

# EL BIODETERIORO EN EDIFICIOS DEL PATRIMONIO CULTURAL. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS BIOCIDAS

Tesis Doctoral  
Marta Sameño Puerto

Sevilla 2018





Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico  
**CONSEJERÍA DE CULTURA**

# **EL BIODETERIORO EN EDIFICIOS DEL PATRIMONIO CULTURAL. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS BIOCIDAS**

**TESIS DOCTORAL**  
**Marta Sameño Puerto**

**Dpto. Ingeniería Química y Ambiental. ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA (US)**  
**Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico (IAPH). JUNTA DE ANDALUCÍA**

**Dirigida por las doctoras:**

**Dra. Rosario Villegas Sánchez (Tutora)**

**Dra. Lourdes Martín García**

**Sevilla, 2018**



Este trabajo de Tesis Doctoral comenzó a desarrollarse hace muchos años. Por circunstancias laborales y personales, la velocidad de realización no ha sido la deseada, pero en la mente de la doctoranda siempre ha estado presente el deseo de investigar y sistematizar sobre los estudios de biodeterioro que el IAPH había incorporado de manera rutinaria en sus proyectos de intervención. Es por ello que en la mayoría de los trabajos que la doctoranda ha llevado a cabo, además de los estudios que obligatoriamente debían efectuarse (identificación de especies, propuesta de tratamientos), ha ido añadiendo tareas de investigación (esencialmente en lo referido a las interacciones de los biocidas con los materiales del sustrato o con otros tratamientos, o la puesta a punto de distintas técnicas de análisis) que han ido dando contenido a esta propuesta de tesis.



***A Manolo.  
Mi niño,  
mi ángel,  
mi inspiración.***





*La belleza perece en la vida, pero es inmortal en el arte.*

**Leonardo Da Vinci**



## AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a mis directoras, la Dra. Rosario Villegas Sánchez y la Dra. Lourdes Martín García, por compartir conmigo sus conocimientos científicos, por su asesoramiento, por su apoyo, por confiar en mí y, sobre todo, por su amistad. Sin ellas no hubiese sido posible la realización de esta tesis doctoral.

Al Dr. Román Fernández-Baca Casares, durante muchos años director del IAPH, actual director general de Bellas Artes del Ministerio de Cultura, por concederme el privilegio de trabajar en tantos y tantos bienes del patrimonio histórico pero, sobre todo, por su apoyo y su cariño.

Al Dr. José Román Pérez Castiñeira, profesor titular del Dpto. de Biología Molecular de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla, por abrirme las puertas de su laboratorio del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF), siempre dispuesto ayudarme, por su interés mostrado en estos estudios y sus importantes aportaciones.

A mi compañero y amigo, D. Víctor Menguiano Chaparro, por su inestimable colaboración y sus múltiples aportaciones, estudios y fotografías. Sobre todo por el trabajo realizado en parte de los resultados de esta investigación.

A D. Jesús Espinosa Gaitán, Dña. Ana Tirado Hernández y a Dña. Gema Moreno Aparicio, por su ayuda y por sus valiosas aportaciones en algunos de los estudios efectuados en esta tesis.

A la Dra. María José González, profesora titular del Dpto. de Pintura de la Facultad de Bellas Artes de la Universidad de Sevilla y a D. Lorenzo Pérez del Campo, jefe del Centro de Intervención del IAPH (actual director del mismo), por ayudarme siempre a mejorar profesionalmente siendo un estímulo constante en muchos momentos decisivos.

A D. Raniero Baglioni, Dña. Cinta Rubio Faure, Dña. Maite Real Palma y Dña. Lourdes Núñez Casares, restauradores del IAPH, por su ayuda para preparar las probetas empleadas en mis experimentos.

A D. Eugenio Fernández Ruiz y Dña. Isabel Dugo Cobacho por sus magníficas fotografías de alta calidad para los estudios de eficacia biocidas mediante análisis digital de imagen.

A Karen Thorley, mi *teacher*, por corregir mi inglés y por su amistad.

A mis amigos Anselmo y Cristina, por la bonita portada. Y a Carmen, Macarena y Marta, por su interés sobre la redacción de esta tesis. No han dejado de preguntarme estos últimos meses.

A mi familia, en especial a mi hermana Luci, por acogerme en su casa de Newcastle donde pude adelantar bastante en la redacción de este trabajo.

Y, sobre todo, a mis padres, Emilio y M<sup>a</sup> Carmen, por creer en mí, por su apoyo incondicional, por su cariño infinito. A mi madre, por enseñarme a descubrir que todo esfuerzo tiene su recompensa y por ayudarme siempre, en cada momento de mi vida. A mi padre, por ser un ejemplo a seguir de constancia y superación, por haberme ayudado a ser como soy y por su sentido del humor.

Finalmente, a Manolo, GRACIAS por su amor, por su ayuda y por estar ahí, siempre conmigo. Y a nuestros hijos, Marta y Emilio, porque, sin saberlo, me han ayudado a levantarme cuando no tenía fuerzas para seguir, tantas veces...



## **TÍTULO: El biodeterioro en edificios del Patrimonio Cultural. Metodología de evaluación de tratamientos biocidas.**

### **RESUMEN**

Esta investigación se centra en el estudio del biodeterioro que experimentan los materiales que forman parte de los bienes culturales y la evaluación del comportamiento de los tratamientos para combatirlos. Para ello, se han estudiado varios edificios del Patrimonio Cultural en Andalucía: la portada de la iglesia del convento de Santa Paula de Sevilla; la decoración de ataurique del Salón Rico de Medina Azahara de Córdoba; las Pinturas de la Sala de los Reyes de la Alhambra de Granada y la Macsura de la Mezquita de Córdoba. Estos inmuebles están formados tanto por materiales inorgánicos (ladrillo, piedra, pintura mural) como por materiales orgánicos (madera, cuero) los cuales pueden sufrir procesos de biodeterioro que ocasionan cambios en sus propiedades físicas, químicas y estéticas.

El objetivo general es la formulación de una metodología para el estudio del biodeterioro de los materiales constitutivos y el establecimiento de una propuesta de intervención, desde el punto de vista biológico, mediante la selección de tratamientos biocidas eficaces y compatibles con dichos materiales. Para ello, se realiza la caracterización de los materiales originales de las obras en estudio con el objeto de determinar su susceptibilidad al biodeterioro y a los distintos tratamientos biocidas. Por otro lado, se realiza la determinación de especies biológicas que se encuentran deteriorando estos materiales, mediante estudios microbiológicos y botánicos. Además, se evalúa la efectividad de diferentes productos biocidas así como su compatibilidad con los distintos materiales originales de las obras en estudio y con otros tratamientos de conservación (consolidantes). Se han utilizado diferentes técnicas de análisis como: microscopía estereoscópica, óptica y electrónica de barrido con microanálisis elemental mediante energía dispersiva de rayos X (SEM-EDX); difracción de rayos X (DRX); espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y cromatografía de gases (CG); técnicas de cultivo y técnicas de biología molecular; espectroscopia UV-visible; y determinación de propiedades físicas y mecánicas: colorimetría, porosidad, velocidad de transmisión de ultrasonidos y dureza superficial.

Los diferentes productos biocidas a emplear se seleccionaron en función de los organismos detectados en los diferentes materiales que componían los inmuebles. Así, en el caso de materiales pétreos y cerámicos, se usaron los alguicidas/liquenicidas: sales de amonio cuaternario (Preventol Ri80, New Des 50, Biotin T y Biotin R). Mientras que para los materiales orgánicos y las pinturas, se emplearon fundamentalmente fungicidas: voriconazol, tiabendazol, nanopartículas de óxido de cobre, nanopartículas de óxido de zinc y nanopartículas de dióxido de titanio.

Los parámetros que se han empleado en la evaluación de estos tratamientos han sido fundamentalmente dos: el estudio comparativo de la eficacia de los biocidas y el estudio de la interacción o compatibilidad del biocida con el material, en cada uno de los casos objeto de estudio.

Para comprobar la eficacia de los biocidas en el caso de los geomateriales, se ha estudiado la vitalidad de microorganismos fotótrofos al microscopio óptico, la interfase de estructuras liquénicas con el sustrato mediante el SEM y la estimación de biomasa fotosintética por espectrofotometría ultravioleta-visible. Así mismo, en el caso de la madera, se ha recurrido a la observación del crecimiento fúngico en probetas tras la aplicación de biocidas.

Por otra parte, se han realizado una serie de ensayos para analizar la interacción o interferencia que estos productos biocidas presentan con el principal material constitutivo de cada

monumento. Para ello, se han elaborado réplicas o probetas de los distintos materiales en estudio y, tras la aplicación de los biocidas, se han observado estos materiales al SEM-EDX y se han efectuado microanálisis elementales mediante energía dispersiva de Rayos X, para poder detectar posibles cambios en la composición química, así como en la morfología a nivel microscópico. También en algunos casos, cuando ha sido posible, se han realizado ensayos para cuantificar las posibles variaciones sufridas en diferentes propiedades físicas de los materiales (colorimetría, porosidad abierta, dureza superficial, absorción humedad atmosférica, velocidad de ultrasonido, etc.).

El Biotin R ha resultado ser el más adecuado para eliminar el biodeterioro en la piedra de los atauriques del Salón Rico de Medina Azahara, tanto por su eficacia como por su escasa interacción con el material constitutivo, sin embargo, en el caso de los materiales cerámicos de Santa Paula, ha resultado ser el Preventol Ri80. A su vez, se determina que el Biotin T es completamente inadecuado para eliminar biodeteriogenos de los atauriques, puesto que se detecta una alta disgregación del material cuando se aplica por inmersión. En general, todos estos productos biocidas aumentan, aunque levemente, la porosidad de los geomateriales analizados.

Con respecto a las pinturas sobre cuero de la Sala de los Reyes de la Alhambra y las maderas y pinturas murales de la Macsura de la Mezquita de Córdoba, todos los biocidas ensayados han resultado ser eficaces reduciendo la proliferación de especies fúngicas. El tratamiento con nanopartículas de CuO, aunque resulta el más eficaz, produce un cambio de color muy significativo en todos los materiales sobre los que se ha ensayado, maderas y materiales pictóricos, oscureciéndolos, por lo que su utilización no está indicada en patrimonio histórico.

Los pigmentos que se han visto más alterados tras la aplicación de los biocidas son el rojo y el azul. El tiabendazol es el fungicida que ocasiona menor cambio cromático en todos los casos. El estudio realizado mediante SEM-EDX, evidencia que no existen cambios químicos ni morfológicos significativos en la superficie de las muestras tras el tratamiento con los productos.

La conjunción de todos estos estudios ha permitido determinar qué producto biocida es el más adecuado para, en cada caso, eliminar los agentes biológicos responsables del deterioro de los materiales constitutivos. Así mismo, se ha puesto de manifiesto que siempre es necesario efectuar estudios previos de caracterización de materiales, de determinación de especies biológicas y de evaluación de tratamientos, tanto de su efectividad como de su compatibilidad con los materiales que forman parte de los bienes culturales en estudio, ya que los efectos que estos tratamientos producen sobre ellos varían dependiendo de la naturaleza de los mismos.

**Palabras clave:** Biocida, Biodeterioro, Compatibilidad, Efectividad, Geomaterial, Madera, Materiales pictóricos

**TITLE: Biodeterioration in Cultural Heritage buildings. Methodology for evaluating biocidal treatments.**

**ABSTRACT**

This research focuses on the study of biodeterioration experienced/suffered by materials that are part of cultural assets and how to evaluate the behaviour of the treatments that are used to control it. For this purpose, several buildings of Cultural Heritage in Andalusia have been studied: the church cover of the Santa Paula convent in Seville; the ataurique decoration in the Salon Rico in Medina Azahara in Córdoba; the Paintings in the Hall of the Kings of the Alhambra in Granada and the *Macsura* of the Mosque in Cordoba. These buildings are made up of both inorganic materials (brick, stone, wall paint) and organic materials (wood, leather) which can undergo biodeterioration processes that cause changes in their physical, chemical and aesthetic properties.

The general objective is to formulate a methodology to study the biodeterioration of the constituent materials and to establish an intervention proposal from the biological point of view, by selecting effective biocide treatments that are compatible with these materials. For this purpose, a characterization of the original materials of the works under study was performed in order to determine how susceptible they were to biodeterioration and to the different biocidal treatments. On the other hand, the biological species that are deteriorating these materials, are determined with microbiological and botanical studies. In addition, the effectiveness of different biocidal products is evaluated, as well as their compatibility with the different original materials of the works under study and with other conservation treatments (consolidants). Different analysis techniques were used, such as: stereoscopic microscopy, optics and scanning electronics with elemental microanalysis using X-ray dispersive energy (SEM-EDX); X-ray diffraction (XRD); Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and gas chromatography (GC); culture techniques and molecular biology techniques; UV-visible spectroscopy; and determination of physical and mechanical properties: colorimetry, porosity, speed of ultrasound transmission and surface hardness.

The different biocidal products to be used were selected based on the organisms detected in the different materials that made up the buildings. Thus, in the case of stone and ceramic materials, algacides / lichenicides were used: quaternary ammonium salts (Preventol Ri80, New Des 50, Biotin T and Biotin R). While for organic materials and paints, fungicides were mainly used: voriconazole, thiabendazole, copper oxide nanoparticles, zinc oxide nanoparticles and titanium dioxide nanoparticles.

Two fundamental parameters were used to evaluate these treatments: the comparative study of the efficacy of the biocides and the study of the how the biocide interacts with, or how compatible it is with the material in each of the cases under study.

In order to verify how effective the biocides are in the case of geomaterials, we studied the vitality of phototrophic microorganisms under an optical microscope, the interface of lichen structures with the substrate by SEM and the estimation of photosynthetic biomass by ultraviolet-visible spectrophotometry. Likewise, in the case of wood, fungal growth was observed in specimens after applying the biocides.

On the other hand, a series of tests were carried out to analyze how the biocidal products interact or interfere with the main constituent material of each monument. To this end, replicas or specimens of the different materials under study were prepared and, after applying the biocides, these materials were observed at SEM-EDX, and elemental microanalyses were carried

out using X-ray dispersive energy in order to detect possible changes in the chemical compositions, as well as morphology at microscopic level. Also in some cases, when it was possible, tests were also carried out to quantify possible variations suffered in the different physical properties of the materials (colorimetry, open porosity, surface hardness, atmospheric moisture absorption, ultrasound speed, etc.).

The Biotin R has proved to be the most suitable in eliminating biodeterioration in the stone of the atauriques in the Rico Salon in Medina Azahara, as much for its effectiveness as for its low level of/scarcely interaction with the constituent material, however, in the case of the ceramic materials in Santa Paula, the most suitable turned out to be Preventol Ri80. In turn, it was determined that Biotin T is completely unsuitable or eliminatong biodeteriogens from the atauriques, due to a level of high disintegration of the material detected when it was applied by immersion. In general, all these biocidal products increase, albeit very slightly, the porosity of the geomaterials analyzed.

With respect to the paintings on leather in the Hall of the Kings in the Alhambra and the wood and wall paintings of the *Macsurá* of the Mosque of Córdoba, all the biocides tested proved effective in reducing the proliferation of fungal species. The treatment with CuO nanoparticles, although it is the most effective, caused a very significant color change in all the materials it was tested on, ie wood and pictorial materials, by darkening them, so their use is not indicated in historical heritage.

The pigments that were the most altered after the applying the biocides are red and blue. Thiabendazole is the fungicide that causes the least chromatic change in all cases. The study carried out by SEM-EDX, shows that there are no significant chemical or morphological changes in the surface of the samples after being treated with the products.

The combination of all these studies has made it possible to determine which biocidal product is the most suitable for each case, eliminating the biological agents responsible for the deterioration of the constituent materials. Likewise, it has become clear that it is always necessary to perform preliminary characterization studies on the materials, to determine biological species and to evaluate the treatments, both with regard to how effective they are and how compatible they are with the materials that are part of the cultural assets in study, since the effects that these treatments produce on them vary depending on their nature.

**Key words:** Biocide, Biodeterioration, Compatibility, Effectiveness, Geomaterial, Wood, Pictorial materials



# ÍNDICE

<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>1</b>
<b>BLOQUE I. ASPECTOS GENERALES. ESTADO DE LA CUESTIÓN</b>	<b>7</b>
<b>1. EL BIODETERIORO DEL PATRIMONIO CULTURAL</b>	<b>9</b>
1.1 DEFINICIÓN Y MECANISMOS DE LOS PROCESOS	10
1.2 FACTORES ECOLÓGICOS	10
Condiciones necesarias para el crecimiento de organismos	12
1.3 FACTORES BIOLÓGICOS DE DETERIORO	13
Principales grupos de organismos	13
1.4 MECANISMOS Y ASPECTOS MORFOLÓGICOS DEL BIODETERIORO	22
1.4.1 Procesos físicos o mecánicos (disgregación o fracturación)	22
1.4.2 Procesos químicos (descomposición)	23
1.4.3 Daños estéticos	23
1.4.4 Aspecto morfológico de las alteraciones biológicas	24
1.5 LOS PROCESOS DE BIODETERIORO EN FUNCIÓN DE LOS MATERIALES DE LOS BIENES CULTURALES	27
1.5.1 Materiales orgánicos de origen vegetal	27
1.5.2 Materiales orgánicos de origen animal	30
1.5.3 Materiales pictóricos	31
1.5.4 Materiales inorgánicos: materiales pétreos	33
<b>2. LA CONSERVACIÓN DEL PATRIMONIO CULTURAL</b>	<b>39</b>
2.1 METODOLOGÍA DE ESTUDIO DEL BIODETERIORO Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS	39
2.1.1 Toma de muestras	39
2.1.2 Estimación directa de organismos	40
2.1.3 Estimación indirecta de organismos	42
2.1.4 Diagnóstico de la actividad biodeteriorante de los organismos sobre el material	43
2.2 MÉTODOS DE PREVENCIÓN Y CONTROL DEL BIODETERIORO. BIOCIDAS	44
2.2.1 Métodos indirectos	44
2.2.2 Métodos directos	45
2.3 OTROS TRATAMIENTOS: CONSOLIDANTES E HIDRÓFUGOS	52
2.4 EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS DE CONSERVACIÓN	56
2.4.1 Evaluación de la eficacia de tratamientos para erradicar el biodeterioro	59
2.4.2 Evaluación de la compatibilidad de los tratamientos	62
<b>BLOQUE II. METODOLOGÍA DE TRABAJO</b>	<b>65</b>
<b>1. TÉCNICAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO</b>	<b>68</b>
1.1 MICROSCOPÍA ESTEREOSCÓPICA	68
1.2 MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ TRANSMITIDA Y REFLEJADA (MO) Y MICROSCOPÍA ÓPTICA DE POLARIZACIÓN (MOP)	68

1.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) Y MICROANÁLISIS ELEMENTAL MEDIANTE ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X (EDX)	69
1.4 DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)	71
1.5 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)- CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)	71
1.6 REACCIÓN DE TINCIÓN CON HIDRÓXIDO DE POTASIO (KOH)	71
1.7 TÉCNICAS DE CULTIVO. CRECIMIENTO BIOLÓGICO EN LABORATORIO	72
1.8 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	73
1.9 ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE	77
1.10 COLORIMETRÍA	78
1.11 POROSIDAD	79
1.12 VELOCIDAD DE PROPAGACIÓN POR ULTRASONIDOS	80
1.13 DUREZA SUPERFICIAL	80
<b>2. METODOLOGÍA DE CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES</b>	<b>81</b>
2.1 MATERIALES PÉTREOS	81
2.2 MATERIALES DE ORIGEN BIOLÓGICO: MADERA Y CUERO	81
2.3 MATERIALES PICTÓRICOS	83
<b>3. METODOLOGÍA DE ESTUDIOS DE BIODETERIORO. DETERMINACIÓN DE ESPECIES</b>	<b>84</b>
3.1 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS HETERÓTROFOS: BACTERIAS, HONGOS FILAMENTOSOS Y DE PUDRICIÓN. IDENTIFICACIÓN DE INSECTOS.	85
3.2 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS FOTOAUTÓTROFOS: CIANOBACTERIAS Y ALGAS	86
3.3 IDENTIFICACIÓN DE LÍQUENES	87
3.4 IDENTIFICACIÓN DE BRIOFITOS	87
3.5 IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS SUPERIORES	87
<b>4. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS</b>	<b>88</b>
4.1 MATERIALES	89
4.2 TRATAMIENTOS	89
4.3 ENSAYOS DE EFECTIVIDAD	95
4.3.1 Estudio de la vitalidad de microorganismos fotótrofos al microscopio óptico	96
4.3.2 Estudio de la interfase liquen-sustrato al microscopio electrónico de barrido	96
4.3.3 Estimación de biomasa fotosintética por espectrofotometría UV-visible.	96
4.3.4 Capacidad de eliminación o reducción del crecimiento de especies de hongos filamentosos y de pudrición.	98
4.4 ENSAYOS DE COMPATIBILIDAD. ENSAYOS DE INTERFERENCIA PRODUCTO- SUSTRATO	102
4.4.1 Estudio al SEM-EDX	102
4.4.2 Colorimetría	103
4.4.3 Porosidad	103
4.4.4 Velocidad de propagación por ultrasonidos	104
4.4.5 Absorción de agua por higroscopicidad	104
4.4.6 Dureza superficial	105
4.4.7 Envejecimiento acelerado	105

<b>BLOQUE III. ESTUDIO EXPERIMENTAL</b>	107
<b>CAPÍTULO 1. PORTADA DE LA IGLESIA DEL CONVENTO DE SANTA PAULA (SEVILLA)</b>	109
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	111
1.1 HISTORIA Y ESTADO ACTUAL	111
1.2 PLAN DE TRABAJO	113
1.3 CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES	114
<b>2. ESTUDIOS DE BIODETERIORO</b>	115
2.1 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS FOTÓTROFOS	119
2.2 IDENTIFICACIÓN DE LÍQUENES	123
2.3 IDENTIFICACIÓN DE BRIOFITOS	132
2.4 IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS SUPERIORES	134
<b>3. EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS</b>	138
3.1 MATERIALES	138
3.2 TRATAMIENTOS	138
3.3 ENSAYOS DE EFICACIA BIOCIDA	138
3.3.1 Estudio de la vitalidad de microorganismos fotótrofos al microscopio óptico	138
3.3.2 Estudio de la interfase líquen-sustrato al microscopio electrónico de barrido	140
3.4 ENSAYOS DE INTERFERENCIA BIOCIDA-SUSTRATO	145
Estudio al microscopio electrónico de barrido (SEM-EDX)	146
<b>4. CONCLUSIONES</b>	151
<b>CAPÍTULO 2. ATURIQUES DEL SALÓN DE <i>ABD AL-RAHAMAN III</i> DEL CONJUNTO ARQUEOLÓGICO MEDINA AZAHARA (CÓRDOBA)</b>	155
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	157
1.1 HISTORIA Y ESTADO ACTUAL	157
1.2 PLAN DE TRABAJO	159
1.3 CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES	160
<b>2. ESTUDIOS DE BIODETERIORO</b>	160
2.1 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS FOTÓTROFOS	160
2.2 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS HETERÓTROFOS	162
2.3 IDENTIFICACIÓN DE LÍQUENES	162
2.4 IDENTIFICACIÓN DE BRIOFITOS	164
<b>3. EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS</b>	166
3.1 MATERIALES	166
3.2 TRATAMIENTOS	167
3.3 ENSAYOS DE EFICACIA BIOCIDA	167
3.3.1 Estimación de biomasa fotosintética por espectrofotometría UV-visible	167

3.3.2 Estudio de la interfase líquen-sustrato al SEM	169
3.4 ENSAYOS DE INTERFERENCIA BIOCIDA-SUSTRATO	174
3.4.1 Estudio al SEM-EDX	174
3.4.2 Colorimetría	184
3.4.3 Porosidad	184
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>185</b>
<b>CAPÍTULO 3. PINTURAS DE LA SALA DE LOS REYES DE LA ALHAMBRA (GRANADA)</b>	<b>187</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>189</b>
1.1 HISTORIA Y ESTADO ACTUAL	189
1.2 PLAN DE TRABAJO	194
1.3 CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES	195
1.3.1 Madera	195
1.3.2 Cuero	199
1.3.3 Capas pictóricas	201
<b>2. ESTUDIOS DE BIODETERIORO</b>	<b>206</b>
IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS: HONGOS FILAMENTOSOS Y DE PUDRICIÓN	209
<b>3. EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS</b>	<b>217</b>
3.1 MATERIALES	217
3.2 TRATAMIENTOS	221
3.3 ENSAYOS DE EFICACIA BIOCIDA	221
Capacidad de eliminación o reducción del crecimiento de especies de hongos filamentosos y de pudrición.	221
3.4 ENSAYOS DE COMPATIBILIDAD TRATAMIENTOS-SUSTRATOS	231
3.4.1 Colorimetría	231
3.4.2 Estudio de capas pictóricas	236
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>242</b>
<b>CAPÍTULO 4. CÚPULAS DE LA MAQSURA DE LA MEZQUITA-CATEDRAL (CÓRDOBA)</b>	<b>245</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>247</b>
1.1 HISTORIA Y ESTADO ACTUAL	247
1.2 PLAN DE TRABAJO	251
1.3 CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES	252
1.3.1 Madera	252
1.3.2 Capas pictóricas	255
<b>2. ESTUDIOS DE BIODETERIORO</b>	<b>260</b>
2.1 INTERIOR DE LAS CÚPULAS	266
Identificación de microorganismos: bacterias y hongos	266
2.2 TRASDÓS DE LA CUPULA CENTRAL	271
2.2.1 Identificación de microorganismos: hongos filamentosos y de pudrición	271

2.2.2 Análisis entomológico:Insectos	276
2.3 EXTERIOR DE LAS CÚPULAS	277
2.3.1 Identificación de microorganismos fotótrofos	277
2.3.2 Identificación de líquenes	280
2.3.3 Identificación de briofitos	283
2.3.4 Identificación de plantas superiores	284
<b>3. EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS</b>	<b>287</b>
3.1 MATERIALES	287
3.2 TRATAMIENTOS	289
3.3 ENSAYOS DE EFICACIA BIOCIDA	291
Capacidad de eliminación o reducción del crecimiento de especies de hongos filamentosos y de pudrición.	291
3.4 ENSAYOS DE COMPATIBILIDAD TRATAMIENTOS-SUSTRATOS Y DURABILIDAD	293
3.4.1 Compatibilidad de tratamientos en madera	293
Estudio al SEM-EDX	294
Colorimetría	298
Velocidad de ultrasonido	300
Absorción de agua por higroscopicidad	303
Dureza superficial	305
Ensayo de alteración acelerada	307
3.4.2 Compatibilidad con materiales pictóricos. Réplicas de las pinturas murales	309
Colorimetría	309
Estudio de capas pictóricas	310
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>314</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>319</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>325</b>



## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**





Aunque la ciencia y la tecnología han estado siempre presentes, como componentes del desarrollo humano, las relaciones existentes entre las disciplinas científicas y humanísticas, particularmente en el campo de la conservación/restauración, se han consolidado en las últimas décadas. La investigación científica, propiamente dicha, aplicada al campo del Patrimonio Cultural comienza a jugar un papel sistemático en Europa a partir de fines del siglo XVIII y principios del XIX. Desde ese momento, la inserción de la investigación científica en este campo no ha parado de crecer (De Tagle, 2008).

Los proyectos de investigación en ciencias del patrimonio juegan un papel fundamental en el ámbito actual de la cultura occidental. Así como la formación académica universitaria de los profesionales encargados de estas ciencias y la integración de comunidades de investigación científica que incluyen diferentes áreas del conocimiento en los proyectos de conservación del patrimonio cultural (De Tagle, 2008).

En un proyecto de conservación-restauración de un bien cultural, resulta fundamental realizar un estudio previo del mismo, sobre todo de su estado de conservación y de las causas del deterioro que presenta. Sólo así es posible conocer los distintos factores de alteración y los métodos para combatirlos, con la finalidad de garantizar la conservación material del monumento.

A nivel nacional e internacional diversos organismos han realizado recomendaciones sobre criterios de intervención en Patrimonio Histórico, entre los que se recogen los estudios relacionados con el biodeterioro. El Instituto del Patrimonio Histórico Español publicó un documento (IPHE, 2003) en el que se recoge la necesidad de considerar los factores biológicos de alteración y los tratamientos biocidas. El *Istituto Centrale per il Restauro* (Roma), una de las entidades pioneras en este campo a nivel mundial, publicó dentro de los documentos NORMAL las recomendaciones para la investigación del biodeterioro (Doc. NORMAL 9/82, Doc. NORMAL 19/85, Doc. NORMAL 24/86).

Diferentes investigadores han incidido también sobre la necesidad de contemplar los estudios sobre los organismos vivos y sus efectos en el patrimonio inmueble (Lazzarini & Tabasso, 1986; Doehne & Price, 2010)

En Andalucía existe, desde 1989, un organismo, el Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico de la Junta de Andalucía (IAPH), que tiene entre sus fines generales, establecidos en sus estatutos, la intervención, investigación, conservación y valorización del patrimonio cultural andaluz, así como la innovación, la transferencia de conocimiento y el establecimiento de pautas para la tutela del patrimonio cultural.

El trabajo de investigación que se presenta a la consideración del Tribunal como tesis doctoral, se ha desarrollado en el Laboratorio de Biología del Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico (IAPH). Ha contado también para su realización con la colaboración de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería (ETSI) de la Universidad de Sevilla, institución a la que pertenece una de las directoras de esta tesis, así como la del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Sevilla. Además, este estudio ha sido posible gracias a las colaboraciones y convenios suscritos con la Dirección General de Bienes Culturales de la Junta de Andalucía, el Patronato de la Alhambra y el Generalife de Granada y el Cabildo de la Mezquita Catedral de Córdoba. La posibilidad de trabajar sobre obras reales del patrimonio histórico andaluz, en varias ocasiones consideradas por la Unesco como Patrimonio Mundial (Mezquita de Córdoba, Alhambra de Granada, Medina Azahara de Córdoba) ha permitido desarrollar estudios sobre aspectos poco investigados y elaborar un protocolo de trabajo que incluye todas las áreas relacionadas con el biodeterioro dentro de un proyecto interdisciplinar de conservación-restauración.

El objetivo principal de este trabajo es proponer y desarrollar una metodología amplia y novedosa para el estudio, en primer lugar, de la eficacia de los tratamientos biocidas, también de sus posibles interacciones (incompatibilidades o sinergias) con otros tratamientos que normalmente se aplican de forma conjunta con ellos en las intervenciones de restauración (consolidantes), y por último del efecto de estos biocidas sobre las características del sustrato y sobre su durabilidad.

Para comprobar la idoneidad de esta metodología, se ha aplicado a distintos casos de estudio de monumentos de especial interés en el Patrimonio Histórico andaluz, tanto por su importancia histórico-artística como porque con ellos se cubre un amplio rango de materiales que pueden ser alterados por distintos organismos. Ello va a permitir establecer diferentes protocolos de actuación atendiendo a la naturaleza del material objeto de estudio. Con esta selección se ha pretendido abordar un número significativo de obras que permita realizar un estudio lo más exhaustivo posible que incluya la mayoría de los materiales, tanto orgánicos como inorgánicos, que es posible encontrar en edificios del patrimonio histórico. Recoge materiales inorgánicos como la piedra, el ladrillo o la pintura mural y materiales orgánicos como la madera o el cuero. Este proyecto de tesis doctoral muestra los estudios realizados en los proyectos de intervención de diferentes inmuebles del patrimonio histórico de Andalucía llevados a cabo en el IAPH: la portada de la iglesia del monasterio de Santa Paula de Sevilla, los atauriques del Salón Rico de *Abd Al-Rahman III* del conjunto arqueológico de Medina Azahara (Córdoba), las pinturas de la Sala de los Reyes de la Alhambra de Granada y la *Maqsura* de la Mezquita de Córdoba.

La metodología elaborada que aquí se propone para diagnosticar el estado de alteración de los bienes culturales y las causas que lo determinan, así como para evaluar la actuación y el comportamiento de los distintos tratamientos y productos biocidas a aplicar, comprende los siguientes pasos:

- Identificar los materiales constitutivos (originales o añadidos a lo largo del tiempo) de los bienes culturales y realizar réplicas para la experimentación.
- Obtener datos precisos acerca del estado de conservación de los materiales que constituyen los inmuebles en estudio.
- Caracterizar las alteraciones producidas por la acción conjunta de organismos y condiciones ambientales en los materiales constituyentes de estos materiales.
- Identificar mediante técnicas visuales, técnicas de cultivo y técnicas de biología molecular, los organismos presentes en estos materiales.
- Realizar un estudio del deterioro a nivel microscópico con una doble finalidad: por un lado aportar información que ayude a la comprensión del proceso de deterioro y del papel que juegan los microorganismos y por otro, poner de manifiesto las alteraciones estéticas y/o estructurales de los materiales, así como los cambios que pueden llevar a la pérdida de amplias zonas de la obra.
- Proponer las medidas de control y/o erradicación más apropiadas para cada caso en concreto.
- Evaluar los tratamientos propuestos, determinando su eficacia contra las especies biológicas y su interacción con los materiales constitutivos.
- Realizar estudios comparativos del comportamiento entre los biocidas aplicados solos y en combinación con consolidantes, para determinar las posibles interacciones entre ellos.

Además, este trabajo pretende abrir nuevas vías de investigación sobre los procesos de alteración que se producen en cada uno de los materiales que constituyen estos inmuebles y comprobar el papel que juegan los organismos como agentes de deterioro. Para ello, se ha llevado a cabo el aislamiento y análisis de microorganismos, el estudio de organismos botánicos y se han utilizado diferentes técnicas de análisis que han permitido visualizar las alteraciones producidas en los materiales. Asimismo, se han propuesto una serie de ensayos experimentales para tratar de reproducir en el laboratorio, lo más fidedignamente posible, tanto los materiales que constituyen los distintos soportes biodeteriorados como las condiciones ambientales y los microorganismos que afectan a dichos soportes.



## **BLOQUE I. ASPECTOS GENERALES. ESTADO DE LA CUESTIÓN**



## 1. EL BIODETERIORO DEL PATRIMONIO CULTURAL

Dentro de un proyecto de conservación-restauración de una obra o pieza histórico-artística, es esencial hacer un estudio previo de la misma, de su valor patrimonial, de su estado de conservación y de su carácter y función social. De esta manera, se garantiza tanto la conservación material del monumento como la transmisión de sus valores y de su identidad cultural a la comunidad donde se encuentra.

La metodología habitual de restauración-conservación de bienes culturales está dividida en dos fases de trabajo. En primer lugar, se debe realizar un exhaustivo análisis del objeto de estudio y de su contexto, considerando los aspectos materiales, tecnológicos, estéticos, históricos y culturales; así como un estudio de los métodos, técnicas y productos de intervención compatibles con el bien y adecuados a sus problemas de deterioro. En segundo lugar, se realiza la intervención sobre el bien cultural, sustentada en el principio de mínima intervención, en el respeto a la autenticidad y en la reversibilidad de los procedimientos aplicados.

A la hora de realizar este análisis que comprende la primera fase del proceso de restauración y conservación, uno de los aspectos importantes a estudiar es el biodeterioro presente en los bienes culturales.

El biodeterioro que experimentan los distintos materiales que componen los bienes culturales es un fenómeno complejo, todavía bastante desconocido. Investigar sobre los agentes biológicos de deterioro y sobre las principales causas que lo provocan requiere de nuevos estudios que permitan identificar qué alteraciones se producen y qué tratamientos se necesitan. Aunque hay que resaltar la escasez de bibliografía referente a este último tema, existen algunos estudios que se dedican de forma directa a analizar las especies de organismos, los materiales que deterioran y el tipo de daño que provocan. Por otro lado, son interesantes los trabajos que se han dedicado al empleo de determinados métodos analíticos de identificación del efecto ejercido por estos agentes de deterioro (Ascaso et al., 2002; Ascaso et al., 2004; De los Ríos et al., 2008).

Esta revisión pretende aportar información sobre trabajos dedicados al análisis de las causas del biodeterioro que afecta a monumentos y obras de arte, especialmente a los geomateriales, maderas y materiales pictóricos, así como sobre estudios acerca de los principales métodos de control del biodeterioro.

El biodeterioro o el daño causado en las obras o piezas histórico-artísticas por organismos y microorganismos (plantas superiores, hongos, líquenes, briofitos, algas, cianobacterias...) ha sido estudiado a lo largo de los años (Warscheid y Braams, 2000; De los Ríos y Ascaso, 2005) debido a la creciente preocupación por las pérdidas irreparables y de gran valor que pueden ocasionar en el Patrimonio Cultural.

El grupo de investigación de "Ecología Microbiana y Geomicrobiología del Sustrato Lítico", del Instituto de Recursos Naturales de Madrid, cuenta con una estrategia de actuación iniciada en los años 90 (Ascaso & Ollacarizqueta, 1991) para detectar el biodeterioro en piedra monumental mediante técnicas de microscopía in situ y de biología molecular (Galván et al., 2006), para así analizar los microorganismos implicados, las alteraciones producidas por ellos y la evaluación de tratamientos para contrarrestarlos.

Como algunos autores han determinado (Warscheid and Braams, 2000; De los Ríos et al., 2009; 2012, entre otros), además de la alteración estética causada, la contaminación biológica promueve procesos abióticos debido a la alteración de la estructura del material, así como de sus propiedades termo-hídricas. Los agentes biológicos pueden originar daños de origen

mecánico (Ortega-Calvo, 1991) como la presión que ejercen sobre el material debido a la contracción y la dilatación de las estructuras biológicas, lo que podría causar un mayor debilitamiento del material constitutivo y su consecuente caída; y también pueden ocasionar alteraciones mediante procesos físicos y químicos (Ortega-Calvo, 1994).

### **1.1 DEFINICIÓN Y MECANISMOS DE LOS PROCESOS DE BIODETERIORO**

¿Qué es el biodeterioro? Este término puede ser definido como cualquier cambio indeseable en las propiedades de un material causado por la actividad vital de los organismos (Allsopp et al., 2004). El biodeterioro de las obras de arte se entiende como una alteración de los materiales que las constituyen debido a la actividad metabólica de una o más poblaciones de microorganismos u organismos.

Los monumentos, esculturas y otras obras de arte expuestas a la intemperie se han deteriorado a través de los siglos por causas naturales. El sol, las heladas, el viento, la lluvia, etc., contribuyen al proceso gradual de envejecimiento y deterioro. Este deterioro que experimentan los materiales ha aumentado progresivamente (Allsopp & Seal, 1986), mucho más rápidamente desde el siglo pasado, especialmente debido a la creciente contaminación atmosférica.

