de los impulsos ultrasónicos: | 40 |
| Ecuación 17: Desgaste lineal por abrasión: | 41 |
| Ecuación 18: Hidrólisis de la urea 1: | 51 |
| Ecuación 19: Hidrólisis de la urea 2: | 51 |
| Ecuación 20: Formación de carbonato a partir de ácido carbónico: | 51 |
| Ecuación 21: Formación de aniones de hidróxido que elevan el pH del medio: | 51 |
| Ecuación 22: Formación de carbonato de calcio a partir de carbonato. (Ksp es la constante del producto de solubilidad): | 52 |
| Ecuación 23: Captación del ion de calcio por la bacteria: | 53 |
| Ecuación 24: Formación del carbonato y cloruro amónico: | 53 |
| Ecuación 25: Formación de carbonato de calcio en la superficie de la célula: | 53 |

Referencias

- Bäuerlein, E. (2003). Biomineralization of unicellular organisms: an unusual membrane biochemistry for the production of inorganic nano- and microstructures.
- Becerra, J., Zaderenko, A. P., & Ortiz, P. (2019). Basic Protocol for On-Site Testing Consolidant Nanoparticles on Stone Cultural Heritage. NDPI.
- Biological, K.-B. (2021). Guía de Aplicación Myxostone M3P.
- Clifton, J. (1980). Stone Consolidating Materials: A Status Report. Washington.
- Dakal, T. C., & Cameotra, S. S. (2012). Carbonatogenesis: Microbial Contribution to the Conservation of Monuments and Stone Artwork.
- De Muynck, W., Leuridan, S., Van Loo, D., Verbeken, K., & al., e. (2011). Influence of Pore Structure on the Effectiveness of a Biogenic Carbonate Surface Treatment for Limestone Conservation.
- Dhami, N. K., Sudhakara Reddy, M., & Mukherjee, A. (2013). Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. *Frontiers in Microbiology*.
- Doehne, E., & Price, C. A. (2010). *Stone Conservation. An Overview of Current Research*. Los Ángeles.
- Esbert, R. M., Ordaz, J., Alonso, F. J., & Montoro, M. (1997). *Manual de Diagnóstico y Tratamiento de Materiales Pétreos y Cerámicos*. Barcelona.
- Flores, J. D. (2015). Bacterias Productoras de Biocemento. Obtenido de Investigación y Ciencia: <https://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/muros-de-fuego-627/bacterias-productoras-de-biocementos-13022>
- García de Miguel, J. M., Sánchez Castillo, L., González Aguado, M. T., & Puche Riart, O. (s.f.). Impacto Ambiental sobre el Patrimonio Monumental en Piedra. *Industria Minera*, 25.
- González-Muñoz, M. T. (2008). Bacterial Biomineralization Applied to the Protection-Consolidation of Ornamental Stone: Current Development and Perspectives.
- Hansen, E., Doehne, E., Fidler, J., & al., e. (2003). A review of selected inorganic consolidants and protective treatments for porous calcareous materials. *REVIEWS IN CONSERVATION*.
- Hidalgo, A., & Villegas, R. (2018). Nuevos Tratamientos Consolidantes para la Piedra del Parlamento de Andalucía. Trabajo de Fin de Grado. Sevilla.
- Histórico, I. A. (2006). 19. PH cuadernos.
- Hosseini, M., & Karapanagiotis, I. (2018). *Advanced Materials for the Conservation of Stone*. Thessaloniki: Springer.
- Illescas Salinas, J. (2012). Nuevos Nanomateriales para la Conservación del Patrimonio Monumental Andaluz. Tesis Doctoral. Cádiz.