La mayoría de los organismos que crecen sobre los monumentos son capaces de generar sustancias que alteran irreversiblemente el material constitutivo, lo cual acelera el proceso de destrucción de dicho monumento. Es algo similar a lo que ocurre en el proceso de formación de suelos, pero en el caso anterior supone una pérdida irreparable.

Así pues, se puede decir que cualquier tipo de alteración irreversible, consecuencia de la actividad metabólica de una o más poblaciones de organismos vivos, cualquiera que sea el tamaño de éstos, es lo que actualmente se entiende por biodeterioro.

Sin embargo, la mera presencia de un organismo sobre un material no es suficiente para determinar que aquél sea el que ha causado el daño. Para poder probar este biodeterioro es necesario comprobar que ha cambiado alguna propiedad esencial del material en estudio.

Por otro lado, los fenómenos de biodeterioro no pueden ser considerados de manera aislada, sino que siempre aparecen asociados a procesos de alteración físicos y químicos. Algunos autores (Krumbein, 1988) consideran que la superficie de un monumento es colonizada por ciertos organismos vivos si previamente ésta sufre un proceso degradativo debido a la exposición al ambiente. La lluvia, el viento, el sol, el hielo y los contaminantes atmosféricos provocan un aumento de la superficie específica del material pétreo, por formación de macro y microfisuras y de rugosidades, lo que favorece la acumulación de partículas atmosféricas y la colonización por parte de organismos vivos (García Murillo, 1995).

### **1.2 FACTORES ECOLÓGICOS**

La ecología es la ciencia que estudia las relaciones entre los organismos y el ambiente. La unidad base de un estudio ecológico está representada por el ecosistema. Con este término se define una unidad que incluye todos los organismos que, en un área determinada, interactúan entre ellos y con el ambiente físico, de modo que el flujo de energía se da en una estructura trófica bien definida, con una equilibrada diversidad biótica y una transformación de la materia (Caneva et al., 1994).

Si se aplican estos conceptos ecológicos al estudio de una obra de arte, la cual representa el “sustrato”, ésta sería la materia que entra en el ciclo biogeoquímico, expuesta a la acción de los



factores ambientales y al ataque potencial por parte de diversas poblaciones biológicas (figura I.1).

Generalmente estas poblaciones representan los agentes biodeteriorantes, que son aquellos organismos que causan daños a la obra de arte. Sin embargo, la presencia de un factor biológico (organismo o microorganismo) no siempre es negativa, también puede influir positivamente mejorando, a veces, la conservación de la obra en cuestión, como es el caso de los líquenes que colonizan los muros de un edificio.

Respecto a las cadenas tróficas, que ponen de manifiesto la posición nutricional de un organismo en el sistema, los organismos presentes sobre una obra de arte, como en todos los ecosistemas, pueden ser tanto productores (autótrofos), como predadores o consumidores (heterótrofos).

Desde el punto de vista energético esta cadena trófica da lugar a una pirámide ecológica; en cada nivel se produce una dispersión de energía y un aumento de entropía, de acuerdo a la segunda ley de la termodinámica. Por esta razón quizá sea imposible la conservación del material por un tiempo infinito, en cuanto que la materia tiende siempre a adquirir una estructura más simple y con ello más estable (Caneva et al., 2005).

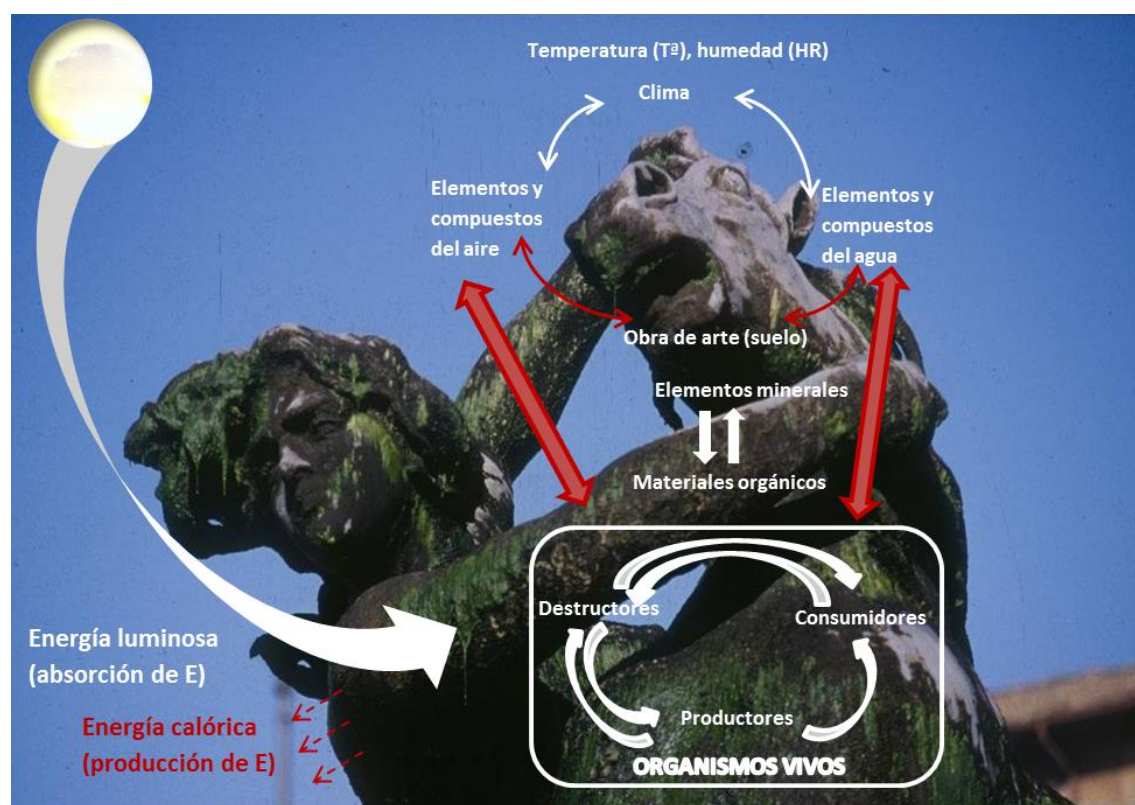


Figura I.1. Esquema de un bien cultural en clave ecosistémica (basado en el realizado por Caneva et al., 2005). Escultura de fuente de Plaza de la República, en Roma.

### Condiciones necesarias para el crecimiento de organismos

Cada grupo biológico puede iniciar su desarrollo y después seguir su crecimiento sólo si se dan determinadas condiciones ambientales. Con respecto a estas variables, existen límites de tolerancia (valores máximos y mínimos) que presentan los organismos. El espacio que existe entre estos valores extremos es la amplitud de tolerancia de una determinada especie. Se denomina factor limitante el factor ambiental que sobrepasa la amplitud de tolerancia de un individuo (Sameño Puerto, 2003).

Los parámetros que condicionan la colonización y el posterior crecimiento de los organismos, son entre otros:

- *la luz*: imprescindible para la fotosíntesis y con ello un factor limitante para organismos autótrofos. La fuente puede provenir no sólo del sol como más común, sino de fuentes artificiales, de distintos tipos e intensidades;

- *el oxígeno*: aunque no es un factor limitante, pues existen organismos anaerobios implicados en los procesos de biodeterioro, la mayoría de los organismos toman oxígeno (para la respiración celular). Con respecto a los microorganismos, las bacterias se clasifican en aerobias, que utilizan el oxígeno libre como aceptor final del hidrógeno (o electrones), y anaerobias, que utilizan como aceptores compuestos orgánicos o inorgánicos. La mayoría de los hongos necesitan oxígeno;

- *el carbono*: es un elemento indispensable para el desarrollo de todos los organismos, ya que forma parte de los polímeros que componen la estructura celular (polisacáridos, proteínas, enzimas, etc.). Puede ser asimilado por los organismos autótrofos (algas y ciertas bacterias) como dióxido de carbono, procedente del aire, a través de mecanismos asociados a procesos fotosintéticos y quimiosintéticos (según el grupo al que pertenezcan los organismos). Los heterótrofos lo asimilan bajo forma orgánica;

- *el nitrógeno*: posee la misma importancia que el elemento anterior. Sólo algunas bacterias y algas son capaces de fijarlo directamente de la atmósfera, el resto lo absorben en forma de sales inorgánicas;

- *el agua*: es indispensable para las funciones vitales de todos los organismos ya que constituye la mayor parte de la célula y es indispensable para los cambios metabólicos con el medio ambiente externo, aunque determinados grupos estén muy bien adaptados a la sequía. Puede ser absorbida directamente de la superficie de los monumentos (organismos sustrato-higrófilos), de la humedad atmosférica (organismos aerohigrófilos), o bien de la lluvia. La presencia de humedad predispone a las superficies de las obras de arte al biodeterioro. Los valores críticos de humedad relativa son del 60-65 %, por debajo de éstos se dificulta la proliferación de microorganismos;

- *la temperatura y el pH*: son parámetros importantes, aunque existen amplios rangos de tolerancia dependiendo del tipo de organismos. En el caso concreto de la temperatura, más que ser un factor limitante, afecta sólo a la velocidad de crecimiento. Los microorganismos pueden vivir en una amplia gama de valores, aunque tienen sus rangos de temperaturas óptimas. Esto permite clasificarlos en criófilos, mesófilos y termófilos. Son los mesófilos los que suelen atacar las obras de arte, retardándose su crecimiento por el frío. En cuanto al pH, también existe un amplio rango de valores, que van desde 2,8 a 8,5. La mayoría de las bacterias crecen mejor a pH próximos a la neutralidad, mientras que un pH ácido tiende a favorecer a los hongos.

Así pues, se puede observar que existen distintos factores para los cuales los organismos pueden crecer en determinados intervalos de tolerancia. Por lo tanto la presencia de un determinado organismo puede indicar que se hallan alrededor de un cierto valor concreto, información que puede ser útil cuando el rango de tolerancia es estrecho, porque permite utilizar este organismo como bioindicador (Sameño Puerto, 2003).

Por otro lado, ciertas condiciones extremas pueden suponer un cese en la actividad de algunos organismos, pero no necesariamente la desaparición de los mismos. Éstos pueden permanecer en estados latentes (estados de actividad metabólica mínima) durante cierto tiempo, de manera que sobre un determinado monumento siempre se puede encontrar una cierta población de organismos potencialmente dañinos.

Con respecto a la influencia que puede ejercer la contaminación atmosférica sobre la conservación de los monumentos, se puede decir que, evidentemente ésta es directa y negativa.

Se denominan contaminantes atmosféricos todas aquellas sustancias que no entran en la composición natural de la atmósfera o que se encuentran presentes a concentraciones superiores a lo normal (Caneva et al., 2005). Los contaminantes pueden aparecer en forma de partículas atmosféricas (hidrocarburos, silicatos, esporas, pólenes) o en forma de compuestos gaseosos (SO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, NO, NO<sub>2</sub>, CO, CO<sub>2</sub>, HF, HCl, O<sub>3</sub>).

Los contaminantes relacionados con el tráfico de vehículos, con las emisiones industriales y con los sistemas de calefacción, ejercen un efecto muy agresivo sobre los materiales constitutivos de los bienes culturales. Sin embargo, en el caso de los organismos biológicos, sus efectos son diferentes dependiendo de la naturaleza del contaminante y del tipo de organismo involucrado. En lo que respecta a los efectos tóxicos de los contaminantes químicos, no todos los organismos poseen la misma sensibilidad. Las especies más susceptibles son aquellas que no poseen mecanismos de protección pasiva o de excreción, en particular los briofitos y los líquenes. De hecho, ambos organismos son frecuentemente utilizados como bioindicadores de la contaminación ambiental, ya que su frecuencia y cobertura disminuyen notablemente en relación a estos parámetros (Nimis et al., 2002).

### **1.3 FACTORES BIOLÓGICOS DE DETERIORO**

El estudio del biodeterioro en España se ha abordado más tarde y con menos intensidad que la investigación sobre otros procesos de alteración de los monumentos (García Murillo, 1995; Sáiz Jiménez, 1982; Casas Sicart & Sáiz Jiménez, 1982; Rowe et al., 1991; Ariño et al., 1995; Vaillant Callol & Valentín Rodrigo, 1996). Durante mucho tiempo se ha tenido muy poco en cuenta la influencia de ciertos organismos sobre el estado de conservación de los materiales pétreos. Sin embargo, estudios llevados a cabo más recientemente ponen de manifiesto la importancia de tales organismos en los procesos de alteración de dichos materiales.

#### **Principales grupos de organismos**

Los diferentes organismos pueden ser agrupados (Caneva et al., 1994) en base a la forma química con la que asimilan el carbono (C), en base al tipo de reacción que proporciona la energía (E) necesaria para el metabolismo, y según el tipo de donadores de electrones (e<sup>-</sup>). Así pues, los organismos se subdividen en 4 categorías nutricionales (ver tabla I.1).

Tabla I.1. Clasificación de los organismos vivos en grupos nutricionales.

Tipo de organismo	Fuente de C	Fuente de E	Donadores de e-	Ejemplos
Fotoautótrofo o fotolitótrofos	CO <sub>2</sub>	Luz	Compuestos inorgánicos H <sub>2</sub> O, H <sub>2</sub> S, S	Plantas vasculares, algas, líquenes, cianobacterias y otras bacterias
Fotoheterótrofos o fotoorganotrofos	Sustancias orgánicas	Luz	Compuestos orgánicos	Bacterias rojas no sulfurosas
Quimioautótrofos o quimiosintéticos o quimiolitótrofos	CO <sub>2</sub>	Reacciones de óxido-reducción	Compuestos inorgánicos, H <sub>2</sub> S, S, H <sub>2</sub> , H <sub>3</sub> Fe.	Hidrogenobacterias, bacterias del azufre, ferrobacterias, b.denitrificantes
Quimioheterótrofos o quimioorganotrofos	Sustancias orgánicas	Reacciones de óxido-reducción	Compuestos orgánicos	Animales, protozoos, hongos, bacterias

Muchos organismos tienen la capacidad de concentrar moléculas del ambiente para poder crecer, de forma que posteriormente en ese lugar puede crecer otro organismo que no tenga esta capacidad. Esto es lo que se denomina concepto de sucesión.

Los organismos que mayoritariamente intervienen en los procesos de biodeterioro sobre materiales pétreos, se pueden agrupar, según el concepto de sucesión, de la siguiente manera:

- ① Microflora autótrofa: bacterias autótrofas (quimiosintéticas), algas y líquenes
- ② Microflora heterótrofa: bacterias heterótrofas, actinomicetos y hongos
- ③ Macroflora autótrofa: briofitos y plantas superiores (vasculares)

Se hace esta distinción para hablar de la sucesión en monumentos, es decir la secuencia en el tiempo en la que van a aparecer esos organismos (① → ② → ③). Así, mientras que en ① se puede encontrar un microorganismo, en ③ está presente una higuera.

Por otro lado, la fauna biodeteriorante se puede subdividir en Microfauna - insectos, arácnidos, etc. – y Macrofauna - mamíferos y aves.

En general, se puede afirmar que son los organismos autótrofos los que colonizan el sustrato en primer lugar, mientras que los heterótrofos, al necesitar materia orgánica para su crecimiento, aprovechan la presencia de los primeros para desarrollarse en este tipo de sustrato.

Las algas y las cianobacterias son las que generalmente inician la secuencia de la sucesión. Poseen la capacidad de instalarse sobre los sustratos pétreos resistiendo condiciones ambientales extremas. Los restos orgánicos, el polvo, las esporas, etc., pueden depositarse sobre este revestimiento de las algas. Esta capa, rica en sustancias nitrogenadas, constituye un medio ideal para las bacterias, hongos y líquenes. Y éstos, a su vez, facilitan la instalación de otros organismos, como los musgos, lo que suministra el suelo necesario para las plantas vasculares, cuyas raíces provocarán una degradación importante (Sameño Puerto, 2003).

### A. *Cianobacterias y algas verdes*

Sobre la piedra o en el interior de ésta se pueden localizar algas microscópicas que pertenecen a dos grupos sistemáticos: las Cianofíceas o Cianobacterias (en el pasado llamadas algas azules) y las Clorofíceas (algas verdes). Ocasionalmente, pueden ser encontradas también otro tipo de algas (por ejemplo, las diatomeas).

Las algas son microscópicas, unicelulares, aisladas o agrupadas en colonias más o menos compactas o formando filamentos. Los daños causados por las algas sobre las piedras son esencialmente de naturaleza estética. Sin embargo, según su forma de colonizar el sustrato las algas pueden dividirse en:

- algas recubridoras, que ejercen su acción recubriendo el sustrato, y por tanto, reteniendo polvo y suciedad sobre éste, lo que favorece el asentamiento de otros organismos;
- algas perforantes y corrosivas, que ejercen su acción sobre el material que colonizan mediante mecanismos químicos y físicos.

Otros autores las clasifican en epilíticas, que crecen sobre la superficie y endolíticas, que colonizan en profundidad rocas semitranslúcidas o translúcidas (Caneva et al., 1994).

Los factores ambientales más importantes que condicionan el crecimiento de las algas son la intensidad luminosa, la humedad, la temperatura y el pH. Las algas verdes y, más comúnmente las cianobacterias, son los primeros colonizadores de la piedra, puesto que necesitan luz, agua, algunos compuestos orgánicos y, preferiblemente, un sustrato ligeramente alcalino (pH= 7-8). Así, generalmente las piedras calcáreas (Tiano, 1986) son colonizadas más frecuentemente respecto a otros tipos de piedras como el granito.

Por otro lado, algunas cianobacterias están rodeadas de una vaina mucilaginosa y coloreada, capaz de absorber y retener el agua por mucho tiempo. Esto hace que logren sobrevivir en condiciones ambientales adversas, como una sequía prolongada. Así pues, en respuesta a las condiciones ambientales, las cianobacterias pueden activar o desactivar su metabolismo. Debido a esta característica, se puede decir que son las primeras en implantarse sobre el sustrato, mientras que las algas verdes llegarían a dominar sólo después de que la retención de agua por el sustrato estuviera favorecida por la presencia de las anteriores. Con respecto a la luz, en grutas u otros ambientes subterráneos, el desarrollo algal es debido al gradiente luminoso (natural o artificial).

Las diatomeas (*Bacillariophyceae*) requieren ambientes con elevado índice hídrico. En climas templados están presentes sólo en las fuentes y en zonas tropicales se han detectado cubiertas de diatomeas sobre areniscas, rocas deterioradas y edificios.

### B. *Líquenes*

Los líquenes son organismos capaces de ser activos o sobrevivir con diversas concentraciones de agua, gracias a esto es posible encontrarlos en ambientes muy extremos. Junto a las cianobacterias, los líquenes juegan un papel importante como organismos pioneros en la colonización de las rocas.

Son asociaciones simbióticas entre hongos y algas o cianobacterias. Pueden desarrollarse sobre piedras desnudas. Los talos superficiales contienen al alga, pero las hifas del hongo pueden penetrar profundamente en la piedra. Se desarrollan muy lentamente y ocupan ambientes

hostiles para la mayoría de las demás formas de vida vegetal (García-Rowe & Sáiz Jiménez, 1991).

Los líquenes que crecen sobre la piedra se llaman saxícolas y su presencia se manifiesta en forma de polvo y fragmentos del organismo (talos pulverulentos). Son sobre todo crustáceos, epilíticos o endolíticos (Normal 19/85, 1985), aunque también aparecen foliáceos, escumulosos o fruticulosos.

Los líquenes se pueden clasificar según su biotipo en (Tiano, 1986; García-Rowe & Sáiz Jiménez, 1991; Sameño Puerto et al., 1996):

- Crustáceo. Talo fuertemente adherido al sustrato por toda su superficie, normalmente carece de córtex inferior y se fija a través de las hifas del hongo (médula) que penetran en el sustrato. El talo puede desarrollarse totalmente incrustado en rocas (endolítico) o bien sobre el sustrato (epilítico). Desde el punto de vista de la erosión química y mecánica del sustrato, son los talos que presentan un mayor efecto negativo.
- Una variante del biotipo crustáceo se denomina leprarióide: talo enteramente pulverulento o granuloso-pulverulento, cuya superficie es irregular y no lisa.
- Foliáceo. El talo presenta un córtex inferior bien definido y se adhiere al sustrato mediante ricinas producidas por el hongo del liquen. La erosión química es menos acusada, si bien la erosión mecánica producida por las ricinas puede ser mayor que en el caso anterior (Tiano, 1986).
- Escumuloso. Talo formado por escamas con los bordes laxamente adheridos al sustrato, a veces superpuestas. Algunos no tienen córtex inferior, otros sí.
- Fruticuloso. Talo formado por lacinias erectas o pendientes y que se fija al sustrato por un punto (disco de fijación), por lo cual la erosión química es mucho menos acusada, pero la erosión mecánica es igual o superior que en el caso de los foliáceos. Las ramificaciones pueden ser cilíndricas o aplanadas.

Es posible que la secuencia de sucesión de los líquenes comience por los crustáceos, que actuarían como pioneros, seguidos por los foliáceos y los fruticulosos (García-Rowe & Sáiz Jiménez, 1991).

Con respecto a las condiciones ambientales, se pueden diferenciar claramente dos tipos de bioalteración en base a la humedad del sustrato: cuando ésta es continua predominan las cianobacterias, algas y briofitos (Caneva et al., 1994); sin embargo si la humedad no es permanente se observa la presencia de líquenes de biotipo (tipo ecológico) crustáceo, los cuales incrementan la alteración del sustrato.

Los líquenes tienen una amplia distribución ecológica. Esta distribución está influenciada por los gradientes ambientales y la distribución de nutrientes y minerales: depósitos salinos, restos de palomas (alto contenido en N y P). En este último caso se habla de flora ornitocoprófila.

Sobre piedra caliza, sustrato más invadido por los líquenes, el biotipo dominante es el crustáceo, aunque también se observan algunos biotipos foliáceos y escumulosos.

También, sobre un mismo monumento, la diferente exposición a la lluvia o a la luz solar, unida a las distintas características arquitectónicas, causan colonizaciones variadas y muy particulares de especies con distinta ecología.



Son organismos de crecimiento lento, con pocos requerimientos ecológicos y muy resistentes a las condiciones extremas de temperatura y humedad. Sin embargo, poseen una elevada sensibilidad a la contaminación atmosférica. En aquellos lugares donde la contaminación atmosférica es muy alta, los monumentos constituidos por materiales pétreos están completamente libres de colonización.

### C. *Bacterias y actinomicetos*

Las bacterias atacan la piedra por vía química. Las que juegan un papel importante en la degradación de las rocas y los minerales son autótrofas, pero también quimiolitotrófas facultativas (que usan indiferentemente sustratos orgánicos y/o inorgánicos) y heterótrofas.

Las alteraciones producidas por las bacterias no son diferentes de aquellas puramente químicas: costras negras, pulverizaciones, exfoliaciones. Generalmente los procesos abióticos son considerados más importantes y el papel que juegan las bacterias en el deterioro sólo se considera si, mediante los análisis, se demuestra una presencia consistente.

Los procesos de solubilización del sustrato, causados por microorganismos, van siempre acompañados de una acidificación del medio (producción de ácido) y de una pérdida de material lítico (Caneva et al., 1994).

Por otro lado, en el caso de las pinturas murales, las bacterias pueden causar también la variación de color de los pigmentos de aquellas. Sin embargo, los pigmentos a base de metales pesados pueden inhibir el crecimiento de muchos microorganismos por su efecto tóxico.

Para las bacterias, como para todos los microorganismos, el aspecto cuantitativo es fundamental para valorar su importancia en los procesos de degradación. No obstante, dependiendo de los distintos métodos utilizados para extraer las bacterias de la piedra, para cultivarlas y realizar conteos, se pueden obtener resultados muy diversos.

Las bacterias que se establecen sobre la superficie de los monumentos se pueden dividir en las llamadas quimioautótrofas o quimiosintéticas, que comprenden las bacterias del ciclo del azufre (sulfatorreductoras y sulfooxidantes), las bacterias del ciclo del nitrógeno y las ferrobacterias y, por otro lado, las bacterias heterótrofas y los actinomicetos.

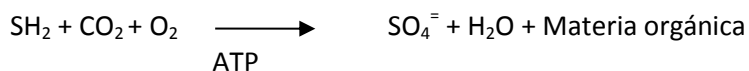
#### C.1. *Bacterias del ciclo del azufre*

La colonización y proliferación de estas bacterias es consecuencia de los procesos de alteración físico-químicos que haya sufrido el sustrato, así como de las condiciones ambientales.

La contaminación atmosférica deteriora el material original, formando nuevas sales, frecuentemente sulfatos. El dióxido de azufre junto con el ácido sulfhídrico, además del efecto agresivo que provocan, son los responsables de la presencia de compuestos azufrados sobre el sustrato, lo cual favorece la implantación de una flora bacteriana que utiliza tales compuestos.

- Bacterias sulfooxidantes.

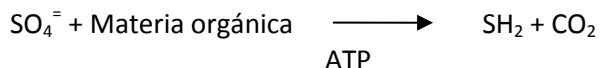
La formación biológica de yeso, casi siempre presente entre los productos de degradación de la piedra calcárea, es debida a la acción de estas bacterias, las cuales utilizan varios compuestos reducidos del azufre (Caneva et al., 1994). Sólo con la oxidación del azufre reducido obtienen la energía necesaria para la síntesis de su materia celular. La fuente de carbono que utilizan es el dióxido de carbono del aire, y la fuente de nitrógeno los nitratos o el amonio. Oxidan el ácido sulfhídrico, el azufre elemental, etc., para dar sulfatos mediante la reacción:



Así, las alteraciones son debidas a oxidaciones enzimáticas de sustancias sulfuradas y a la producción de ácido sulfúrico y/o sulfatos.

- Bacterias sulforreductoras.

Cuando se produce una reducción de sulfato a sulfuro es obra de estas bacterias. En la reacción anterior, el ácido sulfhídrico existente puede provenir tanto de la contaminación ambiental como de la reducción de sulfatos por estas bacterias según la ecuación:



Numerosos estudios prueban la presencia de bacterias del ciclo del azufre sobre monumentos pétreos en ciudades y en áreas rurales donde la polución atmosférica no puede ser la causa de la presencia de sulfatos.

### C.2. Bacterias del ciclo del nitrógeno (nitrificantes y nitritooxidantes)

Estas bacterias son capaces de acelerar la alteración de la piedra mediante procesos de oxidación, de los cuales obtienen su energía. Parte de esta energía la utilizan para obtener el carbono que necesitan.

Las primeras oxidan el amoníaco que transforman en ácido nitroso, y las segundas transforman el ácido nitroso en ácido nítrico (Caneva et al., 1994).

El nitrógeno atmosférico puede ser fijado por bacterias aerobias y anaerobias. Esto puede dar lugar a la formación de compuestos orgánicos nitrogenados lo que favorece el desarrollo de organismos heterótrofos (García Murillo, 1995). Estos compuestos pueden ser descompuestos en amoníaco por bacterias amonificantes (denitrificación), y este amoníaco, a su vez, puede ser oxidado a nitritos y nitratos por las bacterias nitrificantes y nitrooxidantes.

El papel de las bacterias nitrificantes es determinante en los procesos de biodeterioro de los materiales pétreos, porque el ácido así formado ataca los carbonatos produciendo nitrato de calcio, el cual es eliminado por las aguas de lluvia. La roca se disgrega y se vuelve pulverulenta. El aporte de amoníaco puede provenir tanto de la contaminación atmosférica como de la ascensión capilar de agua desde el suelo a los muros (García Murillo, 1995).

### C.3. Ferrobacterias

Entre las bacterias autótrofas se encuentran también las ferrobacterias que toman energía de la oxidación de los iones ferrosos a iones férricos y además pueden oxidar algunos minerales que contienen hierro como la pirita.

### C.4. Bacterias heterótrofas

Las bacterias heterótrofas juegan también un papel muy importante en la degradación de la piedra. Pueden ejercer su acción mediante formación de dióxido de carbono y de ácidos orgánicos que, aunque sean muy débiles, pueden actuar sobre el carbonato cálcico que constituye el sustrato.



En cuanto a los soportes orgánicos, atacan la celulosa de la madera transformándola, por medio de enzimas, sucesivamente en celobiosa, dióxido de carbono y ácidos grasos.

#### C.5. Actinomicetos

Con respecto a los actinomicetos, la frecuencia con que se encuentran sobre frescos y piedras deterioradas, especialmente en condiciones de elevada humedad y abundante materia orgánica, es considerable. Su presencia se manifiesta en forma de pátina blanquecina o blanco-grisácea, por lo que a veces se confunden con eflorescencias salinas.

Su capacidad de utilizar nitritos y nitratos y de reducir los sulfatos se ha demostrado experimentalmente. Con sus productos metabólicos (ácido carbónico, nítrico, sulfúrico y otros ácidos orgánicos más débiles) pueden atacar la piedra calcárea y algunos minerales (mica y ortoclasa) (Caneva et al., 1994).

Entre estos microorganismos, los *Streptomyces* son aquellos más frecuentemente aislados de pinturas murales en criptas, grutas y tumbas. A menudo se encuentran con otras bacterias, hongos y algas y se desarrollan en ambientes que se caracterizan por tener una alta y constante humedad relativa (85-100%).

#### D. Hongos

Los hongos, a pesar de ser organismos heterótrofos, a veces se pueden encontrar en materiales pétreos alterados, especialmente en las regiones tropicales (Caneva et al., 1994) o cuando las condiciones de humedad relativa y temperatura son elevadas.

Aunque la composición inorgánica de la piedra no ofrece un sustrato favorable para el crecimiento de estos microorganismos, existen residuos orgánicos de distinta naturaleza que casi siempre están presentes sobre la piedra y sobre pinturas murales, permitiendo el crecimiento de especies fúngicas con limitadas exigencias nutricionales (Caneva et al., 1994).

Así pues, desde el punto de vista morfológico, la presencia de hongos se reconoce por la formación de manchas debidas a sus pigmentos o a la presencia del micelio. Las manchas son más o menos superficiales y, a menudo, de color oscuro. La penetración del micelio fúngico puede ser profunda, por ejemplo en el revoco de la pintura mural, y causar pérdida de cohesión del estrato pictórico. En la piedra dolomítica y calcárea las hifas penetran los cristales de calcita. Algunos hongos son endolíticos y producen fenómenos de *pitting*.

Los hongos están presentes sobre todo en los materiales orgánicos que forman parte de muchos edificios. Se alimentan de la madera descomponiéndola, mediante enzimas, en sustancias más simples y fácilmente asimilables. Según el deterioro que producen se dividen:

##### D.1. Mohos

Son hongos microscópicos que se alimentan de las sustancias de reserva de la madera. Su presencia se pone de manifiesto cuando aparecen las hifas (micelio) y esporas en la superficie de la madera. Su ataque es superficial, no afecta a las propiedades físico-mecánicas de la madera.

##### D.2. Hongos de pudrición

Son hongos que atacan la pared celular de la madera, alimentándose de la celulosa o de la lignina según los casos. Es un ataque destructivo puesto que las piezas pierden rápidamente sus propiedades físico-mecánicas.

### E. *Plantas inferiores (briofitos) y superiores*

Los briofitos y las plantas vasculares crecen abundantemente sobre los edificios y las áreas arqueológicas cuando el sustrato y las condiciones ambientales son favorables. Éstas son un contenido de agua suficiente (importante sobre todo para los briofitos), una iluminación adecuada para permitir la actividad fotosintética y una buena porosidad del sustrato, que favorezca tanto la retención de humedad como la penetración mecánica de los rizoides o de las raíces.

#### E.1. *Briofitos*

Los briofitos, que comprenden a los musgos y las hepáticas, necesitan para poder crecer un mínimo estrato de suelo donde poder anclar sus primitivas raíces, es decir, no son capaces de desarrollarse directamente sobre el sustrato pétreo, sino que necesitan un depósito previo de materia (García Murillo, 1995). Además necesitan una presencia continua de agua sobre un sustrato preferiblemente poroso, como por ejemplo morteros, que acaban desintegrando por penetración de sus rizoides (Carcía-Rowe & Sáiz Jiménez, 1991) y estar protegidos de la luz solar (Tiano, 1986).

Los briofitos pueden ser clasificados por biotipos o tipos ecológicos (Carcía-Rowe & Sáiz Jiménez, 1991):

- Folioso. Biotipo que produce el mismo impacto que los talos foliáceos de los líquenes porque se adhieren al sustrato mediante rizoides.
- Taloso. Biotipo de hepáticas. Similar en cuanto a impacto al caso anterior.

Estos organismos no tienen órganos para la absorción de elementos minerales del suelo y el contacto entre la planta y su sustrato está escasamente desarrollado. Sus hojas no poseen una capa epidérmica diferenciada, sino que constan de un único estrato de células parenquimatosas, expuestas directamente al aire. Sus principales fuentes de elementos nutritivos son las sales minerales y los aerosoles suministrados por la lluvia y la deposición seca de partículas (García Murillo, 1995). De aquí se deduce su sensibilidad a los contaminantes atmosféricos (ozono, fluoruros, metales pesados, etc.) lo que ocasiona su casi completa desaparición de núcleos urbanos e industriales (Casas Sicart & Sáiz Jiménez, 1982).

#### E.2. *Plantas superiores*

Otra causa de biodeterioro de los monumentos pétreos son las plantas superiores. La presencia de estos organismos sobre cualquier tipo de estructura supone un peligro para su conservación debido a la acción mecánica que ejercen sobre el sustrato.

Se distinguen varios biotipos, que afectan desigualmente al sustrato, y que se establecen en base a la duración del ciclo vital y a la perdurabilidad y situación de las yemas.

- Terófitos. Plantas que cumplen su ciclo vital completo en la estación favorable (anuales). No hay estructuras perdurables excepto las semillas. El grado de desarrollo alcanzado por los terófitos depende de la especie considerada. Suelen ser las más comunes en monumentos.
- Hemicriptófitos. Plantas en las que la parte aérea muere cada año, quedando las yemas perdurantes a ras del suelo. No suelen alcanzar tallas tan altas como los terófitos, pero al ser perennes la erosión mecánica puede ser más grave para el sustrato.

- Caméfitos. Plantas leñosas de poco porte, con yemas perdurantes que no se elevan más de 50 cm del suelo.
- Criptófitos. Plantas cuyas partes perdurantes quedan bien protegidas bajo la superficie del sustrato, acomodándose en fisuras, grietas y superficies de escorrentía. Desde el punto de vista de la erosión mecánica son las que pueden provocar un mayor daño.
- Fanerófitos. Plantas leñosas arbóreas. Su grado de desarrollo se ve claramente condicionado por la accesibilidad y la riqueza del sustrato así como por la abundancia de agua. Desde el punto de vista mecánico son las más perjudiciales debido al tamaño y volumen que pueden alcanzar sus raíces, pero lógicamente son las menos abundantes.

Así pues, a grandes rasgos, estos organismos se pueden dividir entre especies estacionales o perennes de crecimiento continuo y especies herbáceas, arbustivas o arbóreas. En ambas, el grado de alteración mecánica aumenta en el mismo orden (Tiano, 1986).

Así pues, el análisis y determinación de la vegetación deben ser considerados como una contribución importante previa e imprescindible en los estudios de tratamientos biocidas para la conservación.

#### F. *Animales*

El daño más frecuentemente observado sobre materiales pétreos expuestos a la intemperie es aquel provocado por las aves, en particular por la avifauna urbana, por ejemplo las palomas. Éstas son un importante agente de deterioro por estar relacionadas con el crecimiento de la flora ornitocoprófila. Sus excrementos contienen ácidos (úrico, fosfórico, nítrico, etc.) que reaccionan con la piedra produciendo un efecto corrosivo y creando además problemas de naturaleza estética e higiénica (Sameño Puerto, 2003).

Cuando se trata de edificios que poseen algunas estructuras de madera se pueden encontrar insectos xilófagos, principalmente escarabajos anóbidos y termitas. Estos insectos viven en climas cálidos, así en Europa existen unas pocas zonas en las cuales estos insectos pueden sobrevivir. En las áreas en las que viven y se reproducen, la madera de los edificios constituye siempre una de sus fuentes de alimento principales.

Entre los mamíferos, los topos y las ratas han adquirido hábitos de vida muy correlacionados a la vida y a los hábitos del hombre. La nocividad de estos animales se hace grave cuando la dimensión de la población, que normalmente en las grandes ciudades es de millones de individuos, hace que algunos de ellos actúen de forma agresiva. Las dos especies de roedores que causan daños a los bienes culturales son el topo doméstico (*Mus musculus*) y la rata común o rata negra (*Rattus rattus*).

En el caso de áreas arqueológicas, son los animales de pastoreo los máximos responsables del deterioro causado en estas obras.

Por otro lado, la mera presencia de animales puede dar lugar a la propagación de otras especies de organismos, cuyas estructuras reproductoras pueden quedar adheridas a ellos y ser transportadas.

Por último, no es necesario mencionar el deterioro que es capaz de causar el hombre en sus propias obras.

En resumen, las superficies pétreas se pueden considerar como un sustrato donde se asientan distintas comunidades, sobre todo cuando no se efectúan trabajos de limpieza y mantenimiento, ni se controla el crecimiento con algún tipo de biocida.

#### **1.4 MECANISMOS Y ASPECTOS MORFOLÓGICOS DEL BIODETERIORO**

El biodeterioro de los materiales se produce mediante mecanismos de diverso tipo: procesos físicos o mecánicos (disgregación o fracturación), procesos químicos (descomposición) y procesos estéticos. Sin embargo, dependiendo de los agentes biodeteriorantes, del tipo de sustrato y de las condiciones ambientales, prevalece uno u otro (Caneva et al., 1994).

Por otro lado, el desarrollo de microorganismos u organismos puede crear condiciones favorables para el crecimiento de otras especies biodeteriorantes o, en otras palabras, dar lugar a una sucesión ecológica con el desarrollo de cenosis más complejas.

Dependiendo de la distinta composición química de los materiales, se pueden encontrar diversos tipos de biodeterioro, por consiguiente la propia naturaleza del sustrato condiciona el desarrollo de algunos organismos biodeteriorantes por encima de otros.

Algunos procesos metabólicos son característicos de todos los organismos vivos (por ejemplo, la producción de CO<sub>2</sub> a través de la respiración); otros, por el contrario, son específicos de algunos organismos especializados y dependen de la posibilidad de utilizar un determinado sustrato como fuente nutricional (por ejemplo, la descomposición debida a reacciones enzimáticas).

Otras características de los materiales, como por ejemplo el pH, el contenido de agua y la presencia de impurezas, condicionan el desarrollo de los organismos (Vaillant Callol & Valentín Rodrigo, 1996). Un cierto pH puede favorecer el crecimiento de una flora acidófila o basófila; la higroscopicidad de un material y, por consiguiente, su contenido en agua, es fuertemente condicionante. La presencia de impurezas de diversa naturaleza sobre un material puede hacer más fácil la instalación de un agente biodeteriorante o aumentar el rango de microorganismos que pueden desarrollarse.

Por otro lado, es necesario recordar que los procesos de degradación físico-químicos facilitan el biodeterioro. Por ejemplo, la piedra deteriorada, con una mayor porosidad, es atacada más fácilmente que el mismo material sin haber sufrido daño (Caneva et al., 1994).

##### **1.4.1 Procesos físicos o mecánicos (disgregación o fracturación)**

Este tipo de biodeterioro posee un origen mecánico. En el caso de materiales pétreos lo que se produce es un deterioro biogeofísico, es decir, se altera la estructura. Este mismo fenómeno se da también en los materiales orgánicos.

Aquí se incluyen aquellos mecanismos que ocasionan una disgregación del sustrato o un incremento de la porosidad debido a la acción mecánica de los organismos (movimiento-animales o crecimiento-vegetales).

La vegetación puede causar un importante deterioro físico en un edificio debido, por un lado, al crecimiento de organismos dentro del sustrato, por otro, a los cambios de volumen que puede experimentar (según las condiciones de hidratación) lo que ocasiona microfracturas y, por último a la retención de agua, que, mediante ciclos de heladicidad o hidratación de sales, produce una disgregación del sustrato (Caneva et al., 1994).

También los microorganismos, especialmente los hongos, así como los insectos, causan daños mecánicos en los soportes que colonizan. Los hongos ocasionan desprendimientos de películas pictóricas, disgregación de fibras y daños estructurales por penetración del micelio en los materiales orgánicos. Los insectos generan galerías y orificios en dichos materiales.

#### **1.4.2 Procesos químicos (descomposición)**

Estos mecanismos tienen origen químico. La acción de los organismos causa un deterioro biogeoquímico, se altera la composición del material.

Aquí se incluyen todos los mecanismos que ocasionan la descomposición o la transformación del sustrato debido a la actividad química de los organismos (corrosión, disolución).

La acción química de los organismos puede ser debida a procesos de asimilación o de excreción (Caneva et al., 1994):

- Biodeterioro químico asimilador: Los organismos usan el material (no pétreo) como fuente nutricional, como fuente de carbono o de energía liberada gracias a la actividad enzimática que poseen.
- Biodeterioro químico de excreción o desasimilador: El material es dañado por la excreción de productos metabólicos intermedios o finales (ej.: ácidos y pigmentos que pueden deteriorar o colorear el sustrato). Algunos organismos especializados usan mecanismos de excreción para poder penetrar activamente en el sustrato, por ejemplo, los organismos endolíticos.

Algunos de los procesos químicos son: acidolisis, complejólisis, alcalinolisis, degradación enzimática y emisión de pigmentos.

#### **1.4.3 Daños estéticos**

El concepto de daños estéticos es muy subjetivo. El término se usa para indicar toda una serie de alteraciones en el aspecto exterior de la obra de arte debidas al crecimiento de poblaciones biológicas.

Los daños estéticos comprenden:

- cambios debidos a alteración cromática,
- desarrollo de pátina biológica,
- impedimento visual del material que constituye la obra de arte.

No obstante, los daños estéticos representan el aspecto menos importante del problema del biodeterioro. Además, este concepto puede variar individualmente en relación a la sensibilidad personal y a la cultura de un pueblo y puede cambiar en un tiempo relativamente breve. Por ejemplo, en el siglo diecinueve el valor estético de la pátina algal y líquénica era no sólo tolerado sino también muy apreciado. Actualmente, por el contrario, se prefiere retirar la pátina biológica, las incrustaciones o la vegetación ruderal no sólo por razones de conservación sino también por tener una mejor visibilidad de la obra (Caneva et al., 1994).

Por otro lado, ha de tenerse en cuenta que una colonización biológica, aunque no sea muy dañina, puede favorecer el ataque de otras especies más agresivas (concepto de sucesión ecológica).

#### 1.4.4 Aspecto morfológico de las alteraciones biológicas

Los organismos vegetales son, obviamente, más fácilmente reconocibles que los microorganismos ya que sus dimensiones nos permiten identificarlos a simple vista (Normal 19/85). La pátina de algas, los musgos, las hepáticas y los líquenes son difíciles de distinguir para aquellas personas que no posean una preparación específica en biología.

Una información sistemática más detallada (a nivel de orden, clase, familia, género y especie) solamente se obtiene mediante análisis específicos. Esto es necesario para aplicar correctamente las medidas preventivas o de control.

El aspecto morfológico de las alteraciones varía según las especies presentes, la naturaleza del sustrato, el clima y el período estacional.

Dependiendo del tipo de organismo, se pueden distinguir dos tipos de deterioro biológico. Por un lado, una alteración cuya morfología y características permite identificar su origen y, por otro, las alteraciones que requieren llevar a cabo ensayos de laboratorio para establecer la naturaleza del verdadero biodeteriígeno (García Murillo, 1995; Martín, 1990).

Las morfologías más frecuente de las alteraciones biológicas de los materiales pétreos, en relación con el tipo de organismo que lo provoca, aparecen en la tabla I.2.

Tabla I.2. Morfologías de biodeterioro.

ORGANISMO	MORFOLOGÍA BIODETERIORO
<b>Bacterias autótrofas</b>	Costra negra, pátina negra, exfoliación, pulverización
<b>Bacterias heterótrofas</b>	Costra negra, pátina negra, exfoliación, cambio de color, manchas
<b>Actinomicetos</b>	Pátina y polvo blanco-grisáceo, eflorescencias blancas
<b>Hongos</b>	Manchas, exfoliación, <i>pitting</i> (punteaduras), pudrición
<b>Cianobacterias y algas</b>	Pátinas y películas de varios colores y consistencias
<b>Líquenes</b>	Incrustaciones, manchas, <i>pitting</i>
<b>Musgos y hepáticas</b>	Talos verde-grisáceos
<b>Plantas superiores</b>	Hierba, arbustos y especies leñosas inducen fracturas, colapso, desprendimientos de material
<b>Insectos</b>	Agujeros de forma típica
<b>Aves</b>	Deposición de excrementos con efecto corrosivo, agujeros

Sin embargo, la forma más clara y precisa para una clasificación de estos indicadores es la propuesta por A. Martín (Martín, 1990), en la cual clasifica las distintas morfologías o manifestaciones de biodeterioro que se observan frecuentemente en los materiales pétreos.

Clasificación de los indicadores de bioalteración:

Modificaciones superficiales. Son manifestaciones de alteración que afectan al aspecto más externo de la piedra, sin provocar modificaciones importantes en el material subyacente. Los

organismos que ocasionan estas morfologías son bacterias, hongos y algas, principalmente. Se pueden clasificar en:

- a) Variaciones cromáticas:
  - Alteraciones cromáticas
  - Moteado
  - Pátina
- b) Costra
- c) Depósitos Incrustación:
  - Depósitos superficiales
  - Eflorescencias

Eliminación o pérdida de material. Esta se manifiesta con la formación de pequeñas cavidades o pérdida de cohesión, causadas por bacterias, algas, líquenes, hongos, plantas vasculares e incluso insectos. Se dividen en:

- a) Alveolización
- b) Picado
- c) Formación de surcos
- d) Descohesión

Rupturas Son discontinuidades producidas de una forma más o menos perpendicular a la superficie de la piedra. Principalmente causadas por plantas superiores, aunque los líquenes también pueden provocar la fracturación del sustrato.

Disyunciones. Estas suponen la separación entre partes de la piedra, paralelamente a la superficie de la misma, produciendo fragmentos de menor o mayor tamaño (García Murillo, 1995; Martín, 1990; Alcalde Moreno & Martín Pérez, 1996). La separación seguida del desprendimiento, dependiendo del tamaño y la forma de la porción desprendida, se denomina: separación de placas, exfoliación descamación y separación de películas. Las responsables son principalmente las sulfobacterias.

Otros autores (Caneva et al., 2005) amplían la clasificación del aspecto morfológico que presenta el biodeterioro a otros materiales orgánicos e inorgánicos del Patrimonio (tabla I.3).

Tabla I.3. Fenomenología de las alteraciones biológicas.

	MADERA	PAPEL	TEJIDO	PIEL	MATERIALES PÉTREOS	VIDRIO	METAL
<b>Bacterias autótrofas</b>	Nd	Nd	Nd	Nd	Costras negras, pátinas negras, exfoliación, pulverización	<i>Pitting</i> , oscurecimiento manchas negras, ennegrecimiento de materiales sumergidos	Corrosión
<b>Bacterias heterótrofas</b>	Variación de características mecánicas	Manchas, variación de las caract. mecánicas (afelpado y frágil)	Manchas, cambios de color, pérdidas de resistencia	Manchas, pérdidas de resistencia a la tensión, reblandecimiento	Costras negras, pátinas negras, exfoliación, cambios de color, manchas	<i>Pitting</i> , oscurecimiento manchas negras, ennegrecimiento de materiales sumergidos	Corrosión
<b>Actinomicetos</b>	Variación de características mecánicas	Manchas, variación de las caract. mecánicas (afelpado y frágil)	Manchas, cambios de color, pérdidas de resistencia	Manchas, pintas blancas, pérdida de resistencia a la tensión	Pátinas y polvo blanco-grisáceo, eflorescencias blancas	Nd	Nd
<b>Hongos</b>	Manchas, cambios de color, reblandecimientos, fisuras, cambio caract. mecánicas	Manchas, variación de las caract. mecánicas (afelpado y frágil)	Manchas, cambios de color, pérdida de resistencia	Manchas, pérdidas de resistencia a la tensión, rigidez	Manchas, exfoliación, <i>pitting</i>	Oscurecimiento, manchas negras	Nd
<b>Cianobacterias y algas</b>	Pátinas de distintos colores (sobre todo verdes)	Nd	Pátinas	Nd	Pátinas y películas de distinto color y consistencia	Nd	Nd
<b>Líquenes</b>	Incrustaciones, parches	Nd	Nd	Nd	Incrustaciones, parches, <i>pitting</i>	<i>Pitting</i> , oscurecimiento	Nd
<b>Briófitos</b>	Talos verdes-grises	Nd	Nd	Nd	Talos verdes-grises	Nd	Nd
<b>Plantas superiores</b>	Nd	Nd	Nd	Nd	Hierbas, arbustos y especies leñosas provocan fracturas, colapsos y desprendimientos de material	Nd	Nd
<b>Animales insectos</b>	Galerías, orificios, serrín	Abrasión superficial, erosión, orificios, galerías	Erosión, orificios, pérdida de material	Orificios de forma típica			
<b>Perforadores marinos, caracoles</b>	Erosiones profundas, galerías						
<b>Pájaros</b>					Deposición de excrementos con efectos corrosivos, orificios, rayados		Nd

Nd = No descrita (porque los microorganismos y organismos desempeñan un papel secundario en el deterioro de las obras de arte o se encuentran muy raramente en estos materiales en las condiciones normales de conservación).



## 1.5 LOS PROCESOS DE BIODETERIORO EN FUNCIÓN DE LOS MATERIALES DE LOS BIENES CULTURALES.

Los bienes culturales constituidos por materiales de naturaleza orgánica pueden ser alterados por organismos heterótrofos si las condiciones ambientales resultan favorables para su crecimiento. La susceptibilidad al biodeterioro de estos materiales también está ligada a su composición química. Se pueden dividir en materiales de origen vegetal (papel, madera, algodón, lino, cáñamo) y materiales de origen animal (cuero, pergamino, seda, lana), que presentan composiciones químicas muy diferentes (Caneva et al., 1994). En este trabajo sólo se describen los procesos de biodeterioro que tienen lugar en aquellos materiales que es posible encontrar en inmuebles.

Los sustratos inorgánicos, como los materiales pétreos, son colonizados por organismos autótrofos, sin embargo, algunos de estos materiales pueden poseer sustancias orgánicas que favorecen el desarrollo de una microflora heterótrofa. Los materiales pétreos artificiales, es decir, aquellos producidos por el hombre (estucos, morteros, materiales cerámicos, pinturas murales), son alterados por los mismos organismos que crecen en la piedra natural. Sin embargo, las diferentes características físicas que presentan estos materiales, como la porosidad, las diferencias de composición química, como la presencia de pigmentos y aglutinantes, pueden influir en su susceptibilidad al biodeterioro.

### 1.5.1 Materiales orgánicos de origen vegetal

- **Características generales: composición química y susceptibilidad al biodeterioro**

La celulosa, la lignina y la hemicelulosa son los principales compuestos de los materiales vegetales. La celulosa es el polímero más importante de la pared de las células vegetales, aunque su porcentaje varía según la especie vegetal y el tejido de que se trate (la parte de la planta utilizada en la elaboración de materiales).

Desde el punto de vista químico, la celulosa es un polisacárido lineal formado por carbono, hidrógeno y oxígeno, constituido por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos. Las cadenas de celulosa se disponen paralelamente en fibras llamadas microfibrillas. En algunas zonas, estas cadenas celulósicas están dispuestas en un retículo cristalino con una estructura definida (áreas cristalinas). En otras partes, las cadenas están dispuestas de forma desordenada y menos compacta (áreas amorfas). Las zonas cristalinas son muy resistentes a la hidrólisis enzimática, mientras que las zonas amorfas son más susceptibles a la degradación por parte de microorganismos celulosolíticos capaces de producir un sistema de enzimas extra e intracelulares llamado complejo de celulasas.

La lignina es un polímero tridimensional muy complejo compuesto por alcoholes aromáticos. Posee una estructura amorfa y es insoluble en agua. La lignina es especialmente resistente a la degradación causada por microorganismos, solo algunos hongos (Basidiomicetos, algunos Ascomicetos y Deuteromicetos), bacterias aeróbicas (entre ellas los Actinomicetos) y algunas bacterias y hongos anaeróbicos son capaces de descomponerla (Durrant, 1996).

Las hemicelulosas están localizadas entre las fibras de celulosa y la lignina. Son heteropolímeros, lineales o ramificados, solubles en álcalis. Son hidrolizadas por la mayor parte de bacterias y hongos mediante la producción de enzimas extracelulares llamadas hemicelulasas.

- **Madera: Estructura y composición**

Desde un punto de vista histológico, la madera está formada por un sistema de tejidos con función de conducción o vascular (vasos o traqueidas), de sostén o mecánica (fibras y fibrotraqueidas) y células vivas con función de reserva (radios medulares, parénquima axial) o secretora (canales resiníferos o gomíferos).

La madera o xilema se produce por la actividad y la proliferación de un tejido indiferenciado llamado *cambium* que por su cara externa produce floema (corteza interna) y por su parte interna el xilema o madera. La parte externa del xilema se llama albura y es fisiológicamente activa, mientras que la parte interna se llama duramen y está fisiológicamente muerta. Con el paso del tiempo, en el interior de estas células más viejas, se depositan ciertas sustancias, como los taninos, que proporcionan a la madera una mayor resistencia mecánica y durabilidad. La durabilidad indica la capacidad que tiene una madera de resistir el ataque de los agentes biodeteriorantes.

El *cambium* es el responsable del crecimiento radial de la planta (crecimiento secundario), produciendo cada año un nuevo estrato de madera llamado anillo de crecimiento. Las características de estos estratos o anillos de crecimiento (color, espesor y densidad) varían en función del período de crecimiento (primavera u otoño), de la especie y de la edad de la planta, así como de la composición del suelo y de las condiciones climáticas (Caneva et al., 1994). A través del estudio de la evolución de los anillos de crecimiento se pueden datar los materiales lignarios (dendrocronología).

Existen dos tipos de madera, dependiendo de la planta leñosa de la que se extraiga. La madera de gimnospermas (coníferas), por ejemplo las pertenecientes a las familias *Cupressaceae*, *Pinaceae* y *Taxodiaceae*; y la madera de angiospermas (latifolias), con muchas especies de porte arbóreo como las de las familias *Fagaceae*, *Juglandaceae*, *Populaceae*, *Tiliaceae*, etc. A nivel anatómico, las diferentes células que forman la madera pueden dar lugar a una estructura más o menos homogénea (madera homóxila de las gimnospermas o *softwood*) o heterogénea (madera heteróxila de las angiospermas o *hardwood*).

- **Mecanismos de acción de los distintos organismos sobre la madera**

#### A. Bacterias

Las bacterias participan en menor medida que los hongos en el deterioro de la madera, ya que para su desarrollo necesitan materiales con alto contenido de agua. Por este motivo sí pueden tener importancia en la degradación de maderas subterráneas o sumergidas. Las bacterias atacan la celulosa de la madera transformándola, por medio de enzimas, sucesivamente en celobiosa, dióxido de carbono y ácidos grasos.

Entre ellas, los actinomicetos, son organismos unicelulares filamentosos que destruyen la celulosa. Aparecen en zonas donde existe una contaminación con la tierra (Caneva et al., 1994).

#### B. Hongos

Los hongos causan un daño químico a los soportes en los que se desarrollan debido a las sustancias que excretan, así como una acidificación del material. Por otro lado, también pueden ocasionar un daño mecánico por la penetración de las hifas en el sustrato, lo cual produce una disgregación del material. Por último, debido a la emisión de pigmentos, estos microorganismos pueden provocar también un deterioro estético de la obra.

Así pues, la madera, al ser un material higroscópico, es alterada principalmente por los hongos. Éstos son capaces de desarrollarse tanto en la superficie de la misma (los mohos), como en el interior de sus estructuras (pudrición).

En el caso de las pudriciones, el aspecto y el color de la madera varían como consecuencia de una acción preferencial sobre sus distintos componentes. Se pueden distinguir tres tipos:

**Pudrición blanca.** La madera atacada por esta pudrición se vuelve blanca. Los hongos responsables de esta alteración son capaces de destruir tanto la celulosa y hemicelulosa como la lignina, dejando la madera blanquecina, ligera y, en ocasiones con aspecto fibroso e incluso harinoso, con poca densidad.

**Pudrición parda.** Es aquella en la que el hongo se alimenta de celulosa e hidratos de carbono, pero no de lignina (color pardo). La madera adquiere, por tanto, una coloración oscura debido a los residuos pardos de lignina. Por otro lado, la madera, al secarse se disgrega en forma de cubos, por lo que también recibe el nombre de pudrición cubica. Estos cubos se disgregan fácilmente en polvo, es un ataque muy destructivo.

**Pudrición blanda.** Es producida por hongos inferiores que atacan la celulosa de la pared secundaria de la célula en el sentido longitudinal de la misma, dando a la madera, cuando el grado de humedad es elevado, una consistencia blanda.

### C. Insectos

En el caso de la madera, son los insectos xilófagos los que ocasionan los daños más graves en los soportes que infestan.

Cuatro son las funciones principales en que se ocupan los insectos a lo largo de su ciclo vital: alimentación, refugio, reproducción y dispersión (Southwood, 1978; Gullan, 1994). Es al satisfacer alguna de ellas cuando pueden producir los tipos fundamentales de daño. Sin duda, las actividades relacionadas con la alimentación son las principales causantes de biodeterioro, que puede ser producido mecánicamente, al arrancar el animal con las mandíbulas parte del material atacado; o químicamente, por efecto de sustancias presentes tanto en la saliva y otras secreciones bucales, como en los excrementos. La búsqueda de refugio tiene un papel algo menor en el biodeterioro y, junto a la actividad reproductora, produce alteraciones de naturaleza fundamentalmente mecánica, por ejemplo, al horadar cavidades o remodelar materiales donde protegerse, o al construir "nidos" donde llevar a cabo la cópula o la puesta.

Los materiales de origen vegetal, como la madera (vigas, marcos, mobiliario, techos, suelos y tallas) son atacados básicamente por escarabajos (Orden *Coleoptera*), de entre los cuales el "gusano de la madera" o "carcoma común de los muebles" *Anobium punctatum* (*Anobiidae*) es con gran diferencia el "insecto estrella" (Bletchly, 1967). Existen otras especies de coleópteros que, bajo las condiciones ambientales que se dan en Andalucía, pueden causar desperfectos notables, en especial *Lyctus brunneus*, *L. linearis* (*Lyctidae*) e *Hylotrupes bajulus* (*Cerambycidae*). Sin embargo, es *A. punctatum* el que ocasiona la mayor parte de los daños al excavar sus larvas galerías en la madera, pudiendo reducir techumbres, muebles y suelos enteros a serrín en relativamente poco tiempo (Chinery, 1977; Bletchly, 1967; Bernis Mateu, 1974). Entre los restos de serrín se observan sus excrementos que tienen una forma característica. La mayoría de los restantes insectos de interés en el deterioro de maderas sólo tiene importancia puntual; entre ellos se pueden citar las termitas (*Isoptera*), que construyen sus nidos en la madera vieja, pudiendo llegar en algunos casos a producir un daño irreversible en vigas de madera; ciertas cucarachas (*Dictyoptera*), cuyos daños suelen ser superficiales y debidos al efecto de la

masticación de madera humedecida; y algunas avispas (*Hymenoptera*), que arrancan trozos de madera para hacer una pasta junto a su saliva con la cual fabricar el papel de sus nidos, pero cuyos daños hay que catalogar también de escasos.

### 1.5.2 Materiales orgánicos de origen animal

- **Características generales: composición química y susceptibilidad al biodeterioro**

Los componentes químicos de los materiales de origen animal que se recogen en este estudio (cuero, pergamino), son las proteínas o prótidos. Las proteínas son moléculas complejas compuestas fundamentalmente por cuatro elementos: carbono, hidrogeno, oxígeno y nitrógeno (a veces contienen también azufre, hierro, magnesio, etc.). Son largos polímeros no ramificados de alto peso molecular cuya unidad base son los aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Las secuencias de aminoácidos dan origen a cadenas más o menos largas denominadas péptidos.

La sucesión de aminoácidos constituye la *estructura primaria*. La *estructura secundaria* se refiere al modo en que la cadena polipeptídica está enrollada o extendida, por ejemplo, la estructura helicoidal de la  $\alpha$ -queratina del pelo. La *estructura terciaria* representa la forma tridimensional típica de las proteínas globulares y, finalmente, la *estructura cuaternaria* hace referencia a las relaciones entre múltiples cadenas polipeptídicas de una proteína. Todas ellas poseen diferente funciones dependiendo de su estructura: proteínas estructurales con función de sostén, proteínas funcionales, etc.

Las proteínas constituyen un sustrato nutricional (fuente de nitrógeno o carbono) para múltiples organismos heterótrofos. Sin embargo, el biodeterioro de los materiales proteicos está condicionado a la actividad de algunos microorganismos con capacidad de metabolizar las proteínas mediante enzimas proteolíticos extracelulares que pueden romper los enlaces peptídicos por hidrólisis enzimática. Los microorganismos que poseen capacidad proteolítica son las bacterias, entre ellas los actinomicetos y algunos hongos, Ascomicetos y Deuteromicetos (*Aspergillus flavus*, *A. niger*, algunas especies de *Penicillium*).

En el caso de la piel (cuero y pergamino) la susceptibilidad al biodeterioro depende de numerosos factores como son la procedencia, los procesos de fabricación, las sustancias utilizadas en la elaboración, la presencia de decoraciones pictóricas, pero sobre todo del estado de conservación y de las características del ambiente en que se encuentra la obra.

- **Cuero y pergamino: Estructura y composición**

En el ámbito de las artes decorativas, las pieles se emplearon en diversas épocas para distintas aplicaciones (Caneva et al., 2005).

El cuero y el pergamino son materiales derivados de las pieles de oveja y cabra, preferentemente; aunque también se pueden utilizar embriones de cordero o ternero, en el caso del pergamino o pieles de bovinos, en el caso del cuero. El proceso de elaboración de las pieles varía notablemente en relación a la época de manufactura y el área geográfica de procedencia. Las principales fases de la producción son: maceración, raspado, tensado, secado y pulido. Para el cuero, el tratamiento fundamental es el curtido que consiste en una serie de procesos químicos y mecánicos cuya finalidad es que la piel se transforme en cuero imputrescible e impermeable. El curtido se lleva a cabo utilizando distintas técnicas: ahumado de la piel o su tratamiento con sustancias vegetales o minerales, de estas últimas la más

empleada es el cromo. Todo ello con objeto de evitar fenómenos de la putrefacción debida al ataque microbiológico.

Los principales componentes químicos del cuero y del pergamino son el colágeno, la queratina, la elastina y en menor cantidad albúmina, globulinas y sustancias lipídicas. El colágeno es una proteína estructural fibrosa cuyas moléculas poseen una estructura casi cristalina. Las propiedades mecánicas del cuero y el pergamino son debidas a esta organización tridimensional de las fibras proteicas. La queratina, es una proteína estructural rica en azufre y la elastina, químicamente similar al colágeno, es una proteína componente fundamental del tejido conectivo elástico. Así pues, cualquier alteración de estas estructuras puede ocasionar cambios en las propiedades mecánicas de este material.

- **Mecanismos de acción de los distintos organismos**

#### A. Bacterias

El colágeno puede ser hidrolizado por enzimas proteolíticas específicas (colagenasas) producidas por algunas bacterias anaerobias del género *Clostridium*. Algunos tratamientos durante la manufactura de la piel para convertirla en pergamino, despolimerizan el colágeno pudiendo ser éste, entonces, descompuesto por enzimas proteolíticas no específicas producidas por muchas bacterias en aerobiosis como las pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Sarcina*.

Estudios posteriores han puesto en evidencia que la producción de colagenasas también es propia de estas especies de bacterias aeróbicas, pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Bacteroides*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Cytophaga*, así como de diversas especies de actinomicetos del género *Streptomyces* (Karbowska-Berent & Strzelczyk, 2000).

Algunos factores ambientales, como la temperatura, humedad, valores de pH y radiación UV, influyen en la estabilidad del colágeno provocando cambios en su estructura molecular y ocasionando, por tanto, una disminución de su resistencia al biodeterioro.

#### B. Hongos

Algunos hongos de los géneros *Cladosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, etc. pueden atacar los pergaminos antiguos. Tras un ataque fúngico el pergamino pierde sus propiedades volviéndose duro y frágil e incluso deformándose. Pueden aparecer manchas de distintos colores, pátinas blanquecinas y disoluciones de textos escritos.

#### C. Insectos

En el caso de los materiales de origen animal, como el cuero, pergamino, pelo, piel o plumas, el principal enemigo son los escarabajos derméstidos, cuya presencia se manifiesta como erosiones superficiales o profundas, orificios y pérdidas de fragmentos, sin embargo también pueden llegar a hacer desaparecer el material original y dejarlo reducido a un fino polvo ocráceo (compuesto por sus excrementos). En ocasiones, algunos insectos que, generalmente, atacan materiales celulósicos pueden ocasionar también daños a los materiales proteicos.

### 1.5.3 Materiales pictóricos

- **Características generales: composición química y susceptibilidad al biodeterioro**

Generalmente, un bien cultural no está constituido por un único material, lo habitual es que coexistan materiales tanto orgánicos como inorgánicos. Es muy difícil definir el grado de

susceptibilidad de cada material al deterioro biológico, pero se puede decir que el riesgo de biodeterioro depende de aquél más vulnerable.

Una pintura, está constituida, generalmente, por un soporte, una capa preparatoria y una película pictórica cuya composición varía en función de la técnica pictórica empleada (óleo, témpera, acuarela, etc.), la época de elaboración de la obra o el autor. La película pictórica, a su vez, se compone de uno o más estratos de color que consisten en pigmentos mezclados con aglutinantes, distintos según la técnica empleada. Finalmente, la superficie pintada se cubre con una fina capa de barniz.

El biodeterioro de las obras pintadas puede afectar solo a unos componentes o a la obra en su totalidad, pero solamente se produce cuando las condiciones ambientales son favorables, es decir, cuando la temperatura y la humedad propician el desarrollo de los organismos.

Los compuestos orgánicos presentes en estos materiales representan una fuente de nutrición para un amplio rango de organismos heterótrofos. El soporte se ve afectado, en función de sus materiales, por las mismas especies microbianas mencionadas anteriormente. Sin embargo, la película pictórica está menos expuesta al biodeterioro por microorganismos ya que sus distintos componentes (aglutinantes y pigmentos) se ven afectados de manera particular.

Los aglutinantes pictóricos más susceptibles al biodeterioro son las témperas a la caseína o al huevo, las emulsiones de témpera y los aceites de linaza. También son especialmente susceptibles los pigmentos a base de tierra de siena, tierra de sombra y bol arménico (utilizado en preparaciones para los dorados). Sin embargo, la presencia de metales pesados, como el blanco de plomo o el óxido de zinc, aumenta la resistencia al ataque microbiológico por su toxicidad. Por otro lado, el barniz de acabado protege a la película pictórica frente al biodeterioro debido a sus propiedades hidrorrepelentes (Caneva et al. 2000).

- **Mecanismos de acción de los distintos organismos**

#### A. Hongos

Entre los hongos implicados en la degradación de las pinturas, en algunos estudios se han aislado especies de los géneros: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* y la especie *Phoma pigmentovora*, capaz de degradar los pigmentos al óleo y a la témpera, mientras que *Aerobasidium* descompone sólo los aglutinantes de los pigmentos al óleo. *Mucor* y *Rhizopus* atacan las colas (Ionita, 1971; Strzelczyk, 1981).

Estos microorganismos causan daños tanto mecánicos como químicos en las superficies pintadas. En su fase inicial de desarrollo, el micelio se extiende sobre la pintura, enmascarando el dibujo y los colores, en forma de veladuras blanquecinas. En algunos casos, si el desarrollo es más avanzado, con producción de abundante micelio y de cuerpos fructíferos, se observan grandes manchas coloreadas.

La penetración de las hifas en el interior del soporte causa daños mecánicos: fisuras y desprendimiento de la película pictórica. Los productos de su metabolismo, como los ácidos orgánicos, provocan transformaciones químicas en los materiales que forman parte de la obra. La producción y la actividad de las exoenzimas, causan daños químicos provocando la descomposición de los constituyentes de la pintura o del soporte. La emisión por parte de los hongos de pigmentos, normalmente muy coloreados, causan manchas indelebles en todos los materiales.

## B. Insectos

El ataque por parte de insectos a los materiales pictóricos está, normalmente, ligado a los soportes (madera, tejidos, cuero), pero se pueden observar los daños indirectos ocasionados por los orificios de salida en la pintura. Las especies implicadas son las mismas, por tanto, que se han mencionado para otros materiales orgánicos.

### 1.5.4 Materiales inorgánicos: materiales pétreos

- **Características generales: composición química y susceptibilidad al biodeterioro**

Los sustratos inorgánicos, concretamente los materiales pétreos o geomateriales son principalmente piedras, así como estucos, morteros, yesos y productos cerámicos (ladrillos y azulejos). Todos estos materiales, tanto naturales (rocas) como artificiales (obtenidos por transformación de las rocas con diversos métodos), presentan analogías composicionales y estructurales (Caneva et al., 2005).

Las rocas son agregaciones de uno o más minerales que pueden clasificarse, según su génesis, en rocas ígneas o magmáticas, sedimentarias y metamórficas.

Cada roca se caracteriza por poseer una composición mineralógica, una estructura petrográfica y una composición química. Las características físicas de las rocas que se pueden observar al microscopio son la estructura y la textura. La porosidad de una piedra está constituida por los poros abiertos, que se comunican con el exterior, y por los poros cerrados. Además del valor total de la porosidad, es importante conocer la forma y las dimensiones de los poros ya que influyen en los procesos de absorción de agua y en los mecanismos de alteración, por ejemplo, por cristalización de sales, hielo-deshielo, biodeterioro (Caneva et al., 2005).

Su susceptibilidad al biodeterioro está condicionada por su naturaleza química, su estructura física y origen geológico y los factores ambientales a los que están sometidos estos materiales. Así pues, resulta de suma importancia la cantidad de minerales deteriorables que presenten (feldespatos, minerales arcillosos y ferruginosos), la porosidad y la rugosidad superficial.

Son colonizados predominantemente por organismos autótrofos. Sin embargo, en estos sustratos es muy común la presencia de materia orgánica: restos de colonizaciones biológicas, contaminación atmosférica, pólenes, tratamientos de restauración (ceras, aceites, consolidantes, etc.), excrementos de aves. Todo ello favorece el desarrollo de una microflora heterótrofa (Caneva et al. 2000).

Con respecto a los materiales pétreos producidos por el hombre (estucos, morteros, frescos y productos cerámicos), estos son alterados por los mismos organismos que los de la piedra natural. Su composición química generalmente está enriquecida con aglutinantes y pigmentos, los cuales influyen en su susceptibilidad al biodeterioro.

- **Mecanismos de acción de los distintos organismos**

#### A. *Cianobacterias y algas verdes*

El crecimiento de las algas está promovido por un alto grado de humedad en el sustrato que colonizan y forman una pátina superficial que, a su vez, puede mantener la humedad del material favoreciendo su disolución por agua.



Así, el deterioro causado por algas, o ficodeterioro, puede ser en un primer momento de tipo estético. En este caso las intensas coloraciones y los cambios texturales que producen las algas dan lugar a alteraciones de distinta naturaleza y repercusión (Bolívar & Sánchez-Castillo, 1998):

Por un lado se observa un deterioro funcional (*soiling*), por absorción de polvo atmosférico, material particulado, etc. y, por otro lado, una interferencia en la lectura de la obra. Esto último pasa a ser considerado un problema cuando el estado de alteración del sustrato y la contaminación del agua favorecen una proliferación excesiva de estos organismos y una rápida deposición de costras carbonatadas.

Otras alteraciones consideradas también de tipo estético son la formación de pátinas de diversa gama cromática, según la época del año, y la formación de concreciones/acreciones, comprobándose experimentalmente (Bolívar & Sánchez-Castillo, 1997) que muchas especies algales condicionan la estructura de las deposiciones minerales.

Por otro lado, existen estudios, en diversos monumentos (Ortega-Calvo et al., 1992, Bolívar & Sánchez-Castillo, 1997, Bolívar & Sánchez-Castillo, 1998, 49, 50), sobre ciertas especies que presentan una vaina con gran capacidad para retener agua. Estos organismos, mediante contracciones y dilataciones, pueden provocar alteraciones físicas en el sustrato (Jaton, 1986).

Así, con respecto a las alteraciones de tipo físico, además de la mencionada anteriormente, se ha comprobado que las algas pueden actuar mecánicamente sobre el material que colonizan favoreciendo la gelifracción (Bolívar & Sánchez-Castillo, 1998). Esto sucede en aquellos lugares donde se produzcan heladas en invierno.

En cuanto a la acción química de las algas sobre los monumentos, éstas además pueden ejercer una acción de corrosión, así como una acción perforante (por ejemplo, las algas endolíticas).

Así, el deterioro químico se produce como consecuencia de las reacciones bioquímicas y fisiológicas de las algas (Bolívar & Sánchez-Castillo, 1998). Excretan ácidos orgánicos (pirúvico, glicólico, láctico, acético, etc.) como consecuencia de los procesos de respiración y con finalidad penetrante en las especies endolíticas. Por otro lado excretan polisacáridos de acción quelante y provocan la precipitación y agregación de partículas de carbonato cálcico mediante la variación del pH causada por el metabolismo fotosintético y el incremento de la concentración de dióxido de carbono.

Así pues, la pátina algal, además de causar un daño estético, favorece la deposición y adhesión de polvo, semillas, esporas, etc., y por consiguiente el crecimiento de otros organismos (Ortega-Calvo et al., 1992; Bolívar & Sánchez-Castillo, 1998). Además, las variaciones en la tasa de gas carbónico ligada a su respiración y a su fotosíntesis traen consigo modificaciones de las capas superficiales de carbonato cálcico del material pétreo (Jaton, 1986).

## B. Líquenes

Los líquenes ejercen un daño estético y físico sobre el sustrato, pero aún más importante es el producido químicamente (Sáiz Jiménez, 1981; Seaward & Giacobini, 1988; García-Rowe & Sáiz-Jiménez, 1991; Sameño Puerto & García Rowe, 1995; García & Martín, 1996; Griffin et al., 1991).

Un elevado desarrollo de colonias liquénicas, que puede dar lugar a un depósito de material así como a la producción de pigmentos, supone que se den mecanismos estéticos de biodeterioro.

La descomposición mecánica del sustrato se produce porque los líquenes incrementan su masa conforme crecen y, por otro lado, cambian de volumen según el período sea húmedo o seco. Por



tanto, el deterioro se produce por la penetración de las ricinas en el sustrato y la acción física ejercida por la alternancia de expansión en estado hidratado y contracción en estado seco de la gelatina himenal.

Además, la presencia de los líquenes favorece la condensación de agua y su retención sobre la superficie pétreo.

Con respecto a la acción química que los líquenes ejercen sobre el sustrato, éstos pueden provocar una desestabilización química del mismo debido a los productos de su metabolismo. Los líquenes excretan ácidos orgánicos, entre ellos el ácido oxálico, el cual es responsable de la quelación de la superficie, lo que explica su acción degradativa.

Sin embargo, aunque existen muchos estudios que ponen de manifiesto el deterioro causado por estos organismos, éste continúa siendo discutido debido a la doble acción que ejercen los líquenes sobre estos materiales: por un lado como organismos deteriorantes y, por otro lado, como agentes protectores del sustrato frente a factores ambientales (Barquín Sainz de la Maza & Terrón Alfonso, 1997).

Los líquenes pueden, por tanto, ejercer un efecto protector contra agentes degradativos. Causan modificaciones morfológicas y físicas sobre la superficie de la piedra, formando un revestimiento cuyo espesor es del orden de milímetros. Así, al erradicar los líquenes de la piedra, ésta puede ser atacada mucho más drásticamente.

### C. Bacterias

Los mecanismos bacterianos de ataque a superficies pétreas son de dos tipos: en primer lugar, una fase reversible inicial que incluye atracciones electrostáticas y fuerzas de Van der Waals y, en segundo lugar, una fase irreversible dependiendo del tiempo y la velocidad de crecimiento (Kormondy, 1973).