- Innovation, A. (24 de Octubre de 2016). ¿Qué es el ángulo de contacto? Obtenido de <https://www.atriainnovation.com/que-es-el-angulo-de-contacto/>
- Jimenez-Lopez, C., Jroundi, F., Pascolini, C., Rodríguez-Navarro, C., & al., e. (2008). Consolidation of quarry calcarenite by calcium carbonate precipitation induced by bacteria activated among the microbiota inhabiting the stone.
- Jiménez-López, C., Jroundi, F., Pascolini, C., Rodríguez-Navarro, C., Piñar, G., Rodríguez-Gallego, M., & al., e. (2008). Consolidation of quarry calcarenite by calcium carbonate precipitation induced by bacteria activated among microbia inhabiting the stone.
- Jiménez-López, C., Jroundi, F., Rodríguez-Gallego, M., Arias, J. M., & González-Muñoz, M. T. (2007). Biomineralization induced by Myxobacteria.
- Jiménez-López, C., Rodríguez-Navarro, C., Pióar, G., Carrillo-Rosa, F. J., Rodríguez-Gallego, M., & Gonzalez-Muñoz, M. (2007). Consolidation of degraded arnamental porous limestone stone by calcium carbonate precipitation induced by microbiota inhabiting tha stone.
- Jroundi, F., E.J., B., Rodríguez-Navarro, C., & González-Muñoz, M. (2010). Consolidation of ornamental stone by microbial carbonatogenesis.
- Jroundi, F., Gonzalez-Muñoz, M., & Rodriguez-Navarro, C. (2021). Protection and Consolidation of Stone Heritage by Bacterial Carbonatogenesis. Joseph E. (eds) Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage E. (eds). Obtenido de https://doi.org/10.1007/978-3-030-69411-1_13
- KBYOBIOLOGICAL. (2021). Aportada por personal técnico de la empresa. Granada, España.
- Knorre, H., & Krumbein, K. (2000). Bacterial calcification: in Microbial Seciments.
- Martín Pérez, A. (1993). Ensayos y experiencias de alteración en la conservación de piedras de interés histórico-artístico. Conservación del Patrimonio Arquitectónico .
- Muynck, W. D., Belie, N. D., & Verstraete, W. (2009). Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review.
- Narvasi, M., Mastromei, G., & Perito, B. (2020). Bacterial Calcium Carbonate Mineralization in situ Strategies for Conservation of Stone Artwokrs: From Cell Components to Microbial Community. *Frontiers in Microbiology*.
- Ontiveros Ortega, E., & Villegas Sánchez, R. (2006). Programa de normalización de estudios previos y control de calidad de las intervenciones. Propiedades mecánicas 2ª Parte. PH cuadernos 19.
- Ontiveros Ortega, E., & Villegas Sánchez, R. (2006). Programa de normalización de estudios previos y control de calidad de las intervenciones. Propiedades mecánicas. 1ª Parte. IDEA Criterios y Métodos.
- Ontiveros Ortega, E., & Villegas Sánchez, R. (2006). Programa de normalización de estudios previos y control de calidad en intervenciones: Propiedades Hídricas. 1ª Parte. PH cuadernos 19.
- Ontiveros Ortega, E., & Villegas Sánchez, R. (2006). Programa de normalización de estudios previos y control de calidad en las intervenciones. Propiedades hídricas. 2ª Parte. PH Cuadernos 19.

- Rodriguez Navarro, C., Rodríguez-Gallego, M., Ben Chekroun, K., & González Muñoz, M. (2003). Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization.
- Soriano, S., & Walker, N. (1968). Isolation of ammonia-oxidizing autotrophic bacteria. *The Journal of applied bacteriology*.
- Tiano, P., Cantisani, E., Sutherland, I., & Paget, J. (2006). Biomediated reinforcement of weathered calcareous stones. *Journal of Cultural Heritage*.
- UNESCO. (2021). Patrimonio . Obtenido de <https://es.unesco.org/creativity/sites/creativity/files/digital-library/cdis/Patrimonio.pdf>
- Villegas Sánchez, R. (1989). Tesis Doctoral.
- Villegas Sánchez, R. (2003). Metodología para la evaluación y estudio previo de tratamientos. En *Metodología de Diagnóstico y Evaluación de Tratamientos para la Conservación de los Edificios Históricos*. Sevilla: Comares.
- Villegas Sánchez, R. (2021). Clases del Máster en Ingeniería Química.
- Villegas, R. (2000). Programa de normalización de estudios previos y control de la calidad en las intervenciones. Ensayos de alteración de materiales pétreos. *PH Boletín* 31.
- Villegas, R., Baglioni, R., & Sameño, M. (2003). Tipología de Materiales para Tratamiento. En *Varios, Metodología de Diagnóstico y Evaluación de Tratamientos para la Conservación de los Edificios Históricos*. Comares.
- Zamarreño, D., & al., e. (2009). Carbonate crystals precipitated freshwater bacteria and their use as a limestone consolidant.

UNE-EN 1926/99. Métodos de ensayo para la piedra. Determinación de la resistencia mecánica a la compresión

UNE-EN 1936/99. Métodos de ensayo para la piedra natural. Determinación del coeficiente de absorción de agua por capilaridad

UNE-EN 14579/05. Métodos de ensayo para la piedra. Determinación de la velocidad de propagación de ultrasonidos

RILEM. (1978) Comm Pierres Groupes 25 PEM: Experimental methods recommended. Proceeding of International Symposium on the Deterioration and Protection of the Stone Monuments, UNESCO-RILEM, Vol.5, Paris June 5-9, 1978 (Publ. CEBTP) TEST VI. I: External aspect of stones

ASTM D 653-78: Standard definitions of the terms and symbols relating to soil and rock mechanics

RILEM 1980. Essis recommandés pour mesurer l'altération des pierres et évaluer l'efficacité des méthodes de traitement, Matériaux et Constructions

ICR CNR. NORMAL: 7/81. Assorbimento d'acqua per immersione totale

ASTM /448-64 Método del ensayo de abrasión