Al estudiar las causas de alteración de la piedra, se observa la presencia de sales solubles, principalmente sulfatos y nitratos. Esto puede ser causado por reacciones químicas producidas entre agentes químicos del aire y el material pétreo, o por reacciones enzimáticas de microorganismos específicos. Por tanto, ha sido necesario establecer el papel que juegan en este proceso las bacterias del ciclo del azufre y del nitrógeno (Barcellona-Vero et al., 1976).

Las bacterias del ciclo del azufre participan en el fenómeno de alteración de la piedra mediante oxidaciones enzimáticas de sustancias sulfuradas y la producción de ácido sulfúrico y/o sulfatos. Las bacterias nitrificantes atacan la piedra utilizándola como fuente de carbono y produciendo ácidos nítrico y nitroso a partir de amoníaco. El proceso de nitrificación comprende dos oxidaciones biológicas, la oxidación del amoníaco a ácido nitroso (bacterias nitrificantes) y la del ácido nitroso a nítrico (bacterias nitrosantes). Así pues, son los sulfatos y los nitratos los productos de alteración (Caneva et al., 1994).

La actividad biodeteriorante de las bacterias heterótrofas viene determinada por la producción de agentes complejantes, ácidos orgánicos e inorgánicos y álcalis (García Murillo, 1995; Caneva et al., 1994). Además, estas bacterias producen pigmentos que se extienden, desde las zonas profundas, donde crecen, hasta la superficie, dando lugar a alteraciones cromáticas antiestéticas (García Murillo, 1995).

Los actinomicetos, de los cuales los más frecuentes pertenecen al subgrupo de los Estreptomicetos, género *Streptomyces*, son microorganismos capaces de utilizar nitritos y nitratos y de reducir sulfatos. Además, atacan las piedras calizas y los minerales silíceos con sus

productos metabólicos ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , y otros ácidos orgánicos más débiles) (García Murillo, 1995; Caneva et al., 1994).

#### D. Hongos

Los mecanismos de bioalteración de materiales pétreos debidos a los hongos se manifiestan principalmente en dos aspectos: químico y mecánico. Sin embargo, no puede olvidarse que estos microorganismos provocan también un deterioro estético debido a la formación de manchas causadas por la excreción de pigmentos, lo que ocasiona alteraciones cromáticas en la superficie pétreo que colonizan, por ejemplo la aparición de manchas superficiales en el caso de hongos creciendo sobre frescos (Saiz Jiménez & Samson, 1981).

Con respecto al deterioro mecánico, la penetración del micelio fúngico puede ser profunda, por ejemplo en el revoco de la pintura mural (Saiz Jiménez & Samson, 1981), y causar pérdida de cohesión del estrato pictórico. En las rocas carbonatadas (piedra dolomítica y calcárea), las hifas penetran entre los cristales de calcita. Algunos hongos son endolíticos y producen fenómenos de *pitting*. Por otro lado, al igual que los líquenes, provocan disgregaciones en el sustrato por cambios de volumen, retención de agua y el propio crecimiento (Saiz Jiménez, 1981; Seaward & Giacobini, 1988).

La acción química de los hongos parece ser el aspecto más importante de la degradación y ésta se puede comprobar en ensayos de laboratorio: Existe una estrecha relación entre la solubilidad del sustrato y la disminución del pH, debido a la producción de ácido. Los hongos producen muchos ácidos orgánicos (cítrico, oxálico, glucónico, glucurónico, láctico, fumárico) que forman complejos de quelación con los cationes metálicos del sustrato, disolviendo los carbonatos, los silicatos (mica y ortoclasa), los minerales que contienen hierro y magnesio (biotita, olivino, piroxeno) y diversos fosfatos.

Además, las hifas del hongo penetran en los cristales de calcita y sus secreciones químicas producen surcos en la dolomita y la calcita, creando microhábitats para bacterias y algas, también para plantas superiores (Caneva et al., 1994).

#### E. Plantas Inferiores (Briofitos) y Superiores

Los briofitos deterioran los materiales pétreos mediante mecanismos físicos y químicos. Los rizoides de los musgos penetran dentro de las piedras siguiendo los espacios vacíos o poros y, a veces, rompiendo las paredes entre éstos. La acción química que ejercen es similar a los mecanismos que emplean las plantas superiores. Son capaces de extraer cationes debido a la acidez de sus raíces.

Sin embargo, el mayor peligro que representan los briofitos es que su presencia supone un enriquecimiento en materia orgánica e inorgánica que favorece el desarrollo de plantas vasculares, mucho más destructivas (García Murillo, 1995; Casas Sicart & Sáiz Jiménez, 1982; Gil & Sáiz-Jiménez, 1992).

Por ello, es importante erradicar a los briofitos en estado temprano de crecimiento, ya que si maduran producen esporofitos para su proliferación.

Las plantas ruderales causan daños de diversa entidad dependiendo de su ciclo vital, de su forma biológica y de la extensión y lignificación de las raíces (García Rowe & Sáiz Jiménez, 1991). Suponen, en primer lugar, un deterioro estético del sustrato, aunque no deben olvidarse los aspectos mecánico y químico.

La presión ejercida por las raíces, seguida del crecimiento y el engrosamiento radial, puede causar serios daños en el sustrato (Tiano, 1986; Caneva, 1993; García & Martín, 1996). También puede ocurrir que una zona muy compacta puede ser penetrada cuando se produce una disminución de cohesión de los materiales debida a la acción de otros factores físico-químicos.

Con respecto al mecanismo químico, el deterioro se debe principalmente a la actividad de los exudados de sus raíces, que contienen compuestos orgánicos e inorgánicos (Caneva et al., 1994). Dichos exudados digieren el material sobre el que vegetan provocando fisuraciones y resquebrajaduras en techos, muros y suelos. En tales fisuras entra el agua que, además de disolver y lavar lentamente el material, puede congelarse en invierno y separar porciones de la estructura lo que, a veces, puede perjudicar a la integridad del monumento.

#### F. Animales

El daño más frecuentemente observado en los materiales pétreos expuestos a la intemperie es el provocado por las aves, especialmente las urbanas. Estos daños son debidos principalmente a los hábitos que poseen y al elevado número de individuos que se encuentran en muchos monumentos.

En casos específicos, cigüeñas, gaviotas y córvidos, pueden ser mencionados como biodeteriogenos (Rodríguez de los Santos, 1996), pero existen otras especies más abundantes, como el gorrión, la paloma y el estornino, que pueden ocasionar daños debido precisamente a su abundancia, es decir, la nocividad de estos animales se produce sólo cuando el número y la concentración de individuos son excesivos.

El daño que más interesa es el producido por sus excrementos. Ocasionan un daño estético porque, como en el caso de otras aves gregarias, el acúmulo de excrementos determina con el tiempo el embadurnamiento del material y termina recubriendo la superficie, impidiendo la visión de la obra.

También los excrementos producen un daño químico en los materiales pétreos (Magauda, 1994) por su gran riqueza en ácido úrico y su contenido en sulfatos, nitratos y fosfatos, que son solubles en agua por lo que pueden reaccionar con el sustrato generando otras sales y provocando corrosión.

Por otro lado, se da también un daño mecánico, debido al posamiento de estas aves, si la piedra tiene escasa cohesión superficial. En el caso de las cigüeñas, el deterioro físico es el más importante de todos los que produce debido al peso que pueden alcanzar los nidos de estas aves (más de 100 Kg) sobre los lugares más inaccesibles. Estos nidos se suelen ubicar sobre pináculos y otras estructuras similares que suelen ser las más frágiles (García Ortega & Valentín Rodrigo, 1997).

Las aves, pueden causar, además, daños indirectos (Caneva et al., 1994) mediante el aporte de sustancias orgánicas que sirven de nutrientes para la microflora heterótrofa (bacterias, actinomicetos y hongos). También favorecen el desarrollo de una flora nitrófila, especialmente sobre las zonas horizontales donde la deposición de excrementos es mayor.

Por último, a través de los excrementos, las aves depositan sobre cornisas y otras estructuras las semillas no digeridas de los frutos que forman parte de su dieta. Otro vector de propagación de semillas sería a través de las patas de las aves en las cuales quedan adheridas (Sáiz Jiménez & Samson, 1981). Las semillas son transportadas a tejados y zonas altas donde arraigan si existe un

suelo incipiente. Estos son los principales vehículos mediante los cuales se dispersan las especies vegetales que van a colonizar las zonas altas del patrimonio arquitectónico.

Los daños causados por insectos afectan fundamentalmente a materiales orgánicos. Los daños en materiales inorgánicos (de tipo pétreo) son relativamente raros, aunque en algún caso pueden ser graves. Los ejemplos más reseñables se deben todos ellos a himenópteros, y son:

1. la construcción de nidos de barro (cámaras de cría), de naturaleza muy compacta, llevada a cabo por ciertas avispas (esfécidos y véspidos), que pueden llegar a cubrir superficies importantes en muros, paredes o esculturas;
2. el aprovechamiento de grietas y la subsiguiente excavación de galerías de refugio y reproductoras llevado a cabo por ciertas avispas y abejas cortadoras de hojas (véspidos, andrénidos, antofóridos y halíctidos)
3. la excavación de habitáculos en la base de edificaciones efectuada ocasionalmente por algunas hormigas (formícidos).

Los restantes tipos de deterioro sobre materiales inorgánicos son producidos de forma indirecta por la presencia de insectos. El acúmulo transitorio de ejemplares puede atraer a depredadores como ratones y murciélagos que serían los verdaderos causantes del deterioro.

## 2. LA CONSERVACIÓN DEL PATRIMONIO CULTURAL

### 2.1 METODOLOGÍA DE ESTUDIO DEL BIODETERIORO Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS

Dependiendo de cuál sea la naturaleza de los organismos que se sospecha puedan ser responsables de un fenómeno de bioalteración, será necesario llevar a cabo una serie de análisis que permitan establecer si es así o no.

En la literatura es posible encontrar métodos de estudio muy variados al respecto, no existiendo, hasta el momento, ninguna normalización o protocolo básico de actuación en los estudios de biodeterioro. Cuando se estudian directamente los agentes biodeteriorantes se pueden considerar métodos directos, mientras que en los casos en los que la detección de dichos agentes es realizada a través del estudio de sus productos metabólicos o actividad bioquímica se consideran métodos indirectos (García y Martín, 1996 b).

Los métodos morfológicos y estructurales, empleados en ambos casos, implican varias técnicas de examen del material:

- observación visual
- con estereomicroscopio, aunque de escaso aumento, permite identificar los organismos presentes
- con microscopio óptico, se puede reconocer la morfología y estructura celular de cada grupo de organismos y microorganismos
- con microscopio electrónico de barrido, para la observación tridimensional de las células o de la superficie del material

La identificación de los organismos que causan el biodeterioro es importante para definir su hábitat y su peligrosidad, pero sobre todo para establecer la metodología más adecuada para su destrucción o la reducción de su actividad deteriorante. Obviamente, los procedimientos que llevan a su identificación y a su clasificación taxonómica son diferentes según se trate de macroorganismos o microorganismos (Caneva et al., 2005).

Existen en la bibliografía numerosas publicaciones acerca de la identificación de organismos, sin embargo pocas tratan acerca de la actividad deteriorante que ocasionan (Ascaso et al., 2002; Ascaso et al., 2004; De los Ríos et al., 2008). Los estudios deben estar destinados a definir y cuantificar el deterioro focalizando la atención sobre la relación organismo-sustrato y sobre la actividad metabólica de los organismos. Por tanto, es necesaria una planificación inicial de los estudios que se vayan a realizar, teniendo presente que la identificación de un determinado organismo sobre un bien cultural, no implica necesariamente que aquél esté causando su degradación. Por tanto, es preciso evaluar el deterioro provocado para determinar la necesidad o no de una intervención con productos biocidas.

#### 2.1.1 Toma de muestras

La metodología de muestreo representa un momento crucial ya que condiciona las fases de estudio y los resultados finales. El muestreo debe planificarse dependiendo de la finalidad del diagnóstico y del análisis, por ejemplo, identificación de los organismos presentes, relaciones con el sustrato, deterioro provocado en el material, etc. Por tanto, las técnicas de muestreo y de conservación de las muestras varían en función del tipo de sustrato y de la presencia de microorganismos, no siempre reconocibles mediante examen visual, o macroorganismos (líquenes, briofitos, plantas, animales) (Normal 3/80).

Las muestras deben tomarse en las zonas donde se manifieste la presencia de organismos o sus efectos en forma de deterioro del sustrato. El protocolo de toma de muestra debe definir los parámetros más importantes: la cantidad de muestra a tomar, la forma de hacerlo, y los instrumentos que se emplean en cada caso concreto.

### 2.1.2 Estimación directa de organismos

#### Reconocimiento de *visu*

En la inspección de un monumento es posible, en ocasiones, detectar a simple vista la presencia de costras (líquenes) y películas coloreadas (cianobacterias y algas verdes); no obstante, para la determinación e identificación de las mismas es necesario recurrir al uso de técnicas microscópicas. Esto no sucede así, en el caso de plantas superiores u organismos de tamaño macroscópico en los que es posible realizar su determinación a simple vista.

#### Técnicas de Microscopía

La colonización biológica no es solamente la que es visible al ojo humano, existen también microorganismos que, para ser detectados, necesitan ser observados mediante microscopía, como por ejemplo bacterias heterótrofas y hongos, así como aquellos microorganismos que se encuentran en el interior de los materiales y que, por tanto, han de ser visualizados mediante técnicas especiales que permitan analizar el interior de las obras.

Las técnicas de microscopía permiten el estudio, de forma conjunta, de los microorganismos y del sustrato que colonizan, tanto si se encuentran en la superficie (colonización epilítica) como en zonas internas del material (colonización endolítica) (De los Ríos et al. 2008) con lo que es posible determinar mediante estas técnicas la acción alterante de los organismos a través del estudio de la interfase sustrato-organismo permitiendo, además, establecer casi inmediatamente el tipo y morfología de los organismos presentes.

Las técnicas microscópicas incluyen microscopía óptica o de luz, microscopía laser confocal (De los Ríos, 2008) y microscopía electrónica, tanto de trasmisión como de barrido (de alto o bajo vacío), combinadas con los distintos tipos de detectores, como el de electrones retrodispersados (De los Ríos, 2008). En caso de la microscopía óptica, las muestras pueden ser observadas directamente en fresco o pueden ser montadas, previa tinción o no, para su observación. En los otros casos las muestras necesitan preparación previa: deshidratación por punto crítico, criofijación, corte en secciones ultrafinas, etc.

La microscopía electrónica, gracias a una fuente radiante constituida por un haz de electrones a gran velocidad, tiene la ventaja de que permite obtener aumentos mayores que los alcanzados por medio de sistemas ópticos que utilizan radiaciones luminosas como fuente de iluminación.

#### Métodos microbiológicos

Permiten la identificación y cuantificación de los microorganismos que se desarrollan sobre un material.

- *Recuento del número de unidades formadoras de colonias:*

En el caso de los materiales pétreos o geomateriales, los grupos responsables de su alteración son los que se desarrollan sobre el suelo, por lo que la metodología que se aplica coincide con las técnicas de microbiología del suelo (García y Martín, 1996 b). Para su desarrollo se parte de una toma de muestras lo más estéril posible y la posterior preparación de las mismas para su

siembra en medios de cultivo específicos, incubación en las condiciones necesarias (a temperatura ambiente o en estufa incubadora con temperatura controlada) y por último, el estudio del crecimiento de cada cultivo para determinar el número de unidades formadoras de colonia (u.f.c.) por gramo de muestra tomada.

Este estudio se puede combinar con el análisis químico de algunos compuestos como sulfatos, carbonatos, nitratos, nitrógeno orgánico, etc., que permiten establecer correlaciones entre los microorganismos identificados y las alteraciones del sustrato (Tiano et al., 1975).

El fin de esta técnica es la identificación y cuantificación de la microflora que se desarrolla sobre la piedra, siendo, al menos en un primer término, una determinación de poblaciones caracterizadas por sus funciones bioquímicas, en lugar de una caracterización de especies.

Esta metodología sería similar a la aplicada en otro tipo de materiales, como aquellos de origen orgánico.

- *Obtención de cultivos puros*

En la naturaleza los microorganismos se encuentran en comunidades más o menos complejas, es decir, que no suele encontrarse un solo tipo aislado, sino asociado a otros. Por esta razón una técnica esencial en microbiología es la obtención de cultivos puros, aquellos que contienen una sola clase de microorganismos, para poder identificarlo y estudiar sus características bioquímicas o de otro tipo.

La obtención de un cultivo puro se hace mediante una técnica de aislamiento. La más utilizada consiste en sembrar en un medio de cultivo sólido en placa, de tal manera que los microorganismos generen colonias separadas ("Aislamiento por agotamiento en estrías"). Se sabe que cada colonia procede de una sola célula, por lo tanto el cultivo descendiente de una colonia es un cultivo puro ([aulavirtual.usal.es](http://aulavirtual.usal.es)).

- *Técnica de impresión*

Para poner de manifiesto la distribución de los microorganismos en la superficie de la piedra, se utiliza una técnica de impresión de placa con agar.

- *Recuentos bacterianos en el aire*

Los microorganismos presentes en el aire, sobre todo aquellos con una alta producción y dispersión de esporas, son un riesgo potencial de contaminación de los materiales que se encuentran fundamentalmente en sitios cerrados como espacios arqueológicos, archivos, bibliotecas o salas donde existan problemas de conservación. Por ello, se llevan a cabo análisis de carga microbiana del aire con el objetivo de buscar soluciones.

El método se basa en el muestreo del aire circundante, mediante un aparato denominado muestreador de aire por impacto, el cual se hace incidir sobre un medio de cultivo determinado, según se pretendan valorar bacterias u hongos. Posteriormente se procede a la incubación a una temperatura adecuada y finalmente se efectúa el conteo de colonias expresando el resultado en unidades formadoras de colonias por metro cúbico (ufc/m<sup>3</sup>).

### 2.1.3 Estimación indirecta de organismos

La determinación cuantitativa o cualitativa de microorganismos tras el crecimiento en los cultivos no significa necesariamente que se esté produciendo un fenómeno de bioalteración. Estos microorganismos solamente representan un daño potencial, ya que muchos de ellos permanecen en estado de quiescencia y únicamente se activan cuando las condiciones son favorables. Así pues, solo mediante la utilización de métodos indirectos se puede obtener información sobre su patogenicidad (García y Martín, 1996 b).

Para la obtención de resultados que permitan estimar el biodeterioro más rápidamente que con el estudio microbiológico, se recurre a otro tipo de ensayos (bioquímicos, químicos y fisicoquímicos).

#### Métodos bioquímicos

Permiten determinar cuantitativamente los productos del metabolismo de los microorganismos que están causando biodeterioro, así como obtener algunos parámetros para evaluar ese daño.

- *Determinación de ATP (Adenosín trifosfato) por bioluminiscencia*

Todas las células vivas poseen ATP, el cual puede ser fácilmente extraído de una muestra biológica y hacer reaccionar con el reactivo luminiscente luciferin/luciferasa para determinar la cantidad de ATP presente en dicha muestra. Como el número de microorganismos presentes es proporcional a la cantidad de ATP hallada, se puede estimar el grado de desarrollo de estos microorganismos sobre el material en estudio.

- *Determinación de la DBO<sub>5</sub>*

Es una modificación del método usado para determinar la demanda bioquímica de oxígeno a los cinco días en aguas residuales. Permite valorar la cantidad de materia orgánica existente en los materiales. Se mide la cantidad de oxígeno consumido por los microorganismos al descomponer compuestos orgánicos.

#### Métodos químicos y fisicoquímicos

Mediante el estudio de diferentes sustancias químicas, resultado de la acción de determinados organismos o de productos de su metabolismo, se puede poner de manifiesto la presencia de materia viva sobre los materiales alterados.

- *Determinación de compuestos orgánicos por cromatografía*

Consiste en la extracción de los compuestos orgánicos de la muestra con distintas mezclas de solventes y posterior concentración y desarrollo del cromatograma. Se utiliza la cromatografía en capa fina (TLC), para la identificación de lípidos; cromatografía gaseosa (CG) para fraccionamiento de triglicéridos e identificación de ésteres metílicos, y cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (GC-MS) para análisis directo de los extractos. También se utiliza HPLC para la determinación cualitativa y cuantitativa de ácidos orgánicos producidos por los microorganismos.



- *Identificación de pigmentos fotosintéticos por espectrometría visible*

La presencia de pigmentos sobre el sustrato está ligada a la existencia de ciertos organismos autótrofos. La estimación cuantitativa de los pigmentos es proporcional al número de microorganismos fotosintéticos.

Para ello se somete la muestra a la extracción de los pigmentos mediante acetona o dimetil sulfóxido (DMS), manteniéndola en oscuridad. Una vez realizada la extracción se centrifuga para eliminar los restos sólidos y, con un espectrofotómetro visible, se realiza un barrido del espectro de absorción (Martín, 1990; Pietrini et al., 1985; Tomaselli et al., 2002).

- *Determinación de ácidos nucleicos y proteínas*

La determinación de estos compuestos representa una medida de la biomasa presente en el sustrato.

Los ácidos nucleicos son las biomoléculas portadoras de la información genética. Desde el punto de vista químico, son macromoléculas formadas por polímeros lineales de nucleótidos, unidos por enlaces éster-fosfato, sin periodicidad aparente. De igual forma, las proteínas son polímeros lineales aperiódicos de aminoácidos. La aperiodicidad de la secuencia de nucleótidos implica la existencia de información. De hecho, los ácidos nucleicos constituyen el depósito de información de todas las secuencias de aminoácidos de todas las proteínas de la célula. Existe una correlación entre ambas secuencias, lo que se expresa diciendo que ácidos nucleicos y proteínas son colineares; la descripción de esta correlación es el Código Genético, establecido de forma que a una secuencia de tres nucleótidos en un ácido nucleico corresponde un aminoácido en una proteína.

De acuerdo a la composición química, los ácidos nucleicos se clasifican en Ácidos Desoxirribonucleicos (ADN), que se encuentran en el núcleo celular y algunos orgánulos, y en Ácidos Ribonucleicos (ARN) que actúan en el citoplasma.

Para extraer el ADN de las células, hay que eliminar los restos minerales, romper esas células y eliminar los restos celulares por centrifugación. Sobre una alícuota de este extracto se digieren enzimáticamente las proteínas y, posteriormente, los ácidos nucleicos se determinan en función de la densidad óptica a una determinada longitud de onda. Sobre otra alícuota se determinan las proteínas también por densidad óptica a otra longitud de onda (García y Martín, 1996).

El ADN genómico suele extraerse para su uso en procesos como una PCR cualitativa que identifica y determina los organismos en estudio.

#### **2.1.4 Diagnóstico de la actividad biodeteriorante de los organismos sobre el material**

##### **Técnicas de microscopía**

Tras la determinación de los organismos que colonizan los materiales, es necesario conocer que alteraciones están teniendo lugar en el sustrato e identificar cuál de estos organismos es el causante principal. Así se puede determinar cuáles son los organismos más agresivos y sus mecanismos de alteración para, posteriormente, planificar los tratamientos más eficaces (De los Ríos, 2008).

Los microorganismos más agresivos suelen ser los hongos (en forma liquenizada o de vida libre) ya que su interacción con el sustrato es muy estrecha. En el caso de los materiales pétreos, su colonización endolítica puede observarse mediante la microscopía láser confocal que ofrece

imágenes tridimensionales. El grado y el tipo de alteración dependen de muchos factores, por ejemplo las características texturales de la roca (Cámara et al., 2008).

La acción alterante de los organismos sobre el sustrato puede ser de dos tipos: una acción química, causada por los compuestos que producen estos organismos y que generan alteración química de los minerales; y una acción mecánica que puede provocar ruptura y desprendimiento de los materiales. Mediante el uso de técnicas como la microscopía electrónica de barrido (SEM) combinada con microanálisis por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS), se puede realizar el estudio de la alteración química de los minerales y de la acción mecánica que ejercen los microorganismos sobre un material. Por tanto, esta técnica es una herramienta muy eficaz a la hora de realizar el estudio de biodeterioro de un sustrato pétreo o un material orgánico y así establecer un diagnóstico acertado.

## **2.2 MÉTODOS DE PREVENCIÓN Y CONTROL DEL BIODETERIORO. BIOCIDAS**

Los criterios de conservación del patrimonio cultural deben contemplar siempre un programa de mantenimiento y control de los fenómenos de biodeterioro de un bien cultural, lo cual requiere prestar una atención especial a las condiciones ambientales que rodean dicho bien.

Durante mucho tiempo, las intervenciones de restauración se habían centrado exclusivamente en el estudio de las superficies y sus alteraciones. La *Carta del Restauo* (1987), recoge el concepto de la conservación preventiva sobre una obra y sobre el ambiente en el que se encuentra, lo que supuso un cambio fundamental a la hora de proyectar una intervención de restauración de una obra de arte. A partir de aquí, se efectúa un diagnóstico y un tratamiento de limpieza, así como el control del ambiente en el que se encuentra la obra.

El control del crecimiento de los agentes biológicos responsables del biodeterioro de las obras de arte se encuentra dentro de las operaciones que se suelen realizar en las intervenciones de restauración. La eficacia de estos tratamientos depende del método y de los productos empleados, sin embargo, es necesario recalcar que los organismos volverán a crecer si las condiciones ambientales son favorables. Es por ello que los métodos de prevención, llamados también métodos indirectos, inhiben o ralentizan el desarrollo biológico operando, no directamente sobre los agentes biológicos, sino sobre las causas es decir, sobre los factores que pueden condicionar la presencia de organismos.

Los métodos de control incluyen las medidas utilizadas para eliminar el deterioro de los bienes culturales y los organismos que lo causan. Se denominan métodos directos de eliminación del crecimiento biológico a la aplicación de sistemas mecánicos, físicos y químicos, que intervienen directamente sobre los agentes biológicos.

### **2.2.1 Métodos indirectos**

Suponen una inhibición o disminución del crecimiento biológico por modificación de los parámetros ambientales (como humedad o temperatura) o de los factores físico-químicos del sustrato (nutrientes).

Son consecuencia de los estudios efectuados sobre el ambiente (monitorización microclimática y aerobiológica) y sobre el sustrato (materiales constitutivos, productos de alteración, etc.), pero sobre todo de aquellos estudios realizados sobre el conocimiento de las exigencias ecológicas de los distintos grupos sistemáticos a los que pertenecen los organismos responsables del deterioro.

Sin embargo, no siempre es posible realizar la aplicación de este tipo de métodos, puesto que raras veces se puede provocar un cambio en las condiciones ambientales y llevar a cabo un control estricto de estos parámetros.

En **ambientes internos** es necesario controlar una serie de factores como son la alta temperatura, la elevada humedad relativa, la escasa ventilación, la presencia de suciedad (partículas orgánicas, polvo) y la ausencia o presencia de luz. Para ello, es necesario un mantenimiento periódico con sistemas de acondicionamiento de aire. No obstante, resulta imposible generalizar, por lo que es fundamental estudiar cada caso considerando cada situación de manera independiente. En cada intervención debe realizarse un estudio preliminar acerca de las características microclimáticas del ambiente considerado, de las características estructurales y del estado de conservación en materia de biodeterioro de la obra en estudio.

Los análisis de la composición del aire, tanto de los contaminantes químicos atmosféricos como de los biológicos, contribuyen a definir situaciones de riesgo para los bienes culturales. Con respecto a estos últimos, hay que tener en cuenta que no todos los microorganismos presentes en el aire tienen potencial biodeteriogeno, por tanto, es indispensable conocer las distintas especies que son capaces de dañar los diferentes materiales que forman parte de los bienes culturales. Por lo que respecta al patrimonio histórico-artístico y documental, actualmente no están disponibles los valores límite recomendados para la contaminación biológica, sin embargo sí existe un decreto para definir los niveles de riesgo biológico higiénico-sanitario (Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. Ministerio de la Presidencia. «BOE» núm. 124, de 24 de mayo de 1997. Referencia: BOE-A-1997-11144). Además se han realizado estudios acerca de los niveles de riesgo biológico para las distintas categorías de los bienes culturales (Pasquariello et al., 2000; Valentín, 2007).

Una correcta ventilación de los ambientes constituye uno de los sistemas de control más válidos a la hora de limitar el riesgo de biodeterioro. La circulación del aire en ambientes internos disminuye sensiblemente la deposición de esporas y propágulos microbianos sobre los materiales constitutivos de los bienes culturales.

Con respecto a los **ambientes externos**, el control de los factores ambientales no siempre es posible o, si lo es, tiene un efecto muy limitado reduciendo levemente el crecimiento de ciertas especies. La causa principal para que se origine el crecimiento de organismos es la humedad elevada, pero es prácticamente imposible reducir el contenido de agua de los materiales expuestos a la intemperie. Se pueden proteger las obras de la lluvia mediante estructuras de protección, pero no se puede garantizar la reducción de la humedad que asciende por capilaridad desde el suelo (Caneva et al., 2000). Por otro lado, se puede incrementar la cohesión y la hidrorrepelencia de los materiales mediante tratamientos consolidantes y protectores o hidrófugos. Estos tratamientos pueden prevenir o retrasar la colonización microbiana de un sustrato, pero algunos pueden resultar un sustrato de crecimiento para muchos organismos heterótrofos (Salvadori & Nugari, 1987). Por tanto, estos tratamientos deben ser efectuados inmediatamente después de la aplicación de biocidas sobre materiales biodeteriorados. En conclusión, las labores de mantenimiento periódico son el único modo de prevenir el biodeterioro en un ambiente externo.

### 2.2.2 Métodos directos

Suponen una acción directa sobre los organismos responsables del biodeterioro, es decir, la aplicación de un tratamiento que consista en esterilización y/o erradicación de los organismos.

Sin embargo, con el tiempo los materiales pueden ser nuevamente colonizados, por lo tanto estos métodos resultan útiles, únicamente, durante un cierto período (Caneva et al., 1994).

Previamente a la aplicación de una metodología de intervención correcta, existen algunos aspectos que deben ser tomados en consideración algunos aspectos de la cuestión (Caneva et al., 1994, 1996, Koestler et al., 1997). Los principales elementos a valorar son:

- Conocer, en primer lugar, si el deterioro es de naturaleza biológica, es decir, si realmente existe un problema de biodeterioro. La respuesta en este caso no siempre es fácil, ya que el ataque biológico no tiene por qué ser macroscópicamente visible, por lo que es necesario detectar e identificar los organismos responsables de la alteración.

- Saber cuándo es oportuno intervenir, ya que algunas veces, aunque exista un problema de biodeterioro, hay ciertos riesgos relacionados con la intervención.

Es importante valorar el daño existente y cuantificarlo, teniendo en cuenta las características ecológicas, fisiológicas y morfológico-estructurales de las especies implicadas, porque esto permitirá comprender cuales son las condiciones que favorecen su desarrollo, su crecimiento, su relación con el sustrato y sus mecanismos de alteración.

Otro aspecto a tener en cuenta es la duración de los efectos del tratamiento. En el caso de que las alteraciones sean graves, es necesario, además de realizar un tratamiento, planificar paralelamente un mantenimiento periódico. Si éste no va a ser posible, el tratamiento resultaría inútil.

Además, las consecuencias de un tratamiento a nivel ecosistémico deben ser valoradas ya que, si es específico contra algunas especies, la eliminación de éstas puede favorecer la proliferación de otras especies más agresivas por ausencia de competencia, provocando así efectos colaterales más graves que los preexistentes.

- Por último, si existen riesgos para el bien cultural, es importante valorar la necesidad de aplicar o no un tratamiento. A veces no es posible realizar una remoción o eliminación de los organismos sin alterar gravemente el material constitutivo de la obra, por ello se debe evitar la intervención adoptando otras medidas. Sin embargo, en ocasiones el tratamiento es inevitable aunque el estado de conservación y las condiciones físico-químicas del material que constituye la obra sean críticos. En estos casos es necesario realizar intervenciones preliminares de conservación, así como estudios previos de evaluación de tratamientos.

Una vez que se ha decidido intervenir, es necesario elegir el método más adecuado para el control biológico entre los métodos mecánicos, físicos o químicos. Se seleccionará en función del tipo de organismo, de los materiales constitutivos de la obra y de su estado de conservación.

Las características de las distintas metodologías que se pueden emplear deben ser estudiadas experimentalmente para poder establecer: la eficacia, la posible interacción con el sustrato, el método de aplicación, los efectos a largo plazo y la posible interacción con otros productos usados en la restauración.

#### – **Métodos mecánicos**

Estos métodos se basan en la remoción física de los agentes biodeteriorantes con instrumentos manuales como bisturí, espátula, cepillo, aspirador, etc. Por su simplicidad son empleados frecuentemente, sin embargo tienen la desventaja de no dar resultados de larga duración, puesto que resulta muy difícil obtener una eliminación completa de la estructura vegetativa o

reproductiva de la especie presente, a menos que se dañe gravemente el sustrato. Los métodos mecánicos pueden resultar muy útiles sobre todo si se combinan con métodos químicos.

– **Métodos físicos**

Los métodos físicos se basan en una actividad biocida directa sobre los organismos mediante interacción con su material genético, como es el caso de las radiaciones ionizantes, o mediante otros procesos de alteración física de las células, como el calentamiento o la congelación; o en una acción biocida indirecta mediante la reducción de elementos de la atmósfera, como el oxígeno, esencial para la supervivencia de los organismos aerobios, por ejemplo, la aplicación de atmósferas transformadas en un sistema herméticamente cerrado donde se deposita el objeto a tratar.

Estos métodos, con actividad biocida directa, emplean principalmente radiaciones electromagnéticas (ultravioleta, gamma, beta) y eléctricas con acción biocida o nociva para los organismos tratados (Caneva et al., 1996). La radiación ultravioleta muestra una gran actividad germicida y es muy utilizada para la esterilización de superficies, utensilios y objetos. Los rayos gamma son radiaciones electromagnéticas con una frecuencia más elevada que los ultravioleta y, por tanto, con una mayor actividad biocida. Su aplicación se limita al tratamiento de materiales orgánicos (papel, pergamino y madera). El uso de altas y bajas temperaturas también está restringido al caso de materiales orgánicos. El tratamiento con ultrasonidos, empleado para la limpieza de objetos arqueológicos, madera mojada y tejidos modernos, puede tener analogías con los efectos biocidas.

Otro método físico empleado actualmente es el tratamiento con láser, llevado a cabo con diferentes condiciones (duración del pulso y longitud de onda), sobre líquenes como *Verrucaria niegrescens* (Osticioli et al., 2015). Así mismo, se ha comprobado la efectividad de las microondas en el tratamiento de agentes biológicos que infestan tanto objetos de madera como de piedra, comprobándose una baja interacción con estos materiales gracias a su acción selectiva (Riminesi y Olmi, 2016).

Sin embargo, el uso de estos métodos físicos no está muy difundido debido a su difícil aplicación, su alto coste, el riesgo para los operarios y los posibles fenómenos de interferencia con los materiales constitutivos de la obra tratada. Además, es necesario advertir que las obras tratadas pueden ser recolonizadas inmediatamente después de la aplicación de estos tratamientos si no se conservan en el ambiente adecuado.

Los métodos con actividad biocida indirecta son, para el caso de materiales orgánicos, el uso de atmósferas transformadas mediante gases inertes para la eliminación de organismos por anoxia. La aplicación de productos biocidas, como la fumigación con gases (óxido de etileno, bromuro de metilo, fosfinas, etc.), puede ocasionar graves problemas de toxicidad en las personas que los usan y alteraciones en las propiedades físico químicas de los materiales que constituyen las obras de arte. Como tratamiento alternativo, se propone la aplicación de un gas inerte (argón o nitrógeno) en un sistema herméticamente cerrado, en cuyo interior se deposita el objeto infestado. Es necesario llevar el control de ciertos factores ambientales: temperatura, humedad relativa y concentración de oxígeno. Se han realizado investigaciones en laboratorio que indican que una atmósfera de gas inerte, aplicada a baja concentración de oxígeno, produce una anoxia completa en todas las fases del ciclo biológico de especies de insectos destructores de bienes culturales (Valentín et al., 1990; Valentín, 1994).

El objetivo es eliminar por completo cualquier plaga de insectos y disminuir el desarrollo de microorganismos aerobios que se encuentren alterando las obras de arte. El gas descrito no es

tóxico, tiene un bajo coste y es estable por lo que no produce alteraciones físico-químicas en los objetos tratados (Sameño Puerto y Martín García, 2014).

En el caso de los materiales inorgánicos, los organismos fotosintéticos necesitan una fuente luminosa para poder vivir, por lo que para reducir su actividad se puede proceder a recubrir el material sustrato con tejidos que no dejen pasar la luz durante un corto periodo de tiempo (Caneva et al. 2005). La duración de este tratamiento varía dependiendo de la especie presente y de la intensidad de su desarrollo. Por ejemplo, sobre los líquenes se han obtenido buenos resultados en cuanto al efecto biocida de dos meses de oscuridad (Pietro et al., 1996).

Las comunidades que forman algas y cianobacterias, llamadas *biofilms*, presentan diversas respuestas fisiológicas a las distintas variables ambientales (Del Rosal, 2014). Se han realizado estudios para conocer el efecto de la intensidad luminosa (irradiancia) sobre la fotosíntesis de las especies que forman los *biofilms* (Álvarez et al., 2015).

Especialmente, en el caso de las cuevas turísticas o rupestres, la reducción de los periodos de iluminación puede reducir la proliferación de algas, aunque no impide su desarrollo puesto que la iluminación no se elimina del todo. Como alternativa se ha estudiado la posibilidad de aplicar una fuente de luz que reduzca la actividad fotosintética y que produzca un estrés fisiológico en los organismos presentes (Figueroa et al., 2015). En este estudio, los autores presentan un procedimiento que permite adaptar la calidad e intensidad de la luz utilizando combinaciones de fuentes LEDs de distinta composición espectral, activándose sólo aquellos LEDs que tengan menos efectividad fotosintética (teniendo en cuenta la composición de los *biofilms*).

#### – Métodos biológicos

Estos métodos son aquellos que utilizan especies parásitas o antagonistas para limitar el crecimiento de otras especies animales o vegetales (Caneva et al., 2000).

En el caso de las plantas superiores, por ejemplo la flora vascular ruderal, se puede pensar en el empleo de insectos fitófagos especializados, pero en la práctica existen numerosas dificultades y contraindicaciones. En el caso de animales, sobre todo contra la avifauna, se han empleado especies antagonistas (predadores de pollos o de huevos) que reducen la densidad de población de las especies dañinas.

En el contexto de los bienes culturales son necesarios mayores conocimientos acerca del comportamiento de los insectos en relación a sus enemigos naturales. La principal desventaja es su escasa eficacia al no erradicar completamente las plagas. Las feromonas constituyen un método no tóxico de control que está siendo bastante investigado. Son sustancias muy específicas que intervienen en el apareamiento atrayendo al sexo contrario. Actualmente son sintetizadas químicamente y se aplican en trampas para atrapar al mayor número de insectos, erradicándolos posteriormente con un insecticida.

#### – Métodos químicos

El control del biodeterioro sufrido por los distintos materiales que componen los bienes culturales (orgánicos e inorgánicos), se ha realizado principalmente mediante el uso de biocidas o pesticidas.

Se denominan pesticidas o biocidas las sustancias químicas utilizadas para tratar las especies biológicas a eliminar. La acción biocida contra microorganismos se llama desinfección y contra

organismos macroscópicos como insectos y plantas se llama desinfestación. Los biocidas pueden ser clasificados en distintas categorías (Caneva et al., 1994, 2005) dependiendo de:

- su naturaleza química (orgánicos o inorgánicos);
- el tipo de organismo que elimina (existen diversos productos, pero en el caso del biodeterioro de los bienes culturales, se emplean bactericidas, fungicidas, alguicidas, herbicidas e insecticidas);
- el estado de agregación (compuestos líquidos, sólidos o gaseosos);
- el mecanismo de actuación (agentes oxidantes, tensioactivos, etc.). Los microbiocidas se dividen en dos categorías principales: los que actúan por contacto (agentes oxidantes como el hipoclorito, o por interacción con las membranas, como las sales de amonio cuaternario) y los que inhiben alguna actividad metabólica específica.

En algunos productos comerciales, el principio activo, que indica la actividad biocida, aparece unido a otros aditivos que mejoran la eficacia del producto. Así pues, el mismo principio activo puede ser vendido en distintas formulaciones o mezclas con distintos nombres comerciales.

Los requisitos de los productos que se emplean en la conservación de los bienes culturales deben ser por una parte de tipo técnico y por otra de tipo sanitario (Caneva et al., 2000):

- elevada eficacia contra los agentes que causan biodeterioro,
- nula interferencia con los materiales constitutivos de la obra en estudio,
- baja toxicidad para la salud humana y
- bajo riesgo de contaminación ambiental.

La *eficacia* de un producto va en función de la actividad biocida que realiza contra los organismos a eliminar. Se define teniendo en cuenta la dosis necesaria (cantidad de biocida/unidad de superficie o volumen de aire), el espectro de acción (amplia actividad contra los organismos) y la persistencia de acción (duración del tratamiento en función de la permanencia de residuos tóxicos).

Existen una serie de factores que normalmente incrementan la eficacia de un tratamiento (Caneva et al., 1996):

- concentración empleada	- viento y lluvia durante el tratamiento
- duración de la aplicación	- contenido de agua del sustrato
- estabilidad del producto	- tipo de sustrato
- temperatura ambiental	- tipo de disolvente
- entidad de la colonización	- pH de la solución
- presencia de materiales orgánicos	- intensidad luminosa y
- presencia de fisuras en el sustrato	- lluvia posterior al tratamiento.

La ausencia de *interferencia con el material* es de suma importancia. Dependerá de la capacidad de reacción química que tenga el biocida y de la presencia o no de sustancias coloreadas presentes en la formulación del producto comercial. Por lo tanto es necesario verificar que el producto sea químicamente neutro, estable e incoloro. Actualmente, las distintas técnicas y metodologías de investigación científicas han permitido poner de manifiesto como muchos biocidas han causado efectos colaterales negativos, aunque éstos no siempre son apreciables a simple vista (Nugari & Salvadori, 2003a, 2003b).

Sin embargo, la interacción biocida-sustrato no sólo depende de algunas características químicas del principio activo, sino también de la concentración empleada, del tiempo de contacto, de la metodología de aplicación y del tipo de sustrato (composición y porosidad).



Además, es necesario tener en cuenta que los biocidas pueden también interaccionar con otros productos usados previa o simultáneamente en la intervención, como los consolidantes o los hidrófugos.

La *toxicidad* de un producto se define como su capacidad de producir lesiones o la muerte. Para cuantificar la toxicidad de un producto se usa un índice referido a la cantidad de principio activo (suministrado por vía oral o por vía cutánea) que resulta letal para el 50% de los animales usados en ensayos experimentales. Se indica con las siglas DL<sub>50</sub> (Dosis Letal) y se mide en mg de producto/Kg de peso del animal. El valor que define la DL<sub>50</sub> está condicionado por diversos factores: especie animal, variabilidad genética, edad, condiciones fisiológicas, factores ambientales, sustancias asociadas y degradación de la sustancia. Considerando esto, se establecen las clases toxicológicas (en orden decreciente de toxicidad) de las formulaciones comerciales, de acuerdo con la normativa comunitaria (Dir. 92/32/CEE).

Todas las sustancias con actividad biocida utilizadas en el sector agrícola y civil-sanitario, deben ser registradas por la institución correspondiente, documentando los datos toxicológicos y la eficacia contra las distintas especies. Sobre esta base, las autoridades competentes clasifican las sustancias y les asignan la clase toxicológica, indicando las precauciones que deben ser tenidas en cuenta a la hora de manipular el producto.

El riesgo de *contaminación ambiental* es otro de los factores que debe ser tenido en cuenta. A veces, es posible que una dosis más o menos elevada del producto aplicado se disperse en el ambiente.

Los biocidas pueden ser aplicados de diferente manera dependiendo del material constitutivo de la obra, de su estado de conservación, del organismo a eliminar, de la entidad y difusión del ataque y del producto elegido. Los tratamientos pueden hacerse mediante pinceladas, aplicación de compresas, inyección, fumigación, etc. Los productos vienen en formulaciones líquidas o sólidas y se disuelven o dispersan en agua o en disolventes orgánicos a distintas concentraciones. A veces, en función del tipo de organismo, tras la aplicación del biocida, se puede efectuar una remoción parcial y suave de la biomasa mediante el uso de instrumentos adecuados.

La *pulverización* y la *aplicación mediante pincel* del producto diluido son los métodos de tratamiento más comunes. En el caso de materiales que presenten un estado de conservación muy deteriorado, es preferible utilizar el sistema de pulverización.

La *aplicación de compresas* se realiza sobre todo en el caso de organismos que están en estrecho contacto con el sustrato, como los líquenes, con el fin de incrementar el tiempo de contacto de la solución biocida con el organismo.

La *inyección* de biocidas se puede efectuar en el caso de materiales leñosos deteriorados por insectos, aprovechando los orificios y galerías que han dejado en la madera.

La *fumigación* o dispersión de un biocida gaseoso en el aire y en los materiales se emplea en el caso de materiales orgánicos. Este método tiene como ventajas una alta eficacia y una penetración más profunda en el material constitutivo. Sin embargo, debido a la alta toxicidad que presentan las sustancias usadas como fumigantes, el tratamiento debe realizarse en cámara de fumigación u otro ambiente perfectamente sellado. Estos gases pueden ocasionar graves problemas de toxicidad en las personas que los usan y alteraciones en las propiedades físico químicas de los materiales que constituyen las obras de arte.



Las sustancias químicas usadas más frecuentemente en conservación de bienes culturales varían según las leyes vigentes en los distintos países. Muchos de los productos usados en el pasado (por ejemplo óxido de etileno, bromuro de metilo, pentaclorofenol, formaldehído, etc.), están ahora prohibidos o tienen un uso limitado (Nugari & Salvadori, 2003b).

Los biocidas más habitualmente utilizados en la restauración de los bienes culturales se muestran en la tabla I.4.

Tabla I.4. Biocidas frecuentemente usados en conservación.

Organismo	Clasificación química	Nombre químico	Nombre comercial
Bactericidas, fungicidas, alguicidas, liquenicidas	Compuestos inorgánicos	Hipoclorito de calcio y de sodio	
		Peróxido de hidrógeno	
		Amoniaco	
	Alcoholes	Etanol	
	Derivados del fenol	Timol	
		o-fenil-fenol	
		p-cloro-m-cresol	Lysol
		Compuestos fenólicos clorados	Panacide, Halophane
		Pentaclorofenato de sodio	
	Sales de amonio cuaternario	Cloruro de alquil-bencil-dimetil-amonio	Preventol R50, R80, Neo Des, Hyamina
		Cloruro de dodecil-dioxietil-bencil amonio	Bradophen
		Cloruro de bencil-dimetil-tetrametilbutilfenoxi-etoxi etil-amonio	Hyamine 1622
	Organometálicos	Óxido de tri-n-butyl-estaño	TBTO, Thaltox
		Naftenato de tri-n-butyl-estaño	Metatin N58-10
	Piridinas	2,3,5,6 Tetracloro-4-metil sulfonil piridina	Algophase
	Mezclas	Sales de amonio cuaternario + Naftenato de tri-n-butyl-estaño	Metatin N58-10 101
		Sales de amonio cuaternario + óxido de tri-n-butyl-estaño	Thaltox Q
Dimetil-tiocarbamato de sodio+ 2 mercaptobenzotiazol		Vancide 51	
Insecticidas	Clasificación química	Nombre químico	Nombre comercial
	Compuestos inorgánicos	Fluoruro de sulfurilo	Vikane-Dow Chemical
	Organofosforados	Malathion	Cythion-American Cyanamid
		Propoxur	Baygon-Bayer
	Carbamatos	Carbaryl	Sevin-Union Carbide
Compuestos organoclorados		Lindano	
Piretroides y piretrinas			

Herbicidas	Piridinas	Picloram	Tordon 22K, Uniran
	Compuestos heterocíclicos (diazinas y triazinas)	Bromacilo	Hyvar X
		Hexacinone	Velpar
		Tributilazina	Primatol M50
	Secbumeton	Primatol 3588	
Compuestos fosforados	Glifosato	Roundup-Monsanto	

### 2.3 OTROS TRATAMIENTOS: CONSOLIDANTES E HIDRÓFUGOS

Durante una intervención de restauración sobre un bien inmueble las etapas que componen la fase de aplicación de tratamientos sobre los materiales son (Villegas et al. 2003):

- Limpieza.
- Eliminación de organismos.
- Consolidación.
- Hidrofugación.

Las dos últimas etapas, consolidación e hidrofugación, implican la aplicación de productos que deben permanecer en el sustrato mejorando sus características y protegiéndolo de la actuación de los factores externos de alteración (Esbert et al., 1997). Ya que se aplican tras la limpieza y eliminación de organismos, deben ser compatibles con los productos usados en estas dos etapas anteriores. Además, deben cumplir los siguientes requisitos:

- Ser compatibles físicamente con el sustrato sobre el que se aplican.
- Penetrar lo máximo posible y de manera uniforme.
- Para los geomateriales deben mantener una adecuada permeabilidad, consiguiendo que la porosidad de la roca sea lo más parecida posible al valor original, evitando así la obstrucción completa de los poros. De esta forma la piedra podrá “respirar”.
- Compatibilidad química con el sustrato, para que no se produzcan reacciones secundarias que puedan generar productos nocivos.
- No modificar sus características físico-químicas con el envejecimiento ni producir alteraciones en su aspecto.
- Ser resistentes a los agentes de alteración.
- Ser reversibles, es decir, si en un futuro fuera aconsejable retirar el producto del seno del material, esto debería ser posible sin causar ningún daño al sustrato.

#### Consolidación

La consolidación es la aplicación de un material que al penetrar en profundidad en el interior de la piedra, mejora su cohesión, sus características mecánicas y la adhesión de las capas alteradas al sustrato sano. La aplicación de un producto consolidante es necesaria únicamente cuando la piedra ha perdido cohesión y debe introducirse un material que consiga la unión entre los granos minerales que la forman y que han quedado sueltos además de la adherencia entre la zona alterada y la sana.

Los tratamientos de consolidación se vienen aplicando de forma sistemática desde la década de 1960 (Alcalde et al., 1990; Lazzarini & Tabasso, 1986), por lo que cada vez se encuentra más información acerca de su comportamiento: características, técnicas de aplicación, etc. Aunque actualmente los tratamientos se describen en profundidad y se hace un seguimiento detallado

de su evolución a lo largo de los años, la lentitud de los procesos de alteración hace que, en la mayoría de los casos, no exista la adecuada información acerca del comportamiento a largo plazo en exposición real de los productos usados, y por ello es necesario seguir recurriendo a los ensayos acelerados de laboratorio para llegar a la elección de los tratamientos más apropiados.

Las *características* que debe reunir un tratamiento consolidante se pueden englobar en tres aspectos fundamentales:

a) Compatibilidad con el sustrato. Desde el punto de vista químico, esto significa que no deben formarse compuestos que puedan reaccionar con los componentes de la piedra o que puedan afectar a la estructura cristalina. Desde el punto de vista físico, las propiedades de la piedra consolidada deben ser similares a las de la piedra sin tratar, a fin de que no se creen tensiones entre la capa tratada y el sustrato interno. Se puede evaluar esta compatibilidad en base a distintas características:

- Conservación de la porosidad y porometría original: la alterabilidad de una piedra está muy relacionada con su contenido en agua y con las posibilidades de movimiento de esta en su interior, que a su vez es función de la cantidad de poros y del tamaño de estos. Si un tratamiento produce una disminución de porosidad muy acusada o un aumento en los microporos, la alterabilidad de la piedra se verá incrementada.
- Capacidad de transferencia de humedad: los consolidantes deben permitir el paso de humedad a través de la piedra, para impedir la acumulación de agua y sales en determinadas zonas.
- Conservación de la apariencia física: la piedra no debe sufrir cambios de color o de brillo a causa de un tratamiento de consolidación. Además, su aspecto superficial no debe alterarse significativamente con el paso del tiempo por efecto de los agentes ambientales, especialmente la radiación ultravioleta.

b) Eficacia. La función más importante de un consolidante es restablecer la cohesión de los granos de la piedra en la zona externa alterada y el sustrato interno sin alterar. Por ello es fundamental conseguir una buena profundidad de penetración; en la interfase entre la zona tratada y sin tratar se produce un cambio de las propiedades tales como porosidad o permeabilidad al agua líquida y vapor, si este cambio es muy brusco podría producirse el desprendimiento de la capa tratada. La profundidad de penetración es inversamente proporcional a la viscosidad del producto y al ángulo de contacto con la piedra. Para obtener una medida cuantitativa del valor de la consolidación se usan las medidas de la resistencia a la compresión, a la tracción, medidas de la dureza superficial o de la resistencia a la abrasión.

c) Alterabilidad de la piedra consolidada: debe ser inferior a la de la piedra sin tratar, ya que de lo contrario sería preferible no tratarla y sustituirla. Dicha alterabilidad depende tanto de las características del producto como de las de la piedra y también de los factores de alteración. Se determina con la ayuda de ensayos de alteración acelerada.

Los principales *métodos de consolidación* se basan fundamentalmente en tres tipos de productos:

Consolidantes inorgánicos.

La aplicación de compuestos inorgánicos como producto consolidante data de hace varios siglos y alcanzó su máximo desarrollo en el siglo XIX. Las similitudes que presentan los compuestos inorgánicos con los constituyentes de la piedra hacen que dichos compuestos parezcan los más

apropiados para lograr su reconstitución, sin embargo esas similitudes hacen que esta siga alterándose de la misma forma que lo hacía antes de la aplicación del tratamiento consolidante. Esto quiere decir que con dichos tratamientos se lograrán mejoras en las características mecánicas de la piedra pero no se podrá proteger a la misma de los agentes ambientales que han provocado su alteración.

Las ventajas de los productos inorgánicos consolidantes son su mayor duración y la estabilidad frente a la radiación ultravioleta. Como inconvenientes presentan mayor fragilidad, menor elasticidad, dificultad para conseguir buena penetración lo que produce la formación de costras delgadas y duras, cambio de color en la superficie o posible formación de sales solubles como subproducto.

Entre ellos se encuentran los hidróxidos de calcio y bario en forma de soluciones o suspensiones acuosas, que dan carbonato cálcico en la reacción del hidróxido cálcico con el anhídrido carbónico del aire (Ashurst, 1998; Rodríguez-Navarro et al. 2005). La solubilidad de ambos hidróxidos en agua es muy baja, por lo que, si se utilizan soluciones, serán necesarias numerosas aplicaciones sucesivas para lograr la cantidad suficiente de carbonato cálcico. Por otro lado, si se utilizan lechadas de cal, se acelera la introducción del hidróxido, pero se dificulta su conversión en carbonato, ya que pueden llenarse los poros más superficiales e impedir el acceso del anhídrido carbónico a las capas internas (Price et al. 1988).

La síntesis de nanopartículas de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y su utilización como producto consolidante de rocas carbonatadas resuelve algunos de los problemas que presenta el hidróxido cálcico de tamaño micrométrico, como su incompleta conversión a carbonato cálcico, alteraciones cromáticas tras el tratamiento o la escasa profundidad de penetración en el sustrato poroso (Daniele & Taglieri, 2010, Hansen et al. 2003). Las nanopartículas de hidróxidos de calcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) y de magnesio ( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ) se han utilizado en restauración de piedra (Daniele & Taglieri, 2010; López-Arce et al. 2010), en pinturas murales, lienzos, en papel y en madera (Gómez-Villalba et al. 2010; Giorgi et al. 2005; Giorgi & Baglioni, 2000).

En el caso de rocas silíceas, granitos y algunos tipos de areniscas piedras se han usado silicatos alcalinos que producen la precipitación de sílice. Los principales inconvenientes que plantea la aplicación de este producto son su bajísima penetración y la formación de sales solubles como subproducto que desencadenan procesos de alteración. Actualmente se está estudiando el efecto de la aplicación de nanopartículas de sílice mezcladas con compuestos orgánicos tipo silanos los cuales mediante procesos de sol-gel polimerizan dentro de la piedra incrementando su cohesión (Kim et al. 2008).

Consolidantes organosilícicos.

La acción consolidante de estos compuestos consiste en la formación de una estructura reticular semejante a la de la sílice, por lo que se pueden considerar como productos intermedios entre los inorgánicos y los orgánicos (Alcalde et al., 1990; Lazzarini & Tabasso, 1986). Aunque en un principio fueron utilizados para el tratamiento de materiales silíceos, su uso se ha extendido a materiales calizos obteniéndose muy buenos resultados. Estos consolidantes están formados por moléculas del tipo  $\text{Si} - (\text{R}_i)_4$  con  $\text{R}_i$  radicales de dos tipos:

- O -  $\text{C}_n\text{H}_m$  alcoxi
- $\text{C}_n\text{H}_m$  alquilo

Estas moléculas reciben el nombre de alquilalcoxisilanos y pueden utilizarse en forma de monómeros o de material parcial o totalmente polimerizado. Cuando se utilizan monómeros el

proceso de polimerización en el interior de la piedra comienza por la hidrólisis del grupo alcoxi, seguida de la polimerización propiamente dicha que continúa hasta que todos los grupos alcoxi han reaccionado. Los grupos alquilo permanecen sin reaccionar y son los que caracterizan el tipo de polímero formado:

- Si se parte de un tetraalcoxisilano el producto final carecerá de grupos orgánicos y tendrá una estructura análoga a la de la sílice. Este producto solo tiene efecto consolidante.
- Si el monómero es un trialcoxisilano se forma un polímero entrecruzado, en el que cada átomo de silicio está unido a otros tres a través de átomos de oxígeno, mientras la cuarta valencia queda ocupada por el radical alquilo, por lo que el producto tendrá propiedades consolidantes e hidrófugas.
- Si se parte de un dialquildialcoxisilano resulta un polímero lineal con dos grupos orgánicos en cada átomo de silicio, por lo que tendrá solamente efecto hidrófugo.

El comportamiento de los compuestos organosilícicos se considera, en general, como muy bueno, debido a su alta penetración, a su gran duración, muy superior a la de otros polímeros orgánicos. Además la resistencia mecánica de la piedra queda mejorada y permite que esta continúe respirando, lo que posibilita, en caso de que fueran necesarios, la aplicación de tratamientos posteriores. Como inconvenientes de estos productos se pueden destacar la ligera alteración del color que pueden provocar en la piedra tras su aplicación.

Consolidantes orgánicos (polímeros sintéticos).

Aunque se pueden encontrar polímeros consolidantes orgánicos naturales, los más empleados desde la década de los sesenta como tratamientos consolidantes son los polímeros sintéticos. Prácticamente todos estos compuestos tienen, además de carácter consolidante, efecto hidrófugo, debido a su composición orgánica. Pueden aplicarse en forma de polímeros disueltos en un diluyente apropiado, o en forma de monómeros, líquidos o disueltos, que después polimericen en el interior de la piedra (Alcalde et al., 1990; Lazzarini & Tabasso, 1986).

Los grandes problemas que surgen de forma general en la consolidación con productos orgánicos son la penetración y la resistencia a la radiación solar.

La penetración de un producto líquido viene condicionada por su viscosidad; las macromoléculas de un polímero, de elevada viscosidad, tienen una penetración pequeña si no se diluyen a concentraciones muy bajas. Por otra parte, la evaporación del solvente en la superficie de la piedra provoca la migración de la solución desde el interior hacia la superficie, con el resultado de que el polímero se deposita en una zona muy estrecha (los primeros milímetros de la piedra).

Si en lugar de utilizar polímeros como producto consolidante se emplean monómeros y se polimerizan en el interior de la piedra, los problemas relacionados con la penetración se reducen considerablemente. Sin embargo surgen otros problemas debidos a las dificultades que existen para que la polimerización se produzca correctamente en el interior de la piedra.

El efecto de la radiación ultravioleta solar sobre las propiedades de un polímero depende de su intensidad y de la fuerza de los enlaces sobre los que actúa; prácticamente todos los polímeros orgánicos absorben radiación, pero las resinas epoxi se alteran con mayor rapidez y en mayor medida. Estas alteraciones se manifiestan, en general, en un cambio de coloración, pulverización, pérdida de propiedades mecánicas y, en definitiva, la eliminación de la película protectora del sustrato.

Los consolidantes orgánicos pertenecen a diferentes grupos: Ceras microcristalinas, polímeros acrílicos, resinas epoxi, resinas de estireno poliéster, etc.

### **Hidrofugación**

Un factor de gran importancia en procesos de deterioro de los materiales pétreos es la humedad. Los productos hidrófugos reducen la absorción de agua a través de la superficie de los materiales pétreos, sin afectar a su aspecto. Este tipo de tratamientos, llamados también protectores, tratan de impedir o disminuir la entrada de agua líquida en la piedra pero permitiendo la salida del agua en forma de vapor, de forma que se mantenga la “respiración” del material. Esto se consigue mediante la formación de una red de moléculas que envuelven los granos del material pero sin obturar los poros y capilares.

Las *características* que debe reunir un tratamiento hidrófugo son las siguientes. La primera y fundamental es la impermeabilidad al agua líquida, es decir, impedir la entrada de agua desde la superficie exterior, procedente de lluvia, condensación o escurrido. La segunda característica es la permeabilidad al agua vapor, de forma que si el agua consigue penetrar pueda evaporarse de la piedra y el material no permanezca mojado durante mucho tiempo. La tercera consiste en la estabilidad frente a los agentes de alteración y frente a la radiación UV. Otra característica que debe reunir un buen tratamiento hidrófugo es la reversibilidad o posibilidad de aplicar un nuevo tratamiento encima. Las dos últimas son: una buena adhesión al material para que no pueda ser eliminado por la lluvia y que tenga una suficiente profundidad de penetración. La causa de que no se requiera una penetración muy profunda del producto hidrofugante es debida a que la entrada del agua se produce principalmente por la superficie. Por ello es muy importante que la capa superficial tenga un espesor adecuado y que tenga durabilidad en el tiempo.

Entre los productos hidrófugos se pueden encontrar los organosilícicos comentados anteriormente. Por otro lado, los productos organometálicos son sales de ácidos grasos superiores y de iones metálicos, fundamentalmente sodio, potasio, magnesio, cinc y aluminio. La aplicación de estos productos puede ser en solución acuosa o en solventes orgánicos, mejorando las propiedades de hidrofugación en este último caso. Uno de los más empleados es el estearato de aluminio. Tradicionalmente se han utilizado para el tratamiento de edificios modernos, aunque es escasa su aplicación en monumentos históricos.

Los polímeros orgánicos utilizados en los tratamientos hidrófugos pueden ser del mismo tipo que los usados como consolidantes, aunque para este fin se emplean más diluidos. Además de los ya comentados anteriormente, se pueden mencionar los polímeros fluorados, cuyo uso casi exclusivo es el de hidrofugación.

## **2.4 EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS DE CONSERVACIÓN**

Los estudios de biodeterioro determinan la necesidad o no de una intervención y, en el caso de que ésta sea necesaria, permiten diseñar las estrategias de tratamiento más adecuadas.

Cuando se comprueba el impacto negativo del biodeterioro en un bien cultural, se debe considerar el uso de métodos de control de crecimiento de organismos o incluso, su eliminación. Para ello, es indispensable e incuestionable un estudio en profundidad del agente biológico y el biodeterioro que ocasiona con el fin de indicar qué tratamiento es el más adecuado en cada caso (De Los Ríos et al., 2008). Como estos productos son, en su mayoría, tóxicos, es fundamental identificar con precisión los agentes biológicos degradativos y elegir el biocida más apropiado para ellos (Polo et al., 2010; Silva et al., 2016). La aplicación incorrecta de tratamientos debido a la falta de un buen diagnóstico previo puede conducir a que solo se eliminen determinados

organismos, favoreciendo la aparición de otros más agresivos. También puede suceder que tras estos estudios, se determine que no es necesario llevar a cabo ningún tratamiento al no ser conveniente (Caneva et al., 2005), tan solo modificar aquellos factores ambientales que favorecen la colonización biológica. Sin embargo, cuando el diagnóstico indica la conveniencia de realizar un tratamiento determinado, siempre es necesario realizar estudios previos in situ y/o en el laboratorio para comprobar la eficacia y la compatibilidad del mismo.

Según Young et al., 2008, los biocidas ideales deben ser efectivos para eliminar los biodeteriogenos a largo plazo, para que conlleven un menor coste. La mayoría de éstos son solo efectivos en un periodo de entre 6 y 12 meses siendo necesaria, pues, la reaplicación de los mismos. Sin embargo, estudios realizados recientemente han puesto de manifiesto que los tratamientos con biocidas orgánicos convencionales, seguidos de la aplicación de productos de reciente formulación como las nanopartículas de dióxido de titanio ( $Ti_2O$ ), retrasan una nueva colonización debido a su alta fotorreactividad (Ruffolo et al., 2017).

Asimismo, los biocidas no deben ser tóxicos para el ser humano y el medioambiente y, por supuesto, no deben causar daño en los materiales constitutivos de los bienes culturales en tratamiento.

En las obras de arte y monumentos de naturaleza pétreo, los métodos de control químicos son los que se emplean más habitualmente. Para el caso de los materiales orgánicos (madera, cuero, papel,...), también se han realizado en el laboratorio estudios comparativos para seleccionar los productos más adecuados para el control del biodeterioro causado por microorganismos heterótrofos (Stupar et al., 2014; Unger, 2012).

#### MATERIALES ORGÁNICOS

En el caso de los materiales de naturaleza orgánica, conservados habitualmente en ambientes internos, la prevención se realiza controlando las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa, luz) y el control del biodeterioro mediante el uso de compuestos naturales o de síntesis que presentan una acción antimicrobiana. De este modo es posible ralentizar o impedir el desarrollo de muchos microorganismos capaces de deteriorar estos materiales.

Como alternativa a los productos de síntesis se han propuesto extractos naturales de plantas con actividad antifúngica (Stupar et al., 2014). Los vapores de algunos extractos de plantas (clavel, eucalipto, lavanda, etc.) han mostrado actividad fungistática y pueden ser empleados para limitar el desarrollo y la difusión de hongos celulosolíticos en librerías, archivos y bibliotecas.

Los métodos químicos propuestos para el tratamiento directo de materiales orgánicos se basan principalmente en el empleo de compuestos cuya función principal es el control del crecimiento de los microorganismos. La elección de los compuestos para tratar estos materiales va en función del tipo de ataque biológico, del tipo de material deteriorado y del nivel de alteración. En el caso de materiales de naturaleza orgánica es necesario limitar al máximo el tratamiento de la obra con sustancias químicas debido al riesgo de interferencia con los materiales durante la desinfección. La mayoría de las veces, estos bienes culturales están constituidos por muchos componentes que pueden presentar diversas reacciones químicas con los productos biocidas utilizados.

Los productos mayormente utilizados para la desinfección de los materiales orgánicos son las sustancias de amplio espectro de acción y sobre todo aquellas activas en forma gaseosa o de vapor, ya que garantizan una buena penetración del producto en los materiales. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la mayor parte de ellos, como el bromuro de metilo, el



óxido de etileno y el formaldehído (algunos ya prohibidos en diversos países), poseen un alto grado de toxicidad por lo que deben ser utilizados únicamente por personal especializado.

Un problema importante relacionado con el deterioro de las obras de naturaleza orgánica es aquel debido al ataque de insectos, por ello los biocidas mayormente utilizados son aquellos que poseen una doble acción microbicida e insecticida. Por lo que respecta a la aplicación de biocidas sobre obras de naturaleza orgánica, hay muy pocos estudios considerando la eficacia y la interferencia con el material. Por ejemplo, la actividad microbicida de algunos de estos productos como el timol o el bromuro de metilo no está comprobada (Sclocchi, 2002).

## MATERIALES PÉTREOS

El tratamiento con sustancias químicas es el método más frecuentemente empleado para la eliminación de los organismos presentes en una obra de naturaleza pétreo (Caneva et al., 2005).

Con objeto de seleccionar los biocidas más idóneos para este tipo de materiales, se han llevado a cabo numerosos estudios sobre productos comerciales para comprobar su eficacia y su posible interacción con la superficie pétreo.

La metodología de estudio aplicada puede influir bastante en los resultados, es decir, si se comparan los datos de laboratorio con los obtenidos en el exterior es muy frecuente encontrar discrepancias. Por ejemplo, los microorganismos utilizados en los ensayos de eficacia en el laboratorio son más sensibles que aquellos presentes en un *biofilm* sobre la superficie pétreo, estos últimos mucho más resistentes a la acción de los biocidas (Young et al., 2008). Los estudios de laboratorio pueden, por tanto, tener una validez limitada en relación a la actividad biocida de los productos sobre los organismos a eliminar (Skipper et al., 2016). Por otro lado, el tiempo de acción del biocida varía en relación al producto seleccionado y a los organismos que deben ser eliminados.

Otros factores que pueden influir en la eficacia de los mismos sobre los materiales pétreos son:

- el tipo de sustrato, por ejemplo la porosidad de la piedra y la presencia de algunos minerales,
- la presencia de material orgánico como polvo, polen, etc. o de contaminantes atmosféricos sobre la superficie,
- el tiempo de contacto,
- las condiciones meteorológicas: temperatura, viento, lluvia e intensidad luminosa.

Algunas de estas condiciones pueden ser simuladas en el laboratorio pero es imposible recrear un ecosistema complejo como el de una piedra colonizada expuesta a la intemperie. Los ensayos preliminares *in situ* son por tanto extremadamente útiles para estudiar la interacción biocida-microorganismo y biocida-material pétreo a corto y largo plazo.

Muchos factores pueden determinar una interacción negativa entre el biocida y el material pétreo. Los más significativos, como en el caso de la eficacia, son la naturaleza química del producto, las condiciones de empleo (concentración, método y duración de la aplicación), las características mineralógicas y petrográficas del sustrato y las condiciones ambientales.



### 2.4.1 Evaluación de la eficacia de tratamientos para erradicar el biodeterioro

#### Materiales orgánicos

Debido a que los agentes biológicos que deterioran los materiales orgánicos son principalmente hongos y bacterias, la búsqueda de productos desinfectantes en este ámbito está relacionada con las estrategias usadas en el caso de los microorganismos fitopatógenos (patógenos de las plantas) y los que causan enfermedades dermatológicas (hongos dermatofitos u hongos de la piel), que se dirigen contra estos microorganismos y no interfieren con los materiales alterados.

Por ejemplo, en el caso de los hongos fitopatógenos, algunas sustancias pueden tener efecto biocida al inhibir la síntesis de ciertos compuestos específicos de su pared celular (constituida por quitina) sin interactuar con las plantas cuya pared celular posee una estructura diferente. Al igual que las sustancias inhibidoras de la síntesis de quitina, existen sustancias específicamente activas en los procesos de síntesis de otras moléculas peculiares de los hongos, como el ergosterol, el esterol más abundante de las membranas fúngicas. Se han ensayado algunos compuestos biocidas con esta actividad (econazol, triazina, floufidina) sobre diversas cepas fúngicas que deterioran el papel. La evaluación de la eficacia del tratamiento dio como resultado que la triazina era el mejor tratamiento (Ricelli et al., 1999; Fanelli et al. 2001).

Recientemente, se han realizado estudios para seleccionar los productos más adecuados. Se están estudiando azoles (Voriconazol y Tiabendazol) y nanocompuestos (nanopartículas de óxido de cobre, nanopartículas de óxido de zinc y nanopartículas de óxido de Titanio) que, por su eficacia, están indicados para la eliminación de los hongos filamentosos y de pudrición encontrados en los materiales orgánicos que forman parte de los bienes culturales (Terzi et al., 2016).

Para su estudio, Clausen y Yang (2007) usaron una base de borato, voriconazol, tiabendazol, thujaplicin, y combinaciones de borato base con: A, 0'1% de voriconazol; B, 0'1% de tiabendazol en 70% de etanol; C, 0'5% de tujaplicina en 70% etanol. En este estudio explican que los biocidas destinados a su uso en interiores no deben ser tóxicos, ni volátiles, sino inodoros e hipoalergénicos y capaces de proporcionar una protección prolongada en condiciones de alta humedad.

Los sistemas multicomponentes funcionaron bien contra los hongos de pudrición parda (*Postia placenta* y *Gloeophyllum trabeum*) y blanca (*Coriolus versicolor*), contra tres clases de moho (*Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, y *Trichoderma viride*) y las termitas subterráneas (*Reticulitermes flavipes*). Se determinó que, para las aplicaciones en interiores, los biocidas multicomponentes pueden proteger la madera de la pudrición, del moho, y las termitas; y que los sistemas que contienen Tiabendazol proporcionan una protección más lenta que los otros biocidas en este estudio. Se observó una mejora en la aplicación conjunta de compuestos a base de boro y el voriconazol.

También se puede destacar el estudio de De Filpo et al. (2013), en el que se habla de la prevención del crecimiento de hongos en madera mediante nanopartículas de dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>). Los hongos juegan un papel considerable en el deterioro del patrimonio cultural, ya que su contaminación favorece la descomposición de los materiales empleados en obras de arte históricas. La prevención del crecimiento fúngico, el tratamiento de objetos contaminados y su posterior conservación, son actividades importantes para los restauradores. En la pasada década, se ha aplicado la nanotecnología en numerosos campos de la conservación del patrimonio cultural para prevenir, por ejemplo, la alteración química de pintura mural y la acidez del papel. Los nanomateriales aún no han sido usados como fungicidas y biocidas para los

objetos de madera. En este estudio se han tratado ocho tipos de madera diferentes, algunas de las cuales son comúnmente usadas en el campo del patrimonio cultural, con soluciones de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  y se han puesto en contacto con dos tipos de hongos, *Hypocrea* y *Mucor circinelloides*, los cuales son conocidos por ser responsables de la rápida descomposición de la madera. Los resultados muestran que la actividad fotocatalítica de las nanopartículas del  $\text{TiO}_2$  previene la colonización de los hongos de las muestras de madera durante un largo tiempo, en comparación con las maderas no tratadas.

En otro estudio de Shabir Mahr et al. (2013) se ha investigado la protección de la madera contra hongos de pudrición parda por impregnación con  $\text{TiO}_2$ . La resistencia a la descomposición del pino tratado con soluciones de  $\text{TiO}_2$  fue probada con el hongo *Coniophora puteana* y *Poria placenta* con unas exposiciones de 10 a 16 semanas. En el ensayo las muestras de madera fueron impregnadas con soluciones de  $\text{TiO}_2$  con concentraciones de entre 5 al 16% (p/p) y posteriormente tratadas bajo distintas condiciones de humedad.

Los resultados muestran que la madera tratada en comparación con la no tratada se ha deteriorado un 38% y 50% menos respectivamente contra ambos tipos de hongos. La mayor protección se consiguió con una disolución de  $\text{TiO}_2$  al 5%. Con el aumento de la concentración, la resistencia fungicida disminuye levemente, lo que se refleja con más fisuras e imperfecciones formadas en las capas que contienen dióxido de titanio en la matriz de la madera.

Con respecto a las nanopartículas de zinc y cobre, existen algunas investigaciones sobre el efecto de soluciones y suspensiones a base de nanopartículas de cobre y zinc, con o sin la adición de algún tipo de surfactante, orientadas a proteger la madera de microorganismos, insectos xilófagos y el desgaste por condiciones ambientales naturales.

Goddio et al., (2013) desarrollaron un preservante nanoformulado a base de óxidos de cinc y cobre y evaluaron la capacidad de protección de maderas de pino. El Zn actúa como inhibidor de la colonización fúngica, mientras que el Cu permite preservar las maderas de organismos más complejos, como las termitas.

En el estudio de Kartal et al. (2015) se trata la biorremediación y descomposición de la madera con tres conservantes a base de cobre: cobre alcalino cuaternario en base acuosa, nano óxido de cobre, y arseniato cromato de cobre. La pudrición por hongos de la madera se estudió en relación a la cantidad de cobre aplicado inicialmente, y también la cantidad eliminada en las pruebas de biorremediación de hongos.

Otro estudio sobre maderas es el de Koziróg et al. (2014), centrado en el primer campo de concentración de Auschwitz, el cual está bajo el cuidado del museo estatal de Auschwitz Birknay en Oswiecim, Polonia. Consta de edificios históricos y objetos conmemorando los trágicos eventos de la segunda guerra mundial, incluyendo cuarteles de madera además de otros elementos: puentes, puertas, suelos, cabañas, marcos de puertas y ventanas, muros estructurales y vigas, los cuales, tras exponerse a condiciones climatológicas variables, pueden sufrir biodegradación. El objetivo del estudio era determinar la invasión de las superficies de madera por distintos organismos e identificar las especies dominantes. El cómputo total de bacterias en las superficies de madera era alto, siendo *Bacillus* sp. la especie más dominante, mientras la cantidad de hongos estaba en un rango menor, siendo los más comunes *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. y *Penicillium* sp. En la madera de las cabañas y suelos se identificó ataque de hongos como *Poria vaporaria* y *Serpula lacrymans*. La identificación de los organismos hace posible la selección de los biocidas adecuados para proteger objetos históricos contra el proceso natural de la biodegradación gradual.

Salem et al. (2016) utilizan dos aceites esenciales como tratamiento antifúngico en tres maderas comerciales (*Pinus sylvestries*, *Pinus rigida* y *Fagus sylvatica*) deterioradas por cinco hongos de moho comunes. Se han usado aceites esenciales de *P. rigida* y *Eucalyptus camaldulensis*, aplicándolos con el método de vapor y después se midió la inhibición del crecimiento del moho, siendo completa contra el crecimiento de *A. alternata*, *F. subglutinans*, *C. globosum* y *A. niger* excepto a *T. viride* en la aplicación de *P. rigida*. Se concluyó buena inhibición contra *C. globosum* a 5000 ppm y 156.25 ppm, ninguna inhibición contra *A. niger* y *T. viride* y poca inhibición contra *F. subglutinans*.

En Monroy et al. (2011) se estudian los efectos de pretratamientos biológicos en *Pinus radiata* y *Eucalyptus globulus*, los cuales se evaluaron después de exponerse a dos hongos de pudrición parda, *Gloeophyllum trabeum* y *Laetoporeus sulphureus*, además del análisis de los cambios en la composición química, modificaciones estructurales y susceptibilidad a la degeneración de la madera.

### **Materiales Pétreos**

La efectividad de los biocidas sobre las distintas especies de organismos ha sido ampliamente estudiada. Los métodos más utilizados para probar los efectos de los biocidas han sido los que se basan en la detección de cambios en las propiedades cromáticas y/o físico-químicas de la superficie del material o mediante la identificación de la actividad de los microorganismos que lo colonizan, la cual tras la aplicación de los tratamientos, se supone menor (Monte y Nichi, 1997; Prieto et al., 2004; Tretiach et al., 2007, 2010; Sanmartín et al., 2010).

En general, la biomasa algal puede estimarse utilizando técnicas de cuantificación de la clorofila *a* basado en la extracción del fotopigmento de las células o mediante la detección de su fluorescencia natural (Tomaselli et al., 2002), la cual, al no necesitarse muestreo, resulta útil para detectar microorganismos fototrófos y monitorizar tratamientos preventivos (Eyssautier-Chuine et al., 2015; Urzi et al., 2016).

Actualmente, la cuantificación y monitorización de biopelículas superficiales puede también llevarse a cabo mediante técnicas de análisis digital de imágenes (DIA), que se basan en el carácter matricial de las imágenes digitales (Rogerio-Candelera et al., 2012).

Además, para el estudio de la efectividad biocida, también se ha extendido la técnica de microscopía electrónica de barrido en el modo de electrones retrodispersados, SEM-BSE, la cual permite la evaluación de los efectos del tratamiento en organismos fotosintéticos o no fotosintéticos, tanto dentro del sustrato como en la superficie del mismo (Ascaso et al., 2002; Cámara et al., 2011).

Los biocidas empleados en este trabajo han sido extensamente estudiados. La efectividad comparativa de los biocidas como el Biotin T y Biotin R, ampliamente empleados en restauración-conservación, ha sido analizada (de los Ríos, et al. 2012) al eliminar líquenes y cianobacterias de la Catedral de Segovia (España). Ambos tratamientos resultaron eficaces erradicando los líquenes y cianobacterias epilíticos pero mostraron diferentes efectos en los organismos endolíticos.

El Biotin T resultó ser un buen limpiador de la superficie pétreo, la cual quedó prácticamente libre de restos de líquenes, pero se detectó la presencia de hifas fúngicas en las fisuras de la piedra transcurridos dos meses de la aplicación del tratamiento. Por su parte, el Biotin R dejó restos de líquenes superficiales, pero era mejor eliminando las hifas que penetran en la piedra, así como las cianobacterias endolíticas.

En el estudio del monasterio de San Jerónimo (Lisboa) llevado a cabo por Ascaso y de los Ríos, 2005, se aplicó Preventol Ri80, resultando responsable de la plasmólisis y pérdida de estructura celular de cianobacterias, y confirmando así su capacidad biocida.

Para la evaluación del efecto real de los tratamientos sobre la fisiología de los organismos sin extraerlos del material que colonizan, en varios intervalos de tiempo, se recurre al uso de técnicas como la microscopía óptica (OM) y la microscopía láser confocal (CSLM), que permiten valorar la vitalidad de los microorganismos tras los tratamientos; mientras que con la microscopía electrónica de barrido (SEM-BSE), se obtienen imágenes claras de los efectos de los biocidas sobre las células. Por último, la microscopía electrónica de transmisión (TEM) permite conocer detalles precisos sobre la acción concreta de los productos en la ultraestructura celular. Los biocidas de mayor efectividad son aquellos que producen el colapsamiento celular y la pérdida de estructura interna (De los Ríos, 2008).

La estimación de la eficacia de los tratamientos elegidos permite aplicar en los bienes culturales los productos más indicados para el control o la eliminación de la colonización de los organismos causantes del biodeterioro diagnosticado.

#### **2.4.2 Evaluación de la compatibilidad de los tratamientos**

Como ya se ha indicado, la efectividad de los biocidas ha sido ampliamente estudiada pero no así el efecto que estos productos generan sobre los materiales sobre los que se aplican. Estos estudios (Nugari et al., 1993; Sameño et al., 1996) son fundamentales, ya que sería completamente desaconsejable aplicar un biocida que dañara los materiales constitutivos de los Bienes Culturales aunque tuviera una alta eficacia en la eliminación de organismos. Esto justifica que uno de los objetivos de este trabajo sea determinar el efecto que los tratamientos biocidas ocasionan sobre los materiales, utilizando diversos ensayos y métodos de aplicación de los productos.

En el caso del estudio de posibles interferencias de los tratamientos con los materiales que constituyen los bienes en estudio, el objetivo es verificar el efecto de estos productos biocidas utilizando diversos ensayos y métodos de aplicación. Las características de estos materiales se determinan antes y después del tratamiento biocida: absorción de agua por capilaridad, alteración cromática, ensayos de alteración acelerada, observación mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM-EDS), etc.

Con respecto a la compatibilidad de estos productos biocidas con otros tratamientos de conservación (consolidantes e hidrófugos) hay muy pocos estudios realizados.

Por ejemplo, hay distintos estudios sobre el efecto conjunto de consolidantes y biocidas en los que se analizan la protección de la madera contra el moho, la pudrición o las termitas, es decir, contra hongos e insectos. Pero también en otros se investiga sobre la compatibilidad de estos productos con el sustrato y con ellos mismos. Los productos ensayados en todos estos estudios son distintos.

Mansour y Salem (2015) han investigado la inhibición *in vitro* del crecimiento del hongo *Tricoderma harzanium* con diferentes extractos metanólicos de especies de árboles seleccionados. Han observado el crecimiento de hifas mediante el microscopio electrónico ambiental (ESEM) y han evaluado los cambios en la composición elemental mediante espectroscopía dispersiva de rayos X. Extractos metanólicos del duramen de *Morus alba* y de la corteza de *Macluas pomifera* tenían efectos significativos en el crecimiento lineal de *T. harzanium*. Las muestras de madera de *Acacia saligna* tratadas con extracto metanólico de

madera de *Cupressus sempervirens* mostraron una zona de inhibición del crecimiento de *T. harzanium* alrededor de maderas tratadas a concentraciones de 5, 10 y 20%. Sin embargo, los análisis efectuados al SEM-EDX de la madera tratada demostraron que la combinación de Paraloid B-72 y extracto metanólico de madera de *C. sempervirens*, podría usarse como un potente biocida contra el hongo *T. harzanium*.

En el estudio de Clausi et al., (2011), se analiza la acción protectora contra el crecimiento fúngico de dos productos consolidantes, ambos aplicados a la madera. Se examinaron los efectos producidos por los hongos de pudrición blanca y pudrición parda en madera y se trataron con dos consolidantes, Paraloid B-72 y Regalrez 1126, aplicados individualmente y juntos. El objetivo de este estudio era evaluar los diferentes niveles de penetración y localización en la madera, pero sobre todo comprobar si estos productos, muy usados en restauración, actuaban contra el crecimiento del hongo en maderas o incrementaban el ataque biológico. Se observaron cambios tanto morfológicos como químicos provocados por la colonización biológica del hongo y se comprobó la eficacia de protección. Numerosas muestras de madera tratadas con los productos descritos se dispusieron en placas de Petri con medio de cultivo y se inocularon con dos especies de hongos, *Fomitopsis palustris* y *Trametes versicolor*, observándose el crecimiento durante dos meses. Los resultados de las muestras de madera de *Norway spruce*, el pino nórdico, mostraron un desarrollo selectivo de una de las dos pudriciones debido a la aplicación del producto: ambos productos aplicados a la vez causan una disminución del crecimiento de ambas especies de hongos. Las muestras de *T. versicolor* tratadas con los consolidantes, tanto separados como juntos, muestran un comportamiento similar. También se llevó a cabo un análisis mediante el microscopio electrónico de barrido (SEM) para observar cambios en la microestructura de la madera.

La descontaminación y la desconsolidación de los conservantes históricos de la madera y los consolidantes en el patrimonio cultural se tratan en el artículo de Unger (2012), en el que se puede leer que en el pasado, los objetos de madera eran tratados con una variedad de conservantes de la madera formulados con una base de biocidas inorgánicos y orgánicos. La mayoría de estos biocidas son altamente tóxicos para el ser humano y contaminan el medio ambiente, algunos de ellos incluso causan daños a los objetos que debían conservar. Esto supone un considerable reto para manejar la exhibición, almacenaje y restauración de dichas obras de arte de madera. Además, el biocida contenido en los elementos estructurales de madera en edificios históricos, contamina el aire en su interior y representa un riesgo constante para la salud. Los objetos de madera dañados anteriormente por organismos y, preservados y consolidados con mezclas de aceite vegetal y resinas naturales, ahora muestran una nueva alteración. Una condición importante para volver a tratar dichos objetos es la identificación exacta de las sustancias utilizadas originalmente para su conservación.

Las medidas no destructivas realizadas *in situ*, tienen prioridad por encima de los métodos analíticos. Los distintos procesos de descontaminación usados actualmente son clasificados en función de su modo de operación. Incluyen limpiezas mecánicas, desorción térmica, lavados con agua y desintoxicantes, y lavados y extracciones con líquidos o dióxido de carbono. La aplicación de varios selladores para prevenir la evaporación del biocida en el aire del interior de los inmuebles se limita a los elementos estructurales de madera.

Henriques et al. (2014), estudian la consolidación de madera tratada con conservante. Cuando los elementos de madera en edificios patrimoniales están deteriorados por hongos, una vez que los problemas de humedad en las capas inferiores han sido resueltos, se pueden llevar a cabo dos acciones: usar biocidas para frenar la actividad del hongo o identificar los elementos deteriorados y reemplazarlos. El objetivo de este trabajo era investigar el rendimiento mecánico

de la madera de pino marítimo deteriorado por hongos una vez que ha sido tratado con biocidas seguido por la impregnación con productos consolidantes.

Se utilizaron tres productos disponibles comercialmente: un biocida con base acuosa, un consolidante acrílico y un consolidante epoxídico. Las especies tratadas y conservadas se expusieron a ensayos mecánicos: compresión axial, dureza superficial estática y resistencia a flexión. Un conjunto de réplicas se sometieron a un ensayo de evaporación después de la aplicación del producto y también un ensayo para estudiar su comportamiento mecánico. Se observó un aumento de la resistencia mecánica con ambos consolidantes sin influencia significativa de los productos biocidas anteriores. Estas especies sometidas a envejecimiento mostraron una pequeña mejora general en su rendimiento mecánico.

Por otro lado, con respecto a la compatibilidad de los productos biocidas con los materiales pictóricos, Nugari et al. (2009), realizaron un estudio sobre evaluación de biocidas en la pinturas murales de la Cripta del Pecado Original (Matera, Italia). Ensayaron los productos Umonium 38, Preventol R80 y Rocima 110 contra algas y cianobacterias.

## **BLOQUE II. METODOLOGÍA DE TRABAJO**





Este bloque recoge la metodología general que se ha empleado en todos los casos en estudio. El bloque siguiente se ha estructurado en capítulos para tratar cada caso de estudio con identidad propia y para presentar sus resultados de una manera más clara y comprensible. Por último, un apartado final abarca las conclusiones extraídas de todo el proceso de investigación.

En concreto, aquí se describe la metodología llevada a cabo en los estudios de biodeterioro y en la evaluación de los tratamientos biocidas aplicados a los distintos materiales constituyentes de los bienes culturales objeto de estudio. En el bloque experimental, cada capítulo, que corresponde a un caso de estudio concreto, recoge la metodología empleada de forma más detallada y específica para ese bien.

Se han realizado estos estudios en cuatro bienes culturales de Andalucía, en Sevilla, Córdoba y Granada:

- Portada de la iglesia del monasterio de Santa Paula (Sevilla)
- Atauriques del Salón Rico de *Abd Al-Rahman III* del conjunto arqueológico de Medina Azahara (Córdoba)
- Pinturas de la Sala de los Reyes de la Alhambra (Granada)
- *Maqsura* de la Mezquita de Córdoba

En cada ámbito de estudio se ha realizado una primera fase de identificación de especies biológicas presentes, concretamente plantas superiores, briofitos, líquenes y microorganismos como hongos, algas y cianobacterias. Para ello, se han usado diversas técnicas y métodos de análisis como la inspección visual, la microscopía estereoscópica, la microscopía óptica y la microscopía electrónica de barrido, reacciones de tinción con potasa (KOH), técnicas de cultivo y técnicas de biología molecular (PCR, reacción en cadena de la polimerasa).

Una vez identificados los agentes biológicos con la máxima exactitud posible, intentando determinar la especie o en su defecto la familia taxonómica a la que pertenece, se han realizado diversos ensayos con productos biocidas sobre los materiales constitutivos de estos bienes culturales. Estos estudios se pueden englobar en dos líneas de investigación:

Por una parte, se han llevado a cabo diversos estudios comparativos para comprobar la eficacia de diversos biocidas al aplicar estos productos sobre los organismos biológicos localizados en estos bienes inmuebles. Para ello, se ha estudiado la vitalidad de los microorganismos fotótrofos al microscopio óptico, la interfase de estructuras liquénicas con el sustrato mediante observación al microscopio electrónico de barrido, la estimación de biomasa fotosintética por espectrofotometría ultravioleta-visible o la capacidad de eliminación o reducción del crecimiento de especies de hongos filamentosos y de pudrición.

Por otra parte, se han realizado ensayos para analizar la interacción o interferencia que estos productos biocidas presentan con los materiales constitutivos de cada monumento y/o con otros tratamientos. Para ello, tras la aplicación de los biocidas, se han observado los materiales al microscopio electrónico de barrido (SEM) y se ha efectuado microanálisis elemental mediante EDX (energía dispersiva de RX). Además, cuando ha sido posible, se han realizado ensayos de colorimetría y de medida de porosidad abierta para comprobar si estos productos afectan de alguna manera al color y a la porosidad de los materiales, una de las características fundamentales de los materiales de construcción. Por otro lado, en el caso de la madera, también se han medido la velocidad de ultrasonido y la dureza superficial y se han efectuado ensayos de alteración acelerada.

A continuación, se recogen brevemente las distintas técnicas empleadas a lo largo de la investigación, la metodología general de los distintos estudios de materiales, de los distintos estudios de biodeterioro (sobre todo en lo que respecta a la determinación de especies) y la metodología empleada para la evaluación de tratamientos biocidas.

## **1. TÉCNICAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO**

### **1.1 MICROSCOPIA ESTEREOSCÓPICA**

El microscopio estereoscópico, también llamado lupa binocular, se utiliza para obtener una imagen estereoscópica o tridimensional de la muestra. En él, mediante dos objetivos separados, se forman dos imágenes que son enviadas separadamente a dos oculares. Con ello se obtiene una doble imagen que se mezcla en nuestro cerebro como una sola imagen estereoscópica. Se obtiene una imagen más tridimensional del objeto y, por tanto, más real.

El principal funcionamiento del microscopio estereoscópico no está basado, como en el microscopio óptico, en el poder de resolución sino en su capacidad directa de aumento. Estos microscopios están dotados de un sistema que permite observar la muestra en un rango de aumentos variable, siempre menor que el de un microscopio compuesto. Las lentes objetivos se encuentran montadas en el interior de un revólver tubular y se caracterizan por tener un bajo poder de aumento (2x o 4x), mientras que el de las lentes oculares oscila de 5x a 10x, lo que proporciona un aumento potencial total entre 10x y 40x.

El microscopio estereoscópico es apropiado para observar objetos de tamaño relativamente grande, por lo que no es necesario modificar los objetos a analizar ni tampoco que la luz pase a través de la muestra. Este tipo de microscopios permite unas distancias desde la muestra al objetivo que van desde un par de centímetros a decenas de ellos, lo que los hace muy útiles en campos como el de la botánica y la mineralogía, entre otros (González Alfaro et al., 2004).

El instrumento utilizado en el estudio es de la marca Leica, modelo GZ6, con fuente de luz marca Leica CLS 100x.

### **1.2 MICROSCOPIA ÓPTICA DE LUZ TRANSMITIDA Y REFLEJADA (MO) Y MICROSCOPIA ÓPTICA DE POLARIZACIÓN (MOP)**

El microscopio óptico consta de una fuente de iluminación eléctrica que atraviesa las muestras desde abajo (luz transmitida) o incide sobre ellas (luz reflejada), un sistema de lentes, una platina sobre la que se coloca el objeto a analizar, los objetivos y los oculares. El aumento corriente de los objetivos es de 4x, 10x, 20x y 40x. Sin embargo, se aumenta todavía más por acción del ocular (que es de 10x normalmente), por lo que al final se obtiene un aumento de 40x, 100x, 200x y 400x (Welsch y Sobotta, 2009). Con estos microscopios se estudian los materiales y además se puede reconocer la morfología y estructura celular de cada grupo de organismos. Los microscopios ópticos empleados son Leica Laborlux 12 ME-ST y Leica DM 4000 M.

Para el estudio de los materiales pétreos se utiliza la microscopía óptica de luz polarizada o microscopía petrográfica.

Los microscopios de luz polarizada son microscopios a los que se les han añadido dos polarizadores (uno entre el condensador y la muestra y el otro entre la muestra y el observador), el material que se usa para ello es un cristal de cuarzo y un cristal de Nicol dejando pasar únicamente la luz que vibra en un único plano (luz polarizada). Esto permite identificar minerales

mayoritarios y minoritarios mediante sus propiedades ópticas, y además mediante esta técnica se puede realizar un estudio petrográfico textural, analizando en detalle la naturaleza de los elementos que constituyen los materiales, las formas y tamaños (absolutos y relativos) de dichos elementos, las relaciones mutuas entre ellos y sus abundancias relativas. El estudio se ha realizado con un microscopio petrográfico LEICA DMLP del laboratorio de Geología del IAPH, con objetivos de 2,5x, 5x, 10x, 20x y 63x, el cual lleva acoplado una videocámara para la captura de imágenes.

### **1.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) Y MICROANÁLISIS ELEMENTAL MEDIANTE ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X (EDX)**

Esta técnica consiste en hacer incidir sobre la muestra un haz de electrones acelerados por una diferencia de potencial de miles de voltios en un tubo, en el cual se hace el vacío. En el tubo hay unas lentes electromagnéticas que focalizan el haz que incide sobre la muestra en forma de barrido. Para ello la muestra tiene que ser previamente metalizada con oro o bien con grafito, para que sea conductora. La imagen se forma cuando se produce el choque de los electrones con la muestra.

La microscopía electrónica de barrido permite la observación tridimensional de las células o de las superficies de los geomateriales y es muy útil para el estudio de diversos mecanismos responsables de la alteración de la piedra (Sameño Puerto et al., 1996):

- Formación y crecimiento de cristales en la superficie tras el tratamiento biocida.
- Corrosión, lavado o disolución de constituyentes minerales como consecuencia de las soluciones ácidas.
- Crecimiento sobre el material de organismos y microorganismos con las consecuencias fisicoquímicas que ello conlleva.

Para poder ser analizadas, las muestras deben cumplir el requisito de ser conductoras, por este motivo se metalizaron con carbón (Evaporador de alto vacío Baltec CEA035). Las muestras se metalizan también con oro mediante deposición por *sputtering*.

El proceso de pulverización catódica o *sputtering* es, principalmente, un proceso de bombardeo iónico que consigue la deposición en fase de vapor sobre un sustrato (en este caso la muestra), del material bombardeado. De esta forma se depositan películas de metales puros o aleaciones utilizando descargas de gases nobles (Ar).

Las muestras biológicas para su observación al SEM, además de ser conductoras, deben estar completamente secas ya que de otro modo la baja presión en el microscopio electrónico causará que el agua (y otros líquidos volátiles) se evapore saliendo violentamente del espécimen, alterando la estructura del mismo. Para evitar estos efectos dañinos, durante el proceso de secado, debe pasarse el límite entre la fase "líquido-gas". En el método del punto crítico (Prin et al., 2012), el líquido pasa directamente a fase gas. De este modo, las fuerzas de deformación se evitan debido a que el proceso de secado tiene lugar por encima del punto crítico del líquido, donde el límite entre la fase líquida y la fase gas no existe.

Para ello, en este estudio, las muestras se fijaron en una solución de glutaraldehído al 1% en tampón fosfato 0,01M. Después, se realizó una postfijación en tetraóxido de osmio (1%) y, posteriormente, las muestras se deshidrataron en una serie graduada de etanol (30-70%), se sumergieron en acetona (70-100%) y se secaron en el secador de punto crítico. En el secador de punto crítico se incrementa la temperatura hasta que en la muestra se alcance una temperatura y presión crítica, en la cual la densidad de la fase líquida sea igual a la de la fase gaseosa, por lo

cual la tensión superficial es cero y la ultraestructura se mantiene en el estado seco. Este es el punto en que la densidad del fluido es igual en cualquier punto del volumen que ocupa dentro de la muestra (Prin et al., 2012). Una vez culminado este proceso la muestra se prepara para que sea conductora y pueda ser analizada en el microscopio electrónico.

El microscopio electrónico de barrido tiene dos modos de trabajo: detector de electrones secundarios que trabaja con electrones secundarios de baja energía y ofrece las imágenes de mayor resolución. Es muy sensible a las características superficiales de la muestra, de ahí que proporcionen información de la topografía de la muestra. El detector de electrones retrodispersados permite obtener señal de retrodispersados pura a muy bajo potencial de aceleración. Los electrones retrodispersados al chocar con la muestra pierden parte de la energía que tenían inicialmente. Esta pérdida está relacionada con la masa de los átomos contra los que chocan. En la imagen que se forma en este caso, la escala de grises está en función del número atómico medio de las distintas partes que componen la muestra. Las partes más brillantes de la imagen se corresponde con átomos de elevado peso atómico, mientras que en las zonas de la imagen que son más oscuras, los átomos presentan un peso atómico más ligero, por lo que este modo de trabajo proporciona información composicional de la muestra.

Cuando se produce el choque de los electrones con la muestra también se producen rayos X característicos de cada elemento. Si se incorpora un analizador de rayos X, se obtiene información importante de los elementos químicos existentes a partir del sodio, número atómico 11, ya que los elementos ligeros no son detectados. La técnica se hace más sensible conforme aumenta el número atómico del elemento. Este dispositivo recibe el nombre de microsonda acoplada a SEM (EDX, energía dispersiva de rayos X).

En este caso, el microscopio electrónico de barrido empleado ha sido SEM JEOL modelo JSM-5600 LV, dotado con un analizador de espectrometría de energías dispersivas de rayos X modelo *INCA X-sight*, de instrumentos Oxford (Figura II.1).

El equipo emplea un *hardware* especializado de microscopía electrónica de barrido y las imágenes y espectros obtenidos se visualizan mediante el software informático *INCA Microanalysis Suite*.

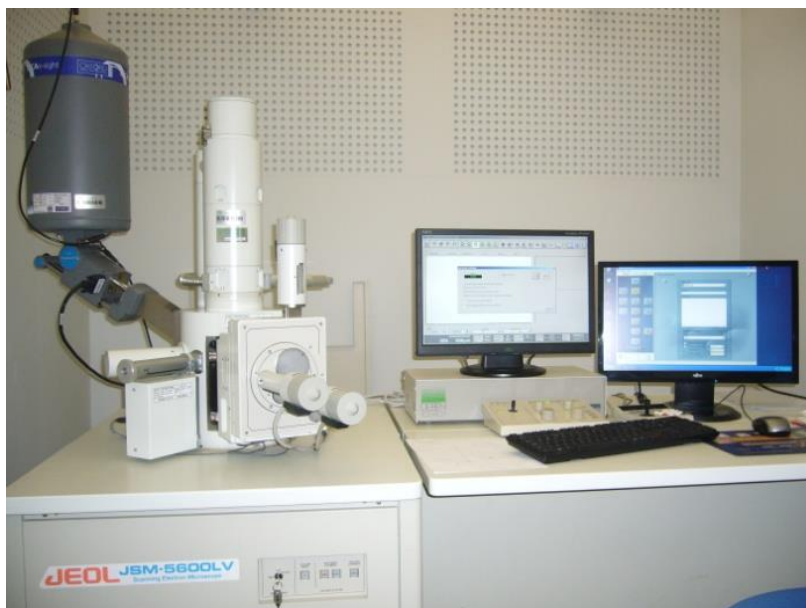


Figura II.1. Microscopio electrónico de barrido (SEM).

#### 1.4 DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)

La DRX es una técnica que permite la identificación de los compuestos cristalinos (minerales) presentes en la muestra en estudio. Para ello, la muestra se tritura hasta obtener un polvo muy fino sobre el que se hace incidir un haz de rayos X, obteniéndose finalmente un diagrama con las reflexiones a ángulos concretos (característicos de los espaciados interatómicos de cada mineral), comúnmente denominado “difractograma”. Esta técnica facilita el conocimiento cualitativo de la composición mineralógica del total de la muestra. La intensidad de los picos diagnóstico de cada mineral es proporcional a la cantidad de ese mineral en la muestra, pudiéndose realizar una estimación semicuantitativa de los minerales mayoritarios (error posible  $\pm 5\%$ ). En el estudio se ha empleado un Difractómetro marca BRUKER D8 Advance perteneciente al Laboratorio de Rayos X del CITIUS de Sevilla. El análisis semicuantitativo de las distintas fases minerales se hizo con la ayuda del programa *Xpowder*.

#### 1.5 ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) Y CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)

Para el análisis de compuestos orgánicos presentes en los materiales pictóricos se utilizan, fundamentalmente, la técnica de la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier y la cromatografía de gases.

La espectroscopía IR por transformada de Fourier (FT-IR) es una técnica instrumental que permite, fundamentalmente, la identificación de materiales orgánicos. Se aplica al análisis de adhesivos, consolidantes, aglutinantes, barnices y colorantes. También se aplica en algunos casos al análisis de algunos materiales inorgánicos, como es el caso de la determinación de sulfatos, carbonatos, silicatos, nitratos y oxalatos. En este estudio se ha empleado para confirmar los componentes inorgánicos así como una aproximación de la existencia de la fracción orgánica y su naturaleza (lipídica, proteica e hidratos de carbono). Los análisis se llevan a cabo entre  $4400\text{ cm}^{-1}$  y  $370\text{ cm}^{-1}$ , englobando la muestra en pastillas de KBr o mediante análisis superficial usando la técnica UATR (*Universal Attenuated Total Reflectance*)

La cromatografía en fase gaseosa (GC) es una técnica de separación entre dos fases, en la que la fase móvil es un gas, denominado gas portador. Las muestras a separar son gases o líquidos fácilmente volatilizables. Dependiendo del tipo de sustancia a analizar se utilizan distintos procedimientos. Para la determinación de sustancias lipófilas las muestras se tratan con el reactivo de metilación Meth-prep II. Para los hidratos de carbono y las proteínas se lleva a cabo una hidrólisis con HCl 6M y una derivatización con N-metil-N-t-butildimetilsililtrifluoroacetamida (MTBSTFA) en piridina de los ácidos grasos, aminoácidos y monosacáridos resultantes (Parra Crego & García Gómez, 2005).

#### 1.6 REACCIÓN DE TINCIÓN CON HIDRÓXIDO DE POTASIO (KOH)

Los colorantes son compuestos químicos que tienen alguna afinidad específica por los materiales celulares (<http://www.microinmuno.gb.fcen.uba.ar/SeminarioTinciones.htm>). Muchos colorantes utilizados con frecuencia son moléculas cargadas positivamente (cationes) que se combinan con intensidad con los constituyentes celulares cargados negativamente, tales como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos. Otros son aniones y se combinan con los constituyentes celulares cargados positivamente como, por ejemplo, proteínas.

La solución de hidróxido de potasio al 10% (solución de KOH) permite identificar líquenes ya que al aplicarse en el talo o en los apotecios, estos toman una coloración diferente a la original que puede ser de gran utilidad a la hora de la identificación de especies (Ozenda y Clauzade, 1970).

### 1.7 TÉCNICAS DE CULTIVO. CRECIMIENTO BIOLÓGICO EN LABORATORIO.

La idea de un medio de cultivo es ofrecer a los microorganismos las condiciones más parecidas a su medio natural para que crezcan. Una vez que se toma la muestra biológica, ésta se extiende mediante un instrumento, asa de siembra, sobre una placa de Petri con el medio de cultivo adecuado para el crecimiento de las colonias microbianas.

Existen los medios generales, si llevan todos los nutrientes para que crezcan varios tipos de organismos generalistas; diferenciales, aquellos empleados para dejar crecer exclusivamente a un tipo de células y los medios selectivos, los que permiten el crecimiento de varias especies, pero permitiendo diferenciar las colonias.

Hay muchas recetas de medios de cultivos para el crecimiento y mantenimiento de cianobacterias, microalgas y hongos en laboratorio. A la hora de elaborarlos hay que tener en cuenta los siguientes aspectos (Leganés y Bolaños, 2015):

- La concentración total de sal, que depende del origen ecológico del organismo.
- La composición y concentración de los componentes iónicos mayoritarios tales como el K, Mg, Na, Ca, sulfato y fosfato.
- La disponibilidad de nitrógeno. Las fuentes de nitrógeno más utilizadas son: nitrato, amonio o urea. En el caso de cianobacterias fijadoras de nitrógeno no es necesaria la presencia de estas fuentes.
- El carbono. La fuente de carbono más frecuentemente utilizada es el CO<sub>2</sub> gaseoso. Otras fuentes son el bicarbonato o el carbonato.
- El pH.
- Los elementos traza. Para la estabilidad de la mezcla de estos elementos se utilizan agentes quelantes, tales como el citrato y el AEDT.
- Las vitaminas, sobre todo para las algas.
- La calidad del agua. Esta ha de ser desionizada y los compuestos orgánicos retirados por doble destilación o filtrada a través de purificadores Millipore SuperQ (o similares).

Para facilitar el crecimiento y el aislamiento de los microorganismos se han utilizado medios de cultivo generalistas que cubren los requerimientos nutricionales de la mayor parte de los microorganismos. En este trabajo se han empleado los medios Agar Glucosa Saboraud (AGS) y Agar Extracto de Malta (AEM) para los microorganismos heterótrofos (bacterias y hongos); el medio BG11, específico de cianobacterias (Rippka, 1979) y los medios Allen-Arnon y TAP NO<sub>3</sub><sup>-</sup> más específicos de algas (<http://microbiology.ucdavis.edu/meeks/allenarnon.htm>) (González-Ballester, 2005).

Los medios AGS y AEM, se emplean para cultivar microorganismos heterótrofos. Proveen el carbono, proteínas y nutrientes requeridos para el crecimiento de microorganismos. El AGS es un medio de cultivo que por sus características funciona como medio de enriquecimiento para hongos y que, en caso de contener cloranfenicol u otro antibiótico, se convierte en un medio selectivo para los mismos. El medio contiene peptonas y una elevada concentración de glucosa que favorece el crecimiento de los hongos sobre las bacterias. El AEM se utiliza para el aislamiento, cultivo y enumeración de levaduras y hongos, ya que contiene una alta concentración de maltosa y otros sacáridos como fuentes de energía.

El medio BG-11 permite el crecimiento de una gran variedad de cianobacterias de suelo y agua dulce. Este medio utiliza concentraciones de nitrato muy altas y concentraciones de fósforo relativamente bajas.



El medio Allen y Arnon contiene altas concentraciones de nitratos (sal sódica y potásica) y muy altas concentraciones de fósforo. Este medio se ha diseñado para conseguir altos rendimientos celulares (Elosegui y Sabater, 2009). El medio TAP  $\text{NO}_3^-$  (tris-acetato-fosfato) es igualmente rico en fosfatos.

Para la preparación de medios sólidos se usa el agar, polímero de subunidades de galactosa (agarpectina y agarosa), ligeramente ácido y que puede bajar el pH de los medios de cultivo, por lo cual es aconsejable el uso de tampones orgánicos como el HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2-etanosulfónico) a pH entre 7-8. Aunque pueden necesitarse otros valores de pH y otros tampones dependiendo del hábitat natural del microorganismo a aislar.

La manipulación de los cultivos (siembras, resiembras, aislamiento, limpieza de cultivos, etc.) así como la preparación de los medios de cultivos se han de realizar siempre en ambientes estériles para evitar las contaminaciones por parte de bacterias o eucariotas.

### 1.8 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Las técnicas de biología molecular empleadas en el Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico se basan en la detección del ácido desoxirribonucleico (ADN) de los microorganismos y, especialmente, aquéllos que por sus características intrínsecas no pueden ser fácilmente cultivados en el laboratorio. Cada microorganismo tiene secuencias únicas en su ADN, lo que permite diferenciarlos dentro de una comunidad microbiana compleja, como puede ser el caso de una colonización microbiana en un determinado material.

Para la detección e identificación de microorganismos se ha desarrollado un método basado en técnicas de Biología Molecular, concretamente, en la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Este método incluye varias etapas (Pérez Castiñeira, 2010; Saiz Jiménez y Videla, 2002; Sarró et al., 2006), tales como:

- Extracción de ADN.
- Amplificación por PCR de una secuencia diana.
- Secuenciación (determinación de la secuencia de bases) del ADN amplificado.
- Análisis de la secuencia.



Figura II.2. Proceso de extracción de ADN de microorganismos fotótrofos.

❖ Extracción de ADN

El método de extracción de ADN (Figura II.2) tiene que ser lo suficientemente agresivo para romper las células y/o tejidos, pero lo suficientemente delicado como para preservar la molécula de interés (ADN). Se realiza por medios físicos (molienda en morteros, perlas de vidrio...) y/o químicos (uso de detergentes como el SDS, dodecilsulfato sódico) (Baridon, 2012).

Para la extracción de ADN de cianobacterias y algas verdes se añadieron a las muestras (resuspendidas en tampón TE) perlas de vidrio estériles de 0,25 mm de diámetro, SDS al 10% y fenol-cloroformo (1:1). Después se sometieron a agitación en vórtex y centrifugado para extraer el sobrenadante que contiene el ADN.

Por otro lado, se extrajo el ADN de bacterias y hongos a partir de las colonias obtenidas en cultivos puros, realizados previamente en placa, usando el kit comercial de extracción *ZymoResearchFungal/Bacterial DNA*, siguiendo el protocolo del fabricante. Se obtuvo así una solución de 100 µl que contenía el ADN, que se utilizó como ADN molde para la amplificación.

La identificación de hongos de pudrición es bastante difícil ya que no suelen propagarse fuera de la madera, así que se intentó aislar ADN directamente de ésta, lo cual supone un serio problema metodológico por la resistencia mecánica de este material a romperse y por la contaminación de las muestras con ácidos húmicos, que hubieron de ser separados mediante electroforesis. Además de aplicar protocolos obtenidos de la literatura se intentó hacer crecer hongos introduciendo fragmentos de madera en medio YPD (estándar para crecimiento de hongos microscópicos) líquido e incubando a 30°C durante varios días en la oscuridad y sin agitación. Al cabo de dicho tiempo crecieron microorganismos que se visualizaron al microscopio óptico y cuyo ADN se aisló por métodos estándar.

La extracción de ADN fue verificada mediante electroforesis, de 5 µl de cada solución obtenida, en gel de agarosa al 0,7% en tampón TBE ½ y teñido con bromuro de etidio, a 120 V, durante 30 minutos, usando como patrón ADN de fago λ (Promega) digerido con las endonucleasas de restricción HindIII y EcoRI con un patrón de bandas en un rango de 564 a 21226 pb.

❖ Amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

La detección de microorganismos se basa en la amplificación y secuenciación de genes (o de fragmentos de los mismos) que codifican alguna de las moléculas de ARN ribosómico (ARNr): 16S en procariontes, 18S y/o 28S en eucariotes. Estas secuencias se consideran universales y presentan bajo polimorfismo, es decir, poca variación dentro de una misma especie, aun así, presentan ciertas divergencias que permiten identificar con bastante fiabilidad a los distintos organismos.

La amplificación de los genes ADNr (que codifican los ARNr) se consigue en un termociclador mediante la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando como molde el ADN genómico previamente extraído y purificado del microorganismo a identificar. Para el ADNr 16S de procariontes se utilizaron como cebadores para la reacción de amplificación el par de oligonucleótidos 5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 5'-ACCTTGTTACGACTT-3'; mientras que en el caso del ADNr 28S de eucariotes las secuencias de los oligonucleótidos fueron: 5'-ACCCGCTGAATTTAAGCAT-3' y 5'-TCCGTGTTTCAAGACGG-3'. Estos oligonucleótidos corresponden a secuencias especialmente conservadas dentro de los genes ADNr y son utilizados convencionalmente para su amplificación y secuenciación. Fueron sintetizados por la empresa Eurofins MWG Operon. De esta forma se amplificaron fragmentos de ADN de unas 1.500 pares



de bases (pb) en el caso de procariontas, y de unas 600 pares de bases (pb) en el caso de eucariotas.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador My Cycler y se realizaron en un volumen final de 50  $\mu$ l y contenían: 2  $\mu$ l de la solución de ADN obtenida durante la extracción (ADN molde), 5  $\mu$ l de tampón Taq DNA polimerasa, 1  $\mu$ l de Taq DNA polimerasa (5 U), 2  $\mu$ l de mezcla de dNTP's 10 mM cada uno, 50 pmol de cada uno de los dos oligonucleótidos utilizados como cebadores, completando con agua Milli-Q estéril (Sigma W4502). Tabla II.1.

Tabla II.1. Componentes necesarios para la PCR.

Añadir en orden	Volumen ( $\mu$ L)							
ADN molde	1	2	3	4	5	10	20	40
Oligo FW	1	1	1	1	1	1	1	1
Oligo RW	1	1	1	1	1	1	1	1
dNTP's	2	2	2	2	2	2	2	2
Tampón TAQ	5	5	5	5	5	5	5	5
TAQ polimerasa	1	1	1	1	1	1	1	1
H <sub>2</sub> O mQ	39	38	37	36	35	30	20	0

El termociclador en el que se introdujo la mezcla anterior para que se produjese la amplificación, se programó con las siguientes condiciones: 2 minutos a 95 °C para la desnaturalización del ADN molde, seguido de 30 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 95 °C, 1 minuto de hibridación de cebadores a 55 °C y 5 minutos de elongación a 72 °C, con un paso de extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Para comprobar la efectiva amplificación de los fragmentos de ADN, los productos resultantes de la PCR se analizaron, junto con un marcador de peso molecular, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en 50 ml de tampón TBE ½ teñido con solución de tinción de ácidos nucleicos RedSafe o bromuro de etidio, a 100 V, durante 40 minutos, usando como patrón ADN de fago  $\lambda$  (Promega) digerido con las endonucleasas de restricción HindIII y EcoRI con un patrón de bandas en un rango de 564 a 21226 pb. Tras la electroforesis, se visualizó el gel bajo luz ultravioleta, viéndose las bandas correspondientes al ADN amplificado y al marcador de peso molecular (para la estimación del tamaño de las bandas, se utilizó el marcador comercial Hyperladder II de Bioline).

Elaboración del gel de agarosa al 0,7% .Para elaborar 50ml de gel es necesario:

- 0,35 g agarosa.
- 50 ml de tampón TBE ½ (2,5 ml TBE 10X + 47,5 ml H<sub>2</sub>O destilada)
- 2,5  $\mu$ L de colorante RedSafe.

En la elaboración del gel, la agarosa junto con el tampón TBE ½ se calienta a ebullición en el microondas, es decir, hasta que empiecen a formarse burbujas de gran tamaño, para disolverla. Posteriormente, tras enfriar la solución de agarosa, se le añade el colorante, el cual es de un tono rojizo y que se utiliza en sustitución del más común bromuro de etidio (BrEt) debido a su menor toxicidad. Se deja que el gel se solidifique.

Electroforesis en gel de agarosa:

Se analizaron las muestras originales obtenidas con los oligos 16S y 28S por PCR así como una preparación comercial (“escalera”) con fragmentos de ADN de tamaño conocido. En cada pocillo se cargaron 5  $\mu$ L de las muestras mezcladas previamente con 1  $\mu$ L de tampón de carga.

Al gel de agarosa, inmerso en 100 ml de tampón TBE  $\frac{1}{2}$ , se le aplica una corriente de 100 voltios durante 40 minutos. El tampón sirve como conductor de la electricidad y controla el pH, lo cual es importante para la estabilidad de las moléculas biológicas. Como el ADN tiene una carga negativa a pH neutro, migrará a través del gel hacia el electrodo positivo durante la electroforesis.

Las bandas correspondientes a los fragmentos de ADN amplificados que se encuentran a la misma altura contienen moléculas que han atravesado el gel a la misma velocidad y, por tanto, tienen un tamaño similar. Agregar una calle con marcadores de peso molecular conocido, permite determinar el tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos (Figura II.3).

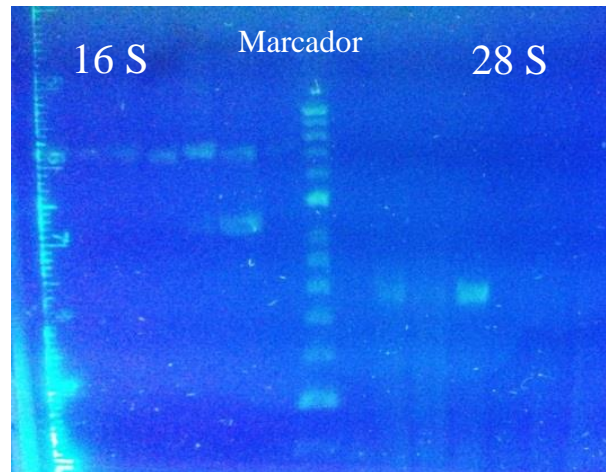


Figura II.3. Ejemplo de electroforesis en gel de agarosa donde se observan las bandas de ADN.

Purificación de ADN de los productos de PCR:

Una vez que se comprueba la correcta amplificación de ADN de las distintas muestras, se procede a purificarlo para poder secuenciarlo posteriormente.

Para la purificación de material genético se ha utilizado un *kit* comercial de purificación *Biolinelsolate PCR and Gel Kit*, que dispone de los materiales necesarios para la misma y con el que se sigue un protocolo de actuación simple que incluye los siguientes pasos:

1. Colocar el tubo Columna A en un tubo colector con un volumen de 2 ml.
2. Añadir 500  $\mu$ L de *Binding Buffer A*.
3. Añadir 50  $\mu$ L de la muestra, es decir, del ADN junto a los productos de la PCR, y mezclar cuidadosamente con la pipeta.
4. Centrifugar a 10000xg durante 2 minutos.
5. Desechar el tubo colector y colocar la Columna A en un tubo de elución (tubo *ependorf*).
6. Añadir 15  $\mu$ L de agua mQ.
7. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
8. Centrifugar 1 minuto a 6000xg para eluir los productos de la PCR.

Con estos pasos se obtiene el ADN purificado.

❖ Cuantificación de las muestras de ADN

Se necesita conocer la concentración de ADN purificado que está presente en las muestras, ya que cada laboratorio requiere de cantidades de ADN concretas para poder secuenciarlo. La cuantificación de material genético se obtiene por dos métodos diferentes para poder, posteriormente, realizar una comparación de los resultados obtenidos y probar, así, la veracidad de los mismos.

• Método nº 1. Electroforesis

Este método consiste en hacer correr las muestras ya purificadas en un gel de agarosa, en el que también se hace correr un marcador de peso molecular: *DNA Ladder* 100-1000pb MBL020 (50 µg, 0,1 µg/µL). Este marcador es ideal para determinar el tamaño de ADN de doble cadena desde 100 hasta 1000 pb. Las bandas de las muestras se comparan con la escalera por brillo.

• Método nº 2. NanoDrop

El equipo NanoDrop es una técnica con la que a partir de una pequeña gota de muestra (2 µL) se puede obtener la concentración de material genético presente en la misma. Además se mide la absorbancia a 260 y 280 nm, estableciendo una relación entre tales medidas, con la que se obtiene información acerca de la degradación de proteínas. Así, si la relación  $Abs_{260}/Abs_{280}=1,5-1,7$  quiere decir que el ADN no está contaminado de proteínas.

❖ Secuenciación del ADN amplificado.

Las muestras, una vez purificadas, son preparadas para su secuenciación, obteniendo así el orden de nucleótidos que compone su material genético. Una vez cuantificadas las muestras de ADN amplificado, éstas se prepararon y enviaron para su secuenciación al Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC) de Granada.

❖ Análisis de la secuencia.

Consiste en la comparación de la secuencia de ADNr obtenida, con las depositadas en bases de datos, mediante el análisis Blast. Actualmente existen diversas bases de datos, algunas públicas y de acceso libre a través de internet. La más utilizada es GenBank, del NCBI (*National Center for Biotechnology Information, USA*). <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

La homología de la secuencia con las existentes en la base de datos proporciona la identificación taxonómica del microorganismo, permitiendo también un análisis filogenético que refleja, de forma esquemática, el grado de parentesco genético entre los microorganismos comparados. Lo ideal sería una afinidad mayor al 97% para poder afirmar casi con total seguridad que la secuencia de ADN se corresponde con el organismo indicado en la base de datos.

## 1.9 ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE

La espectroscopia UV-visible se utiliza de manera general en la determinación cuantitativa de ciertas sustancias como los componentes de soluciones de iones de metales de transición y compuestos orgánicos altamente conjugados.

El principio de la espectroscopia ultravioleta-visible involucra la absorción de radiación ultravioleta-visible (200-800 nm) por una molécula, causando la promoción de un electrón de un

estado basal a un estado excitado. Al absorber radiación electromagnética de una frecuencia correcta, ocurre una transición desde uno de estos orbitales a un orbital vacío. Las diferencias entre energías varían entre los diversos orbitales.

El instrumento utilizado, espectrofotómetro UV-Vis, mide la intensidad de luz después de haber atravesado una muestra (I), y la compara con la intensidad de luz antes de pasar a través de ella (I<sub>0</sub>). Cuando un haz de radiación UV-Vis atraviesa una disolución conteniendo un analito absorbente, la intensidad incidente del haz (I<sub>0</sub>) es atenuada hasta I. Esta fracción de radiación que ha logrado traspasar la muestra se denomina transmitancia (T = I/I<sub>0</sub>). Por aspectos prácticos, se utiliza la absorbancia (A = -logT) en lugar de ésta por estar relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbente (Ecuación II.1) según la Ley de Lambert-Beer (Jentoft, 2004):

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot l \quad \text{Ec II.1}$$

- A      absorbancia medida.
- ε      coeficiente de absortividad molar.
- l      longitud de la cubeta, el camino óptico (cm).
- C      concentración de la especie absorbente (moles/l).

Para cada especie y longitud de onda, ε es una constante conocida como absortividad molar o coeficiente de extinción. Esta constante es una propiedad fundamental molecular en un solvente dado, a una temperatura y presión particular.

Otra expresión para la ecuación de Beer-Lambert es la siguiente (Ecuación II.2):

$$\frac{I_t}{I_0} = e^{-klc} \quad \text{Ec II.2}$$

- I<sub>t</sub>      intensidad de transmisión.
- I<sub>0</sub>      intensidad de la luz incidente a una determinada longitud de onda.
- k      capacidad de captación del haz del campo electromagnético.
- l      longitud del tubo de fotocolorimetría (cm).
- c      concentración de la muestra (mol/l).

El instrumento empleado en este estudio es un espectrofotómetro UV/Vis marca JASCO V650, de JASCO Analytical Instruments.

### 1.10 COLORIMETRÍA

La colorimetría permite determinar las variaciones de color que se producen en los distintos materiales. Para evaluar los posibles cambios de color en los materiales tras los tratamientos con biocidas se sigue lo indicado en las normas Normal 43/93 (1994) y UNE-EN 15886 (2011), empleando un colorímetro Minolta modelo Chroma meter CR-210, que caracteriza el color en forma de coordenadas tridimensionales en el sólido cromático *CIE-lab* (Figura II.4). Este sistema de medición proporciona los parámetros cromáticos L\* a\* b\* y la diferencia entre los valores iniciales y los valores después del tratamiento permiten calcular la variación global en el color (Ecuaciones II.3, 4 y 5):

- $\Delta L^* = L^*_t - L^*_o$     Ec II.3    que aporta información sobre un cambio en la luminosidad.
- $\Delta a^* = a^*_t - a^*_o$  y  $\Delta b^* = b^*_t - b^*_o$     Ec II.4    que aporta información del cambio de tono.
- $\Delta E^* = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$     Ec II.5    que mide la alteración cromática total.

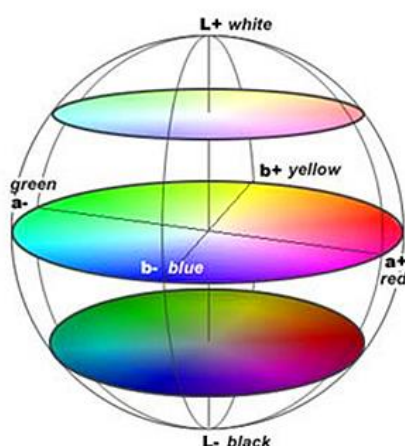


Figura II.4. Representación del CIE-Lab. El eje vertical 'L' representa la luminosidad, el eje horizontal 'a' es el rango rojo-verde y el eje horizontal 'b' el rango amarillo-azul. Fuente: Naturapixel.com

Si  $\Delta E^*$  es igual a cero significa que no se ha producido ningún cambio de color entre la muestra y la superficie de referencia (en este caso, antes del tratamiento biocida). Es a partir de un  $\Delta E^*$  mayor de 5 cuando se considera que existe un cambio significativo en el color (Delgado-Rodriguez y Grossi, 2007).

### 1.11 POROSIDAD

Una manera de comprobar si el biocida ataca a la integridad de la piedra es calculando su porosidad abierta, la cual se conoce también como porosidad accesible o comunicada, y se define como el volumen de poros abiertos o comunicados entre sí y con el exterior (accesibles al agua normalmente) por unidad de volumen total de roca (Alonso Rodriguez, 2010). Esta porosidad presenta gran interés en la caracterización de geomateriales, ya que está relacionada con su capacidad de absorber de agua y su comportamiento frente al deterioro.

La porosidad abierta se determina mediante técnicas experimentales, basadas en introducir un fluido en los poros y cuantificar su volumen. El procedimiento más común es el método de la saturación de agua a vacío. En dicho ensayo se saturan los poros con agua, normalmente al vacío para asegurar el llenado completo, y se obtiene la porosidad abierta “accesible al agua”. Para ello se sigue la norma UNE-EN 1936 (2007), realizando en las muestras pesadas tanto del peso seco, como del peso saturado e hidrostático antes y después de aplicarles los biocidas.

Para medir la porosidad, se mide el peso seco de las muestras, luego se someten a vacío y se sumergen en agua desaireada durante 72 horas. Transcurrido este tiempo se toman el peso saturado y el peso hidrostático (sumergido en agua).

#### Determinación de la porosidad abierta (PA):

La porosidad abierta se calcula por medio de la relación (en porcentaje) entre el volumen de los poros abiertos y el volumen aparente de la probeta, mediante la Ecuación II.6:

$$P = \frac{m_s - m_d}{m_s - m_h} \cdot 100 \quad \text{Ec II.6}$$

P	porosidad abierta (%)
$m_d$	masa de la probeta seca (g).
$m_s$	masa de la probeta saturada (g).
$m_h$	masa de la probeta sumergida (g).

Tras la aplicación de los tratamientos biocidas y su completo secado se determina nuevamente la porosidad.

### 1.12 VELOCIDAD DE PROPAGACIÓN DE ULTRASONIDOS

La velocidad de transmisión de ultrasonidos en un material está relacionada directamente con la compacidad del mismo, por lo que es una técnica que se utiliza para obtener indirectamente una medida de las características mecánicas del mismo o para detectar la presencia de discontinuidades y defectos internos. El ensayo se puede realizar de distintas formas; dependiendo de la forma de emisión y recepción de las ondas puede clasificarse como método de reflexión por eco o método de transmisión o transparencia. Este último procedimiento es el más utilizado, se trabaja con un emisor y un receptor a frecuencias bajas, para conseguir una atenuación lo suficientemente pequeña y un mayor alcance de los impulsos ultrasónicos en el material (Villegas, 1989).

Para la realización de este estudio se dispuso de un equipo STEINKAMP BP5 (KRAUFTKRAMER) de escala entre 0,1 y 999,9 microsegundos, cuya precisión es de  $\pm 1$  microsegundo. El equipo incluye dos parejas de palpadores distintos, cónicos y cilíndricos que contienen cristales piezoeléctricos de circonato de plomo-titanio y cuya frecuencia de trabajo es de 20 a 500 KHz.

La velocidad de pulso en el elemento sobre el que se va a realizar la medición se expresa como (Ecuación II.7):

$$V = \frac{d}{t} \quad \text{Ec II.7}$$

V	velocidad (m/s).
d	distancia recorrida entre palpadores (m).
t	tiempo de transmisión de la señal (s).

### 1.13 DUREZA SUPERFICIAL

La dureza es la resistencia que ofrece un material a ser penetrado por elementos de distinta morfología. La dureza aumenta con la densidad de la madera. Para la madera existen tres métodos de medir la dureza: el ensayo Brinell, el ensayo Janka y el ensayo Monnin o Chaláis-Meudon.

El ensayo de dureza Brinell está basado en la aplicación de una carga concentrada en un punto. La carga se aplicará durante unos 8-10 segundos en una punta que incidirá sobre la superficie del material. Esta punta tiene forma de bola de 5mm de diámetro y la escala que se utiliza es la Brinell. Tras la aplicación de la carga el equipo mide la profundidad de penetración de la bola en la probeta y proporciona el valor de la dureza como el cociente entre la fuerza aplicada entre el área resultante de la penetración.

## 2. METODOLOGÍA DE CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES

### 2.1 MATERIALES PÉTREOS

Los estudios de identificación y caracterización de los materiales pétreos o geomateriales, tanto la piedra natural como otros tipos de materiales manufacturados (morteros, yeserías, revestimientos, enlucidos, ladrillos), así como los productos de alteración físico-químicos observados sobre ellos (eflorescencias, concreciones, etc.), incluyen distintas técnicas de análisis petrológico (DRX, MOP, SEM-EDX).

La difracción de rayos X (DRX) es una técnica que permite la identificación de los compuestos cristalinos (minerales) presentes en la muestra en estudio.

La microscopía óptica de polarización (MOP) permite identificar minerales mayoritarios y minoritarios en una muestra mediante sus propiedades ópticas. Para la observación de los materiales con esta técnica se requiere la preparación de láminas delgadas obtenidas por corte y métodos de abrasión hasta alcanzar un espesor de 30  $\mu\text{m}$ .

Mediante la microscopía electrónica de barrido con EDX (SEM-EDX) se pueden observar las muestras a mayores aumentos que con microscopio óptico y, en combinación con los datos obtenidos mediante MOP, permite el estudio puntual de algunas estructuras cristalinas en detalle. Además se identifica la composición química elemental empleando la espectroscopía de energía dispersiva de rayos X acoplada al microscopio (SEM-EDX). Se ha utilizado en algunas muestras puntuales el equipo JEOL modelo JSM-5600 LV con espectrometría de energía dispersiva de rayos X INCA X-sight. Para poder ser analizadas las muestras deben cumplir el requisito de ser conductoras, por este motivo se metalizaron con carbón.

### 2.2 MATERIALES DE ORIGEN BIOLÓGICO: MADERA Y CUERO

#### MADERA

La madera es un material orgánico natural con estructura celular, que tiene muy buenas características para su empleo como material estructural, por lo que se ha usado desde los inicios de la civilización. La identificación taxonómica de las maderas se ha llevado a cabo mediante el estudio de sus características macroscópicas y de su anatomía microscópica

La identificación de las especies de madera se ha realizado mediante técnicas de microscopía estereoscópica y microscopía óptica. Para ello, fue necesario tomar micromuestras del orden de 3-5  $\text{mm}^3$ , en las que se estudió también el grado de biodeterioro que poseían.

Se practicaron cortes transversales y longitudinales en las muestras mediante un micrótopo de deslizamiento, el cual permite la realización de láminas muy finas (del orden de 20-30  $\mu\text{m}$ ), y, en ocasiones, manualmente mediante el uso de una hoja de cuchilla de uso industrial, obteniendo láminas lo suficientemente delgadas para la observación e identificación al microscopio óptico con luz transmitida. Se estudiaron las tres secciones de la madera: transversal (perpendicular al eje longitudinal del árbol), longitudinal tangencial (paralela a un plano tangente al anillo de crecimiento) y longitudinal radial (que pasa por el eje longitudinal del árbol e incluye a uno o varios radios leñosos).

Para la identificación de especies se han utilizado criterios morfológicos de identificación de madera, por lo que las muestras se visualizaron al microscopio óptico y, posteriormente, se



utilizó una clave taxonómica para su determinación. (García Esteban et al., 1996; García Esteban et al., 2003; Peraza, 1964; Schoch et al., 2004; Schweingruber, 1990a; Schweingruber, 1990b).

Además de las maderas que forman parte de los bienes culturales en estudio, en este trabajo se han ensayado probetas de cuatro tipos: pino, olmo, cedrela y roble, todas ellas maderas habitualmente usadas en patrimonio histórico.

## CUERO

El estudio de los cueros empleados en las pinturas de la Sala de los Reyes de la Alhambra se llevó a cabo mediante diferentes ensayos que permitieron determinar el pH y el tipo de curtido utilizado así como su estado de conservación y, por último, identificar el animal de procedencia.

La *medida del pH* se ha realizado sobre un extracto acuoso de los cueros. Dicho extracto está definido internacionalmente como 5 g de cuero en 100 ml de agua destilada (Norma UNE-EN ISO 4044). Dado que ninguna de las muestras contiene la cantidad de cuero necesaria, los extractos se han realizado con 0,25 g de cuero y 5 ml de agua destilada, manteniendo la proporción. Se cortaron mediante cuchilla 0,25 g de fragmentos de cuero a modo de virutas (ver Figura II.5). Se le añadieron 5 ml de agua destilada y se tuvieron en agitación mecánica durante 6 horas. Se determinó el valor de pH de los extractos mediante pHmetro convencional con electrodo de vidrio. (UNE-EN ISO 4044; UNE-EN ISO 4045:1999).



Figura II.5. Muestras de cuero cortadas en forma de virutas en vasos de precipitado.

Para la *determinación del tipo de curtido*, se realizaron diferentes análisis. Teniendo en cuenta diversos estudios previos existentes (Sánchez Romero, 2007), se parte de la hipótesis de que el curtido de la piel se ha realizado con alumbre (sulfato doble de aluminio y potasio). No obstante, al tratarse de distintas muestras, se han llevado a cabo ensayos para determinar si el curtido se ha realizado con taninos vegetales, además de con alumbre, así como estudios mediante microscopía electrónica de barrido y microanálisis por energía dispersiva de rayos X (SEM/EDX). (UNE 59021/1988).

El ensayo de determinación de taninos vegetales en extracto acuoso está basado en la especificidad de la gelatina por los taninos. Las soluciones de taninos precipitan una solución de gelatina al 1% que contenga un 10% de cloruro sódico. Por tanto debe prepararse una solución de extracto de las muestras de cuero en agua destilada, cortándolo en virutas y manteniéndolo 6 horas en agitación magnética. Posteriormente, se vierte la solución del extracto de cuero sobre la mencionada solución de gelatina.

El ensayo de determinación de taninos condensados (un tipo de taninos vegetales) se basa en la sensibilidad de los taninos a la oxidación, especialmente en medio ácido. Al calentarlos en medio



ácido, dan color rojo por la formación de antocianidinas, y un precipitado de flobofeno también de color rojo. Se preparó una disolución de ácido clorhídrico al 5% en agua destilada, en la que se introdujo el cuero objeto de estudio cortado a modo de virutas y se calentó a 100 °C en placa calefactora con agitación magnética.

El estudio mediante microscopía electrónica de barrido y microanálisis por energía dispersiva de rayos X (SEM/EDX) proporciona un análisis elemental de gran utilidad para determinar el tipo de curtido. Una pequeña parte de cada muestra de cuero fue embutida en una resina y cortada perpendicularmente para obtener su sección transversal. Dichas secciones fueron convenientemente preparadas para analizarlas al microscopio electrónico. Dado que el análisis químico por EDX es muy puntual, se realizaron varios análisis por zona para obtener resultados más representativos. La presencia de azufre, aluminio y potasio indica que el curtido fue realizado con alumbre.

Para la determinación de la especie de la que procede el cuero, se recurrió al estudio morfológico mediante la observación de la disposición de los folículos pilosos al estereomicroscopio y al análisis de ADN antiguo mediante extracción del ADN.

### **2.3 MATERIALES PICTÓRICOS**

Para el estudio de capas pictóricas ha sido necesario realizar una extracción de micromuestras de los diferentes elementos pictóricos de los inmuebles en estudio. Para realizar dicha extracción es necesario hacer una incisión lo más profunda y vertical posible, con el fin de conseguir todas las capas o estratos de pintura. Las muestras se toman aprovechando siempre el craquelado, lagunas, grietas, zonas ocultas o bordes y evitando siempre la extracción en zonas comprometidas para el mensaje de la obra. En la elección de los puntos de muestreo se intentó compaginar siempre el hecho de la representatividad de la muestra con su situación en lugar no estratégico.

Con objeto de efectuar el estudio estratigráfico de capas pictóricas, los pequeños fragmentos de pintura se han embutido en una resina de metacrilato y se han desbastado y pulido perpendicularmente hasta obtener la sección transversal (estratigrafía). En estas secciones se han analizado las diferentes capas pictóricas e identificado los materiales presentes mediante la siguiente metodología:

- Examen preliminar con el microscopio estereoscópico.
- Observación al microscopio óptico con luz reflejada de las estratigrafías, con el fin de determinar la secuencia de estratos así como el espesor de los mismos.
- Estudio al microscopio electrónico de barrido (SEM) y microanálisis elemental mediante energía dispersiva de Rayos X (EDX) de las estratigrafías, para la determinación de la composición elemental de los pigmentos y cargas.
- Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR por transmisión y FTIR-ATR) y Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) para la determinación de compuestos orgánicos.

### 3. METODOLOGÍA DE ESTUDIOS DE BIODETERIORO: DETERMINACIÓN DE ESPECIES

Con el fin de evaluar los productos biocidas más adecuados para la correcta eliminación de los organismos, se realiza como primer paso, la identificación de las especies biológicas presentes, ya que éstas y los efectos que provocan van a definir la selección de los productos usados para los estudios de su efectividad (Nugari y Salvadori, 2002).

Para la determinación de especies se usan diversas técnicas de análisis como la microscopía estereoscópica (para líquenes, briofitos y plantas superiores) y la microscopía óptica con luz transmitida (para microorganismos fotótrofos y líquenes); así como técnicas de biología molecular.

Dependiendo del organismo a estudiar se emplean diferentes técnicas de análisis:

#### **Análisis microbiológico**

Para determinar la biodiversidad existente y especialmente, para la identificación precisa de los microorganismos implicados en los procesos de biodeterioro, estos estudios deben combinar diversas técnicas como son la microscopía óptica y electrónica y la biología molecular (PCR).

La toma de muestra para los análisis microbiológicos debe ser efectuada con distintas metodologías dependiendo de la naturaleza del microorganismo. Las muestras pueden ser tomadas con instrumentos tales como bisturíes, espátulas e hisopos, previamente esterilizados, y colocados en recipientes también estériles.

Para la identificación de los microorganismos es indispensable realizar los cultivos pertinentes sobre varios sustratos o medios de cultivo, los cuales pueden ser líquidos o solidificados con agar, y poseen diferentes composiciones que contienen todas las sustancias nutritivas indispensables y favorables para el crecimiento de los diferentes microorganismos en estudio. Para evitar contaminación es necesario esterilizar el medio de cultivo antes de usarlo y continuar toda la operación en asepsia. La esterilización del medio de cultivo se realiza normalmente en autoclave a 1 atm y 120 °C durante 15 o 20 minutos.

Las muestras se observan al estereomicroscopio y al microscopio óptico para identificar el grupo sistemático de los agentes biológicos y tener, por tanto, alguna indicación sobre cómo realizar los posteriores análisis. También las observaciones al microscopio electrónico pueden ser de utilidad. La colonia microbiana que se desarrolla en el cultivo será posteriormente estudiada al microscopio óptico y al microscopio electrónico de barrido para una completa identificación.

Sin embargo muchos microorganismos presentes en el campo del patrimonio histórico no son cultivables, por lo que se requieren técnicas de biología molecular para su determinación.

#### **Análisis botánico**

Los líquenes, briofitos (musgos y hepáticas) y plantas superiores, no requieren técnicas de cultivo para su identificación.

La toma de muestra se lleva a cabo en aquellos lugares donde es evidente la alteración del sustrato o en zonas próximas. La forma de tomar la muestra depende del tipo de biodeteriogeno, alteración y estructura de la obra (escultura, muro, relieve...). Las muestras se toman rascando o haciendo palanca mediante un escalpelo o espátula y, en el caso de plantas superiores, con una picola.

La identificación de organismos puede ser realizada en el campo o en el laboratorio tras la toma de muestras, mediante observación al estereomicroscopio y/o al microscopio óptico. Normalmente se examinan el talo y las estructuras reproductoras de líquenes y briofitos, mientras que para las plantas superiores se estudian los distintos elementos del cormo como hojas, flores y frutos.

Se puede realizar un estudio cualitativo (florístico), en el que se efectúa solamente un listado de las especies presentes en un área determinada, con consideraciones de tipo ecológico. O un estudio cuali-cuantitativo (fitosociológico), en el cual se examinan datos ambientales (de la estación y del sustrato) y datos de la vegetación que incluyen la composición florística, la cobertura y las asociaciones de las especies presentes. La interpretación de las interrelaciones entre los organismos y el ambiente permite al analista definir el significado ecológico de las distintas asociaciones. Por último, debe tenerse en cuenta la relación entre la vegetación y el sustrato, y la naturaleza de los mecanismos de deterioro.

### **Análisis entomológico**

Los insectos son el grupo de organismos vivos más diverso de la naturaleza, por encima de otros como los hongos o las bacterias. La toma de muestra se realiza sobre el material afectado. Debe recogerse tanto el material dañado como los restos de los insectos atacantes.

Para su identificación se emplea el estereomicroscopio o lupa binocular, sobre todo para diferenciar especies muy parecidas mediante el examen de diversas estructuras que no son visibles a simple vista. Para ello es suficiente un instrumental sencillo: pinzas y agujas enmangadas, unos pocillos y potasa.

Posteriormente se realiza la reconstrucción del ciclo biológico en función de datos bibliográficos, a los que se añaden observaciones previas. La valoración del ataque se realiza en función de la extensión del daño producido sobre el material atacado, y es necesario para establecer la intensidad del tratamiento desinsectante a aplicar.

### **3.1 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS HETERÓTROFOS: BACTERIAS, HONGOS FILAMENTOSOS Y DE PUDRICIÓN. IDENTIFICACIÓN DE INSECTOS.**

En el interior de los edificios a veces se observan diversos deterioros causados por microorganismos, principalmente hongos y bacterias, que se desarrollan sobre yeso, pinturas murales, madera de artesonados y vigas, etc. Esto sucede como consecuencia de una alta humedad relativa, pero, sobre todo, de las filtraciones de agua en el inmueble. En las estructuras de madera, además, es posible detectar pudriciones causadas por hongos y deterioros causados por insectos xilófagos.

Por su origen orgánico, la madera puede verse alterada por la presencia de numerosos seres vivos (insectos, hongos, bacterias heterótrofas) que la usan como alimento y como sustrato para su desarrollo, ocasionando una variación de sus propiedades mecánicas y afectando a su aspecto. Como protección contra ellos, se pueden usar un gran número de tratamientos biocidas y, para paliar sus efectos, se emplean consolidantes, en ocasiones de manera conjunta con el biocida por lo que, además de ser eficaces, deben ser compatibles entre sí.

Para identificar los microorganismos, tras la toma de muestras de las superficies, mediante hisopo estéril, se cultivan en los medios AGS y AEM (ver apartado 1.7) donde crecen principalmente hongos, pero también bacterias. Tras incubación en estufa, se estudian las colonias que se han desarrollado. El estudio de estos factores biológicos de alteración se ha

llevado a cabo mediante técnicas de microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido, técnicas de cultivo y técnicas de biología molecular.

En una primera fase de diagnóstico, se ha trabajado con métodos convencionales basados en las características biométricas y morfológicas, macro y microscópicas, de los organismos aislados. En el caso de organismos no cultivables o no identificables mediante los métodos estándares, en una segunda fase, se ha requerido el empleo de técnicas de análisis más sofisticadas. Estas técnicas se basan en el análisis del ADN microbiano para la identificación precisa de estos agentes.

Para la determinación de insectos, se emplean métodos de microscopía estereoscópica y bibliografía específica (Kingsley et al., 2001; Pinniger, 2004; Hedges, y Lacey. 2002; Meaney, 2004; Yela y Sameño, 1995).

### 3.2 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS FOTOAUTÓTROFOS: CIANOBACTERIAS Y ALGAS

La pátina negra y verde que recubre los materiales pétreos está compuesta mayoritariamente por cianobacterias y algas verdes. Estos microorganismos se estudian mediante el uso de métodos tradicionales de microbiología y también mediante técnicas de biología molecular. La detección e identificación de los distintos microorganismos involucrados en estos procesos es importante, por un lado, para verificar su presencia y, por otro lado, para evaluar sus funciones y su efecto sobre los diversos materiales.

Las muestras se toman mediante raspado de la superficie con bisturí estéril (Figura II.6). Posteriormente, se realizan los cultivos en placa de Petri, uno con medio de cultivo BG11, específico para cianobacterias, y otro con medio Allen-Arnon ( $10 \text{ mM NO}_3^-$ ) o TAP  $\text{NO}_3^-$  (ver apartado 1.7), que permite el crecimiento de microalgas verdes. Tras su incubación durante aproximadamente 30 días, en cámara con luz constante las 24 horas del día y a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura, se desarrollan las colonias (Figura II.7).



Figura II.6. Toma de muestra de microorganismos fotótrofos.

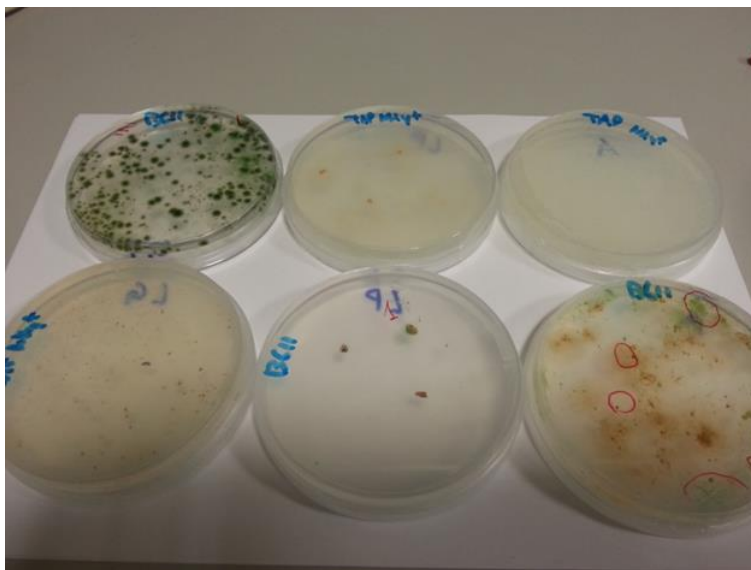


Figura II.7. Cultivos BG11 y TAP con la presencia de microorganismos fotótrofos tras incubación.

Una vez transcurridos este tiempo, se procede a la extracción de material genético para su posterior secuenciación con la finalidad de poder identificar las especies de microorganismos presentes (ver apartado 1.8).

### 3.3 IDENTIFICACIÓN DE LÍQUENES

Para la determinación de los líquenes presentes en un bien cultural, se toman muestras mediante bisturí de los talos más representativos, que se estudian mediante la realización de cortes transversales de la parte reproductiva de los organismos (peritecios y apotecios). Estas secciones se analizan al estereomicroscopio y al microscopio óptico y se contrastan con bibliografía específica de autores como Wirth et al. (2004); Ozenda y Clauzade (1970), y Nimis et al. (1992), con la finalidad de determinar la especie a la que pertenecen, teniendo en cuenta distintos aspectos como sus características físicas, su morfología, el tamaño de las esporas, etc.

Las reacciones de tinción pueden ser de gran utilidad a la hora de la identificación de especies (Ozenda y Clauzade, 1970). Por ejemplo, al aplicar una solución de hidróxido de potasio (KOH) sobre el talo o los apotecios, los líquenes adquieren una coloración diferente a la original, lo que permite distinguir unas especies de otras.

### 3.4 IDENTIFICACIÓN DE BRIOFITOS

Las distintas especies de briofitos, musgos mayoritariamente, se analizan con ayuda del microscopio estereoscópico y de bibliografía específica (Wirth et al., 2004) para su correcta identificación. A veces, algunas muestras no están fértiles en el momento de la toma de muestras, por lo que resulta difícil su determinación a nivel de especie.

### 3.5 IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS SUPERIORES

Las plantas superiores predominantes en los bienes culturales son en su mayoría de tipo herbáceas ruderales, de crecimiento rápido, alta tasa reproductora, oportunistas y pioneras. Para la toma de muestras se procede a su recolección a mano o con una picola, procurando tomar la planta lo más completa posible. Una vez en el laboratorio, se prensan y se etiquetan para, posteriormente, proceder a su determinación con ayuda de bibliografía específica (Blanca et al.

2009; Luceño et al., 2005; Valdés Castrillón et al., 1987; <http://herbarivirtual.uib.es/cas-med/>) y el uso del estereomicroscopio.

Hay que tener en cuenta que para identificar estas especies vegetales es necesaria la presencia de flores y/o frutos, pero éstos no siempre están presentes a la hora de la toma de muestras, por lo que en muchos casos la identificación resulta complicada.

#### 4. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS

La metodología general a aplicar para determinar la idoneidad de cualquier tipo de técnica y producto de tratamiento es independiente del tipo de obra que se esté estudiando, y debe centrarse en evaluar los siguientes aspectos:

- Compatibilidad de los productos y técnicas empleados con los materiales originales de la obra o con otros productos o técnicas de tratamiento que se vayan a utilizar.
- Eficacia del tratamiento, es decir, que con él se consiga el fin que se persigue.
- Resistencia del material tratado a los agentes de alteración que actuarán sobre la obra una vez restaurada.

En general, los métodos y técnicas de análisis y ensayo que podrían utilizarse para determinar estos tres puntos son los mismos que sirven para medir las diferentes características del material, si bien enfocados desde otro punto de vista. Tan sólo hay un grupo de técnicas cuya finalidad principal es determinar la alterabilidad de las muestras, que son los ensayos de alteración acelerada (Villegas Sánchez, 2003).

El estudio de estos tres aspectos se lleva a la práctica de la siguiente forma:

- Aplicación del tratamiento a probetas adecuadamente preparadas, de características semejantes a las de la obra a tratar (materiales, uniones, estado de conservación, etc.).
- Estudio de la compatibilidad con los materiales originales: se determinan una serie de propiedades del material que pueden verse modificadas con la aplicación del tratamiento (propiedades físicas, mecánicas, textura, color, etc.) y se decide si esas modificaciones son aceptables o no.
- Estudio de la compatibilidad de unos tratamientos con otros: normalmente se aplican varios tratamientos al mismo material, especialmente de limpieza y biocidas y posteriormente de consolidación y/o hidrofugación. Aunque los primeros se eliminan tras su empleo, debería estudiarse el efecto de esta aplicación sucesiva de productos, tratando de la misma manera las probetas.
- Evaluación de la eficacia del tratamiento: en función del tipo de tratamiento, se determinarán distintas características que se pretenden mejorar. Para la limpieza o la extracción de sales solubles, su eficacia se podrá medir, por ejemplo, analizando la superficie para determinar la presencia de los componentes de la costra o de dichas sales. Del efecto de los consolidantes son significativas las propiedades mecánicas, que pueden medirse directa o indirectamente. En el caso de los hidrófugos, se determinarán las propiedades relacionadas con la absorción de agua. Por último, en la aplicación de biocidas, se cuantificará la cantidad de organismos que se eliminan o el tiempo necesario para conseguir un efecto determinado.
- Determinación de la resistencia a los agentes de alteración: se someten las probetas ya tratadas a ensayos que reproduzcan el efecto de los agentes y mecanismos de alteración que actúen sobre la obra. Normalmente se efectúan ensayos de alteración acelerada, para obtener resultados en plazos cortos.

#### 4.1 MATERIALES

Con objeto de evaluar los tratamientos más adecuados, mediante diferentes tipos de ensayos con los productos seleccionados para cada caso en concreto, se han realizado réplicas o probetas de todos los materiales analizados en los bienes culturales estudiados.

Para los ensayos con geomateriales se cortaron probetas de los distintos tipos de material identificados en cada inmueble. En el caso del Salón Rico se usaron fragmentos descontextualizados del mismo edificio, aquellos que no iban a ser restaurados y podían, por tanto, ser ensayados. En la Portada de Santa Paula se tomaron fragmentos de los ladrillos constitutivos.

En el caso de las bóvedas de las pinturas de la Sala de los Reyes de La Alhambra, se realizaron réplicas que simulaban la estructura de las mismas y se emplearon todos los materiales que formaban parte de la obra: madera, cuero, capa de preparación y capas pictóricas.

Antes de aplicar los tratamientos a ensayar en la investigación, las réplicas se sometieron a ciclos de envejecimiento acelerado con el objetivo de asemejar el estado de los componentes pictóricos al de la obra original. Las condiciones de temperatura y humedad relativa empleadas en el diseño de los ensayos se seleccionaron atendiendo a los datos registrados en las 3 bóvedas de la Sala de los Reyes de la Alhambra. Los ensayos de envejecimiento acelerado se han realizado empleando la cámara climática Eneltec compacta CCLP -30/300.

Las probetas de madera, de las cuatro especies mencionadas, se cortaron en forma prismática de 10x2x2 cm y de 5x10x20 mm, sin que ninguna de las maderas hubiese recibido tratamiento previo.

Por último, se elaboraron réplicas de las pinturas murales halladas en las cúpulas de la *Maqsura* de la Mezquita de Córdoba. Para ello, se emplearon probetas de yeso de 3x3x1 cm y se aplicaron los dos colores (azul y rojo) que mayoritariamente se encontraron en las cúpulas, mezclando los pigmentos con el aglutinante detectado en los estudios previos.

#### 4.2 TRATAMIENTOS

Considerando el estado material, técnico y de conservación de los bienes culturales en estudio, la bibliografía especializada consultada (Caneva et al., 2000; Caneva et al., 2005; Guillaume-Chavannes, 1988) indica que, en la selección de los productos de conservación, se deben tener en cuenta los siguientes criterios generales y específicos:

Criterios generales:

- Idoneidad de aplicación en bienes culturales de distinta naturaleza (geomateriales, madera, cuero, pintura original proteica y pintura mural).
- Eficacia e idoneidad de los productos seleccionados.
- Que sean estables químicamente.
- Que no impidan la aplicación de otros tratamientos.
- Que no modifiquen las características de la obra.
- Que no colorean, ni manchen, ni dejen residuos.
- Que sus efectos sean duraderos.
- Que sean fáciles de aplicar.
- Que sean lo menos tóxico posible
- Que sean lo más reversible posible.



Criterios específicos (para biocidas):

- Gran poder biocida en bajas concentraciones
- No debe modificar ninguna de las características de los materiales constitutivos a tratar.
- Si está prevista una desinfección a largo plazo, el producto debe ser poco volátil.
- No debe producir compuestos secundarios nocivos.
- No debe poder ser neutralizado por ninguno de los componentes de otro tipo de tratamientos.
- Sus propiedades no deben verse alteradas por la acción del agua.
- Baja toxicidad para el ser humano.
- Su composición química y propiedades deben ser conocidas.
- Bajo riesgo de contaminación ambiental.

Los biocidas se encuentran regulados a nivel Europeo por la Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de enero de 1998 relativa a la comercialización de biocidas, transpuesta al ordenamiento jurídico mediante el Real Decreto 1054/2002 de 11 de octubre, por el que se regula el proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de biocidas.

Esta normativa se refiere a:

- La autorización y puesta en el mercado de biocidas en los Estados miembros.
- El reconocimiento mutuo de las autorizaciones en la Comunidad.
- El establecimiento a nivel comunitario de una lista de sustancias activas que pueden utilizarse en los biocidas.

La inclusión de una sustancia activa en las listas así como la autorización y puesta en el mercado de los productos biocidas están condicionadas a una evaluación previa de los riesgos para la salud y el medio ambiente derivados de su utilización.

Los biocidas usados en este estudio han sido de dos tipos. Por un lado, se han ensayado productos alguicidas, que son compuestos de amonio cuaternario (ver figura II.8). Las ventajas con las que cuentan este tipo de producto es su efectividad a bajas concentraciones, ausencia de olor y color, alta estabilidad y su doble acción biocida y detergente. Las desventajas son la baja actividad a largo plazo y que no matan a las esporas. Además, su actividad se ve reducida ante la presencia de sales o de cationes (Caneva et al., 2000). Estos biocidas son empleados con asiduidad en restauración (De los Ríos et al., 2012; <http://geiic.com>). (Ver anexos, fichas de seguridad de los biocidas).

Por otro lado, se han utilizado fungicidas para el caso de los materiales orgánicos afectados fundamentalmente por hongos (mohos y hongos de pudrición). Se han ensayado azoles y nanocompuestos.

Por último, se ha estudiado también la posible interferencia con la aplicación de otros tratamientos a emplear en la intervención en los sustratos o soportes y en las pinturas. Así, en este estudio se han tratado distintos tipos de madera con biocidas y consolidantes para ver sus efectos en las características del material, así como su eficacia y durabilidad (Figura II.9).

Las características de los productos se describen a continuación:



## **BIOCIDAS**

### **Preventol Ri80**

Es un preparado concentrado líquido de sales de amonio cuaternario con amplio espectro de actividad contra hongos, bacterias y algas. Se emplea para la producción de soluciones acuosas en concentraciones variables del 2 al 10% para desinfección de materiales pétreos, madera, cerámica, etc. Corrosivo y Peligroso para el medio ambiente.

El Preventol Ri80 empleado en el estudio está disuelto al 2% en agua. El método de aplicación ha sido mediante pincel o por inmersión, dependiendo del tipo de ensayo.

Características fisicoquímicas:

- Principio activo: Cloruro de Alquildimetilbenzilamonio, dipropilenglicolmetileter
- Aspecto: Líquido, incoloro a color amarillo, olor similar a almendra.
- Densidad: 0,97 kg/L a 20 °C.
- pH: 7 – 9.

### **New Des 50**

Es una sal de amonio cuaternario diluida, efectiva frente a bacterias, hongos, algas y líquenes. En el presente estudio se ha empleado disuelto al 2% en agua. El método de aplicación ha sido mediante pincel o por inmersión, dependiendo del tipo de ensayo.

Características fisicoquímicas:

- Principio activo: Cloruro de N,N-didecil-N,N-dimetilamonio al 50% en solución acuosa
- Aspecto: Líquido transparente, de incoloro a color amarillo, inodoro
- Densidad: 0,92 g/ml a 20 °C.
- pH: 6,5 – 8,0.

### **Biotin T**

Es un concentrado que debe diluirse en agua entre el 1-3% y según la tipología y la naturaleza del biodeterioro. Se usa para la preservación y la reparación de la contaminación microbiológica de superficies con materiales como piedras, morteros y estucados, frescos, granitos, etc. Se diluye en alcohol e hidrocarburos aromáticos, pero no en acetona, hidrocarburos alifáticos ni clorados. Entre sus inconvenientes se encuentra que, debido a la presencia de la sal de amonio, deben evitarse los tensoactivos aniónicos y las aguas demasiado duras. Para diluir BIOTIN T debe de usarse siempre agua desmineralizada, en cuanto la dureza de las aguas de red puede llevar a la reducción de la eficacia.

El Biotin T empleado está disuelto al 2% en agua destilada. El método de aplicación ha sido mediante pincel o brocha o por inmersión, dependiendo del tipo de ensayo.

Características fisicoquímicas:

- Principio activo: 2-octil-2H-isotiazol-3-ona (OIT), sales de amonio cuaternario (Cloruro de didecildimetilamonio), 2-propanol y ácido fórmico
- Aspecto: Líquido, transparente de incoloro a color amarillento, olor de alcohol.
- Densidad: 0,938 kg/L a 20 °C.

## Biotin R

Compuesto por dos moléculas, la IPBC (yodopropinilbutilcarbamato) y la OIT (N-octilisotiazolinona), las dos con una solubilidad baja en agua (156 ppm y 480 ppm). Es un concentrado que debe diluirse al 3-5% dependiendo del biodeterioro. Puede disolverse en la mayor parte de los disolventes orgánicos (acetona, "whitespirit" y disolventes aromáticos).

Tiene alto poder bactericida y antifúngico. Debido a su baja solubilidad en agua se utiliza para el exterior, o para aquellos casos en interiores con materiales sensibles al agua, como por ejemplo piedra o pintura mural con sales que puedan aflorar a la superficie después de un tratamiento acuoso o para madera o pintura.

En el estudio se ha empleado Biotin R disuelto al 3% en alcohol isopropílico. El método de aplicación ha sido mediante pincel o por impregnación, dependiendo del tipo de ensayo.

Características fisicoquímicas:

- Principio activo: 2-(2-butoxi) etanol, 3- yodo-2-propinilbutilcarbamato, 2-octil-2H-isotiazol-3-ona (OIT)
- Aspecto: Líquido, transparente y color amarillento, olor leve.
- Densidad: 1,067 kg/L a 20 °C.



Figura II. 8. Productos biocidas, A: Preventol Ri80, B: New Des 50, C: Biotin T, D: Biotin R.

## Voriconazol

Es un compuesto antifúngico de amplio espectro, del grupo de los derivados triazólicos. Actúa eliminando o impidiendo el crecimiento de los hongos que provocan infecciones. Se emplea en la industria farmacéutica. Inhibe la 14-alfa-esterol desmetilasa fúngica, enzima esencial en la biosíntesis de ergosterol. Fungicida frente a *Aspergillus*, *Scedosporium* o *Fusarium*.

Nombre (IUPAC) sistemático: (2R,3S)-2-(2,4-difluorofenil)-3-(5-fluoropirimidin-4-il) -1-(1,2,4-triazol-1-il)butan-2-ol

Fórmula: C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O

### **Tiabendazol**

Es un fungicida sistémico de amplio espectro del grupo de los Bencimidazoles, que puede ser utilizado para tratamientos preventivos y/o curativos. Puede aplicarse mediante aspersión o inmersión. Usado como producto fitosanitario, como conservante en la industria alimentaria. Se absorbe por raíces y hojas e impide la mitosis al unirse a la tubulina, por lo que se altera el crecimiento del hongo.

Nombre sistemático: 2-(4-Tiazolil) benzimidazol

Fórmula:  $C_{10}H_7N_3S$

### **Nano Óxido de cobre**

Las nanopartículas de cobre y de óxido de cobre, se sintetizan, como la mayoría de metales a escala nanométrica, a partir de reacciones redox en disolución. Ambos productos, las nanopartículas de cobre y las nanopartículas de óxido de cobre, poseen una apariencia rojiza cuando se presentan en estado sólido. Durante los últimos años, los estudios de eficacia antimicrobiana en distintas superficies de contacto han demostrado claramente que el cobre y ciertas aleaciones de cobre inactivan fácilmente varios de los tipos más potentes de microbios (Fages Santana, 2013).

En base a sus propiedades antifúngicas, las nanopartículas de cobre encuentran aplicación como aditivo de matrices poliméricas, pinturas, barnices, etc.

### **Nano Óxido de Zinc**

Nanopartículas que poseen efectos microbicidas, hechas a base de óxido de zinc. Estos nuevos biocidas inorgánicos no causan efectos adversos en la salud o el medioambiente y no crean problemas de resistencia antimicrobiana. Su aplicación estaría en sectores como sistemas de purificación del agua, entorno médico, envases de alimentos o productos textiles.

### **Nano Dióxido de Titanio**

El dióxido de titanio es un material semiconductor, con propiedades fotocatalíticas. El dióxido de titanio al ser expuesto a la luz reacciona de la siguiente manera: los fotones con igual o mayor energía que el hueco existente entre las bandas de conducción y de valencia del material son absorbidos por el material, excitando electrones procedentes de la capa de valencia. Estos electrones reaccionan con las moléculas de oxígeno presentes en el aire, favoreciendo la formación de radicales oxígeno, los cuales actúan como agente oxidante. Los radicales oxígeno pueden romper cadenas carbonadas mediante reacciones de oxidación-reducción, es decir, los compuestos orgánicos (suciedad, microorganismos, etc.) son transformados en dióxido de carbono y agua por estos radicales oxígeno.

El dióxido de titanio se produce en dos formas. La forma principal, que comprende más del 98 por ciento de la producción total, es el pigmento de dióxido de titanio. La forma pigmentaria hace uso de las excelentes propiedades de dispersión de la luz del dióxido de titanio en aplicaciones que requieren brillo y opacidad de blanco. La otra forma en la que se produce el dióxido de titanio es como un producto ultrafino (nanomaterial). Esta forma se selecciona cuando se requieren diferentes propiedades, como la transparencia y la máxima absorción de la luz ultravioleta, por ejemplo, en los protectores solares cosméticos, así como eficacia como un producto de protección contra los organismos fotótrofos en patrimonio histórico.

## CONSOLIDANTES

### Paraloid B-72

El Paraloid B-72 es una resina acrílica (metilacrilato-etilmetacrilato) sólida, suministrada en forma de pequeñas esferas que disuelta en disolventes adecuados puede ser empleada como consolidante además de para usos tradicionales como adhesivo o fijativo.

El Paraloid B-72 es soluble en varios tipos de disolventes:

- Cetonas (acetona, etilmetilcetona)
- Ésteres y éteres (acetato de etilo, acetato de butilo, cellosolve (2-etoxi etanol), dowanol PM (1-metoxi, 2 propanol), etc)
- Hidrocarburos aromáticos (tolueno, xileno y mezclas como el disolvente nitro)
- Hidrocarburos clorurados (cloruro de metileno, cloroetano)

Es insoluble en agua y muy poco en alcohol etílico e hidrocarburos alifáticos. Los disolventes aconsejados, por su baja toxicidad, son acetona (que es muy volátil), acetato de butilo, en caso de que se requiera un bajo nivel aromático se aconseja dowanol PM.

La solución se prepara normalmente con una concentración entre el 2% y el 10% de Paraloid B-72. El disolvente se pone primero en el recipiente y mientras se agita, se le añade la resina hasta obtener una perfecta disolución. Un ligero aumento de la temperatura (hasta 50/60 °C, compatible con el punto de ebullición del disolvente), favorece la solubilización.

La aplicación de la solución de Paraloid B-72 sobre los objetos a consolidar puede hacerse con los sistemas normales usados para barnices como pulverización o brocha. Los mejores resultados se obtienen por inmersión lenta del objeto a consolidar en la solución. De ese modo el consolidante es absorbido por capilaridad del soporte poroso penetrando también en las partes más internas, consolidando el objeto de manera completa y uniforme.

Para eliminar el exceso de resina en la superficie se aconseja siempre dar disolvente puro después de la aplicación, antes del secado. Esto reducirá el riesgo de formación de película y de efecto brillante.

### Regalrez 1126

Estudios recientes realizados sobre posibles sustitutos de las resinas naturales se han centrado en los polímeros de bajo peso molecular, y en particular en las resinas Regalrez, por sus buenas características de resistencia al envejecimiento y de reversibilidad (Clausi et al., 2011). Se trata de resinas alifáticas resultantes de la hidrogenación de los oligómeros obtenidos del vinil-tolueno y alfa-metil-estireno, es justamente con la hidrogenación con la que se estabiliza el producto, reduciendo los dobles enlaces que son los “puntos débiles” de las moléculas, desde donde parte el envejecimiento. Además, la resina no necesita disolventes aromáticos para disolverse, y puede disolverse en mezcla de hidrocarburos desaromatizados como el whitespirit D40 o la esencia de petróleo, característica que no poseen otras resinas acrílicas como el Paraloid B-72.

El Regalrez 1126 no es soluble en agua y en disolventes polares como la acetona o los alcoholes.

La consolidación que proporciona el Regalrez 1126 a la madera degradada es menor que la producida con el Paraloid B-72, pero puede ser suficiente para piezas que no necesiten un

elevado refuerzo. Además, su uso puede ser preferible por las propiedades que posee este consolidante de elevada estabilidad y de facilidad de eliminación.

La característica más interesante del Regalrez 1126 es la posibilidad de obtener soluciones con bajísima viscosidad, incluso con concentraciones de resina del 20%. Para obtener una solución de excepcional penetración, se puede diluir Regalrez 1126 en whitespirit D40 o en esencia de petróleo, en concentraciones variables entre el 10 y el 20%.

Un tratamiento con Regalrez 1126 puede ir seguido de un tratamiento con Paraloid B-72.



Figura II.9. Tratamientos aplicados.

#### 4.3 ENSAYOS DE EFECTIVIDAD

La eficacia de cualquier tipo de tratamiento se determina a través de la medida de alguna característica que sea significativa del objetivo que se quiere conseguir. A la hora de estudiar la eficacia biocida hay que tener en cuenta que esta va a depender de diversas variables (Warscheid, 2000), tales como:

- La especie biológica a tratar.
- El tipo de material sobre el que se aplica.
- La presencia de materiales orgánicos o contaminantes en la superficie.
- El disolvente usado.
- El método de aplicación del biocida.
- La duración del tratamiento
- Las condiciones ambientales (clima, iluminación, temperatura...)

La eficacia de los distintos tratamientos se ha estudiado mediante inspección visual de los organismos en distintos intervalos de tiempo. Se han aplicado una serie de tratamientos biocidas *in situ* y, posteriormente, se han tomado muestras de estas zonas tratadas que se han estudiado en el laboratorio mediante observación de la interfase líquen-sustrato y otras estructuras biológicas por microscopía óptica y electrónica de barrido, estimación de la biomasa fotosintética mediante espectrometría UV-visible, etc.

Para realizar un estudio comparativo de los productos ensayados, se realizaron diferentes ensayos en distintas zonas de la superficie y se analizó la eficacia de los biocidas frente al organismo que se quería eliminar utilizando como parámetro el grado de desaparición de dicho organismo. Los estudios realizados se describen a continuación.

#### **4.3.1 Estudio de la vitalidad de microorganismos fotótrofos al microscopio óptico (OM)**

Para este ensayo, se aplicaron los distintos biocidas *in situ* sobre los organismos a eliminar y, posteriormente, se tomaron muestras para ser observadas al microscopio óptico con el fin de comprobar visualmente el efecto que estos productos provocaban en la vitalidad de las algas y cianobacterias, líquenes, hongos, etc.

#### **4.3.2 Estudio de la interfase liquen-sustrato al microscopio electrónico de barrido (SEM-EDX)**

Para estudiar la eficacia comparativa de los biocidas ensayados sobre las especies biológicas, se tomaron pequeñas muestras de sustrato colonizado por líquenes. Estas muestras se dispusieron de manera oportuna de tal manera que la superficie líquénica quedara en contacto directo con el biocida, durante 30 minutos. El objetivo era simular las papetas, impregnadas del producto, que se aplican comúnmente en restauración a la hora de eliminar líquenes crustáceos, tarea bastante difícil debido a la fuerte adhesión que presentan con el sustrato.

Al microscopio electrónico de barrido (SEM) se observaron la características de las hifas de los líquenes, correspondientes a su parte fúngica, como método para determinar la eficacia de los productos estudiados.

La observación de este material biológico al SEM requiere llevar a cabo un proceso de fijación de la muestra que evita que las células se colapsen, es decir, que mantiene las estructuras turgentes. Por ello, las muestras, antes de la metalización, fueron fijadas y deshidratadas con el fin de evitar modificaciones morfológicas irreversibles (ver apartado 1.3).

Una vez realizada esta preparación, se puede observar la interfase del liquen con el sustrato pétreo, previamente tratado, y ver en qué medida afecta el biocida a las hifas del liquen. Las muestras tratadas con los distintos biocidas se compararon con la muestra control tratada con agua destilada.

#### **4.3.3 Estimación de biomasa fotosintética por espectrofotometría UV-visible.**

Una forma de analizar la efectividad de los biocidas es comparando la cantidad de biomasa antes y después de su aplicación. La cantidad de biomasa se mide indirectamente mediante la cantidad de clorofila presente gracias a la espectrofotometría UV-Visible. Para ello, se realiza la extracción de clorofila  $\alpha$  con dimetilsulfóxido (DMSO) tras la aplicación de los biocidas y se compara con la de un blanco, en el que se aplica agua destilada.

Para poner a punto esta metodología era necesario estudiar cuál era la relación óptima del volumen de extractante con la cantidad de biomasa. Para comprobar en qué medida afecta la cantidad de DMSO en la extracción de la clorofila, se llevaron a cabo dos extracciones por cada muestra, una con un volumen de extractante de 50ml y otra con uno de 100ml. Estos ensayos previos se realizaron en la superficie de un ladrillo 14cm x 28cm cubierto de biomasa fotosintética, proveniente del suelo de los jardines del Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico. Se preparó una zona de estudio con cuadrados de superficie 4cm<sup>2</sup> y cada tratamiento biocida se aplicó en dos de ellos, además de las muestras sin tratar (blanco) (Figura II.10).



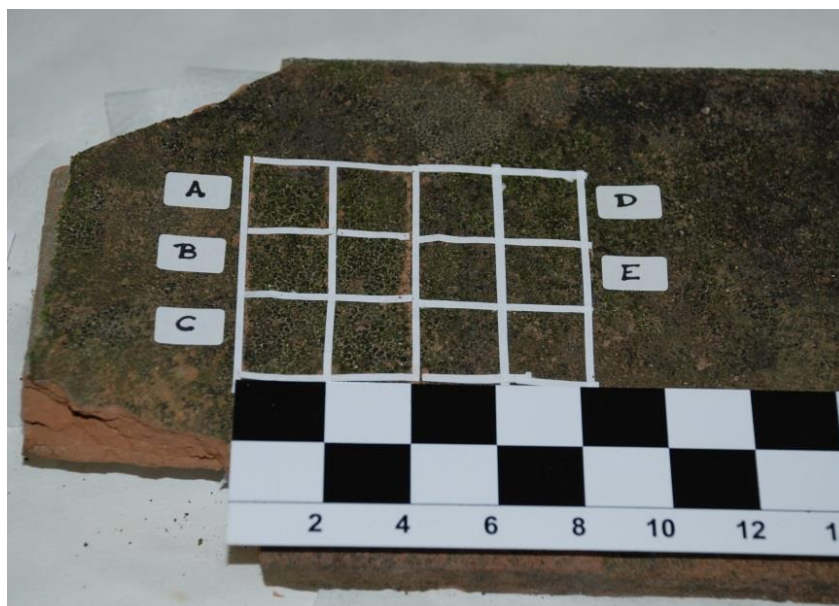


Figura II. 10. Esquema seguido en la aplicación de biocidas.

El procedimiento seguido para la puesta a punto del método fue el siguiente:

1. *Aplicación de los tratamientos biocidas con pincel.* Al cabo de una semana se recogen las muestras de la superficie pétreo de manera mecánica y con cuidado de arrastrar el mínimo sustrato posible, pesándolas.
2. *Extracción de la clorofila.* Para cada tratamiento biocida, a una de las muestras se le añaden 50 ml de DMSO y a la otra 100 ml. De manera que se obtienen 5 muestras con 50 ml de DMSO y otras 5 con 100 ml del solvente. Se calienta a 65 °C durante 1 hora y se filtra con filtros ALBET 145 el tiempo necesario.
3. *Cuantificación de la clorofila.* Para calcular la cantidad de clorofila  $\alpha$  presente en una muestra se utiliza la fórmula de Wollemweider, la cual requiere de mediciones de absorbancia. El procedimiento para medir la clorofila  $\alpha$  es el siguiente:

- Medir absorbancia del extracto obtenido a 665 nm y 750 nm.
- Acidificar con HCl en la relación: 5  $\mu$ l HCl / 1 ml muestra.
- Esperar 10 minutos y volver a medir absorbancia a 665 nm y 750 nm.
- Aplicar la fórmula de Wollemweider según la Ecuación II.8 (Aira, 2007):

$$\text{masa Clorofila } \alpha \text{ (}\mu\text{g)} = 28'917 * V * (\Delta\text{Abs} - \Delta\text{Abs}') / L \quad \text{Ec. II.8}$$

V Volumen del extractante usado

$\Delta\text{Abs}$  (Abs665 – Abs750) antes de acidificar

$\Delta\text{Abs}'$  (Abs665' – Abs750') después de acidificar

L longitud de la cubeta de medida en centímetros. Normalmente es 1 cm.

Tras evaluar el efecto que la cantidad de volumen de DMSO produce en la extracción de clorofila, comparando resultados con 50 ml y 100 ml de este extractante, se obtienen los resultados mostrados en la Tabla II.2. Se observa que, modificando solo el volumen de extractante, los resultados no son fiables. Es necesario relacionar la cantidad de DMSO con la cantidad de biomasa de la muestra. Se considera que aplicar 2 ml DMSO/mg de muestra es lo más oportuno, es decir, el volumen del extractante es diferente en cada caso. Por lo tanto, por cada mg de muestra biológica, previamente triturada, se le añaden 2 ml de DMSO.

Tabla II.2. Estudio de la influencia del volumen de DMSO en el cálculo de clorofila  $\alpha$  para evaluación de efectividad biocida.

Muestra	V DMSO	A665	A750	$\Delta$ Abs	A'665	A'750	$\Delta$ Abs'	$\Delta$ Abs- $\Delta$ Abs'	$\mu\text{g Chl}\alpha$
Preventol Ri80	50 ml	0,0746	0	0,0746	0,0554	0,0158	0,0396	0,035	50,60
	100 ml	0,0683	0	0,0683	0,0781	0,0621	0,016	0,0523	151,24
New Des	50 ml	0,1641	0,0054	0,1587	0,0759	0	0,0759	0,0828	119,72
	100 ml	0,1221	0,0105	0,1116	0,0636	0,0073	0,0563	0,0553	159,91
Biotin T	50 ml	0,1481	0,0056	0,1425	0,0825	0,0039	0,0786	0,0639	92,39
	100 ml	0,1262	0	0,1262	0,062	0,0018	0,0602	0,066	190,85
Biotin R	50 ml	0,1511	0	0,1511	0,07	0,0014	0,0686	0,0825	119,28
	100 ml	0,0563	0	0,0563	0,0213	0	0,0213	0,035	101,21
Agua destilada	50 ml	0,3194	0,0116	0,3078	0,1538	0,0119	0,1419	0,1659	239,87
	100 ml	0,1719	0	0,1719	0,0769	0	0,0769	0,095	274,71

#### 4.3.4 Capacidad de eliminación o reducción del crecimiento de especies de hongos filamentosos y de pudrición.

Para comprobar la eficacia de los biocidas para la eliminación de los hongos filamentosos y de pudrición se ha realizado el siguiente estudio. Se han inoculado probetas, de distintas especies de madera, con una suspensión de microorganismos procedentes de maderas constituyentes de dos de los bienes culturales objeto de estudio, las bóvedas de la Sala de los Reyes de la Alhambra de Granada y el trasdós de la cúpula central de la *Maqsura* de la Mezquita de Córdoba. Dichas muestras de madera han permanecido en desecador a una humedad relativa del 90%, controlada por medio de una disolución saturada de cloruro de bario, lo que ha favorecido la aparición y desarrollo de hongos de pudrición y hongos filamentosos. Las muestras de madera de la Alhambra estuvieron en el desecador durante siete años y las de la Mezquita durante un año.

Se han realizado dos estudios: uno de carácter preventivo, con aplicación de los biocidas previamente a la inoculación, cuyo propósito es estudiar el posible carácter preventivo de los mismos; y otro con aplicación de los biocidas tras la inoculación con especies fúngicas, para analizar su poder de erradicación.

##### **Identificación de hongos filamentosos y de pudrición.**

El primer paso es identificar las especies de hongos de pudrición y hongos filamentosos que han crecido en las muestras de madera de la Sala de los Reyes de la Alhambra. Para ello, estos hongos obtenidos se han cultivado en placas de Petri con un medio de Glucosa Sabouraud Agar durante siete días, en una cámara climática a 27 °C (figura II.11). Así mismo, una de las placas de cultivo se ha mantenido a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C), a una humedad relativa del 90%, durante el mismo tiempo.

Para la identificación de las especies fúngicas se han usado diversas técnicas como la estereomicroscopía, la microscopía óptica y la microscopía electrónica de barrido. Además, para completar el estudio, estos microorganismos se identificaron mediante técnicas de biología molecular.





Figura II.11 Crecimiento de hongos en placas de Petri para posterior identificación.

***Probetas de maderas de estudio.***

Se han empleado probetas de cuatro especies de maderas diferentes (Figura II.12), las previamente identificadas como *Cedrela* sp., *Pinus* sp., *Quercus* sp. y *Ulmus* sp., sin que hayan recibido ningún tipo de tratamiento previo.



Figura II.12 Fotografía de las maderas en estudio.

***Eficacia de tratamientos biocidas. Carácter preventivo.***

En este estudio se ha analizado la eficacia de cuatro fungicidas diferentes: los azoles Voriconazol y Tiabendazol, y las nanopartículas de óxido de cobre (CuO) y óxido de zinc (ZnO).

Las probetas de madera han sido tratadas con los biocidas y posteriormente inoculadas con una solución elaborada mediante agua esterilizada y la mezcla de las especies fúngicas encontradas.

Estas probetas ya inoculadas se han situado en placas de Petri (siguiendo la disposición mostrada en el esquema de la figura II.13) con un medio de cultivo agar extracto de malta (AEM), el cual es adecuado para el crecimiento y desarrollo de especies fúngicas (De Filpo et al., 2013). Han sido necesarias 15 probetas de dimensiones 5x10x20 mm de cada madera, ya que se han empleado tres probetas de cada especie de madera por tratamiento, más las de control lo que hace un total de 20 placas y, por lo tanto, 60 probetas.

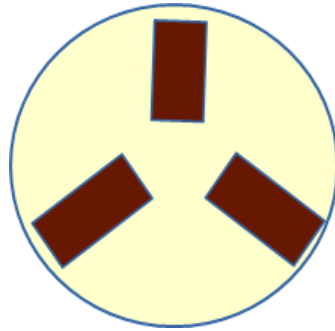


Figura II.13. Esquema de una placa de Petri con probetas de madera de una misma especie, tratadas con un biocida.

Para analizar la capacidad preventiva de los biocidas, se hizo un seguimiento del crecimiento de especies fúngicas en la placa, mediante análisis digital de imagen usando el programa Adobe Photoshop CC (2015), evaluando el porcentaje de colonización de la placa. Con este fin, se realizaron fotografías transcurridos 1, 3 y 7 días desde la inoculación (Figura II.14). El biocida más eficaz fue aquel cuyo resultado mostraba un menor crecimiento de hongos filamentosos y de pudrición en las placas, ya que había impedido o reducido el desarrollo de estos en mayor grado que en el resto de los biocidas analizados.



Figura II.14. Toma de imagen fotográfica para evaluar el crecimiento fúngico tras la aplicación de biocidas.

**Eficacia de tratamientos biocidas. Carácter curativo.**

Una vez evaluada la eficacia biocida con respecto a su carácter preventivo, es decir, aplicando los productos antes de la colonización de hongos, se pretendía estudiar su capacidad biocida con respecto a los hongos existentes en muestras ya colonizadas y así observar su poder de eliminación.

Para ello, se tomaron tres probetas de madera de cada una de las especies en estudio (*Cedrela* sp., *Pinus* sp., *Quercus* sp. y *Ulmus* sp.) y se inocularon con las especies fúngicas encontradas en la Sala de los Reyes de la Alhambra sumergiéndolas en una suspensión de dichos hongos.

Las probetas inoculadas se colocaron en placas de Petri con medio de cultivo de Glucosa Sabouraud Agar (GSA) y se introdujeron durante un periodo de 21 días en un desecador con una humedad relativa del 90% (conseguida con una solución salina saturada de cloruro bórico) con una temperatura ambiental de (20-24 °C), con el objetivo de favorecer el crecimiento de las especies fúngicas (Figura II.15).



Figura II.15. Probetas de madera en el desecador para favorecer el crecimiento de especies fúngicas.

Transcurrido dicho tiempo, las probetas de madera ya colonizadas se sometieron al tratamiento biocida. Se emplearon tres probetas de cada especie de madera por biocida (Voriconazol, Tiabendazol, nanopartículas de óxido de cobre y de óxido de zinc) más el agua destilada, que se emplea como control. Los biocidas se aplicaron por inmersión durante una hora. Posteriormente, las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, las probetas se colocaron en placas de Petri con un medio de agar extracto de malta (AEM) y se introdujeron en el desecador a las mismas condiciones anteriormente explicadas.

Para estudiar la eficacia de los biocidas se realizaron fotografías de las placas a los días 1, 4 y 7 de la inoculación, ya que se pretendía analizar el porcentaje de crecimiento de los hongos filamentosos y de pudrición en la placa mediante un programa de análisis de imagen (Adobe Photoshop CC 2015).

El biocida más eficaz fue aquel cuyo resultado implicaba un menor crecimiento de hongos filamentosos y de pudrición en las placas, ya que había impedido el desarrollo de éstos en mayor grado que el resto de los biocidas analizados.

#### **4.4 ENSAYOS DE COMPATIBILIDAD. ENSAYOS DE INTERFERENCIA PRODUCTO-SUSTRATO**

El objetivo de este estudio fue verificar si existía algún efecto indeseado tras la aplicación de los tratamientos sobre los materiales, utilizando diversos ensayos y métodos de aplicación de los productos (Sameño Puerto et al., 1996). Así pues algunas de las características de dichos materiales se determinaron antes y después del tratamiento de conservación.

Por un lado, se procedió a la preparación de los productos en dosis determinadas para los distintos tratamientos. Posteriormente, se aplicaron sobre los materiales en estudio y se procedió a realizar las observaciones y mediciones correspondientes.

Teniendo en cuenta que, al trabajar con patrimonio histórico, no siempre se puede disponer de material suficiente para realizar un gran número de determinaciones, en cada capítulo el número de ensayos a realizar difiere ya que, en cada caso, se han realizado tantos ensayos como ha sido posible. En algunos casos debido al pequeño tamaño de las probetas y a su forma irregular no se han podido realizar ensayos de determinación de propiedades hídricas (absorción de agua por capilaridad), pero sí se ha estudiado cómo afectan los productos a su porosidad abierta, así como las variaciones de color que pudieran ocasionar. Además, se observaron las probetas al microscopio electrónico de barrido una vez tratadas con los biocidas y otros tratamientos para analizar posibles cambios morfológicos y/o estructurales en superficie.

##### **4.4.1 Estudio al SEM-EDX**

La microscopía electrónica de barrido es una técnica muy valiosa para el estudio de diversos mecanismos responsables de la alteración de la piedra como son la formación y crecimiento de cristales en la superficie tras el tratamiento, y la corrosión, lavado o disolución de constituyentes minerales como consecuencia de las soluciones ácidas.

Una ventaja adicional de este método se basa en la posibilidad de realizar microanálisis, en una zona o punto previamente seleccionados, mediante un detector de espectrometría de energía dispersada (ICR-CNR, 1981).

Para ver el efecto que produce la interacción de las distintas soluciones biocidas con el material pétreo, se procede a la observación de la superficie de las muestras tratadas al microscopio electrónico de barrido (SEM). Para ello, se obtiene una superficie lisa y pulida de la piedra y se introduce por inmersión en el biocida durante 48 horas. Posteriormente, se dejan secar completamente a temperatura ambiente para su observación al SEM para ver si se han producido cambios.

Con respecto a la madera, se aplicaron biocidas y consolidantes por inmersión y se observa su interacción con la superficie del material.

En el caso de los materiales pictóricos, resulta fundamental comprobar si se ha producido algún cambio en la composición química de los pigmentos tratados. Para ello, se han utilizado las probetas elaboradas por el IAPH que reproducen la secuencia pictórica presentes en las distintas pinturas

Para el estudio de las muestras se han preparado estratigrafías (ver Bloque II, apartado 2.3) de las pinturas de las réplicas antes y después de la aplicación de las distintas soluciones biocidas en cada uno de los pigmentos (colores). Se han ensayado los colores rojo y azul, por ser, en los casos estudiados, considerados los más reactivos, debido a su composición química.

#### 4.4.2 Colorimetría

Para evaluar los posibles cambios de color ocasionados en el material pétreo tras los tratamientos con biocidas (Preventol Ri80, Newdes, Biotin R y Biotin T), se utiliza la técnica de colorimetría explicada anteriormente (ver apartado 1.10).

También se ha empleado la colorimetría para observar posibles cambios de color (Figura II.16) en las muestras de madera estudiadas y los distintos materiales que compone las réplicas de las pinturas de la Sala de los Reyes, tratadas con los distintos biocidas usados en ellas.

Así mismo, se ha estudiado el cambio de color causado en las maderas con los biocidas y consolidantes usados en la *Maqsura* de la Mezquita de Córdoba. Y por último, se ha realizado también este estudio en las probetas de pinturas murales de la *Maqsura* tratadas con biocidas.

Para evaluar la posible interacción de estos productos con los diferentes soportes, se han realizado tantas medidas en cada muestra como ha sido posible según el tamaño, calculando después la media.



Figura II.16. Mediciones de colorimetría en las muestras de madera.

#### 4.4.3 Porosidad

Una manera de comprobar si el biocida ataca a la integridad de la piedra es calculando su porosidad abierta (ver figura II.17). Para ello se sigue lo dictado en la norma UNE-EN 1936 (2007), sometiendo las muestras al ensayo de absorción de agua a vacío antes y después de aplicarles los biocidas (ver apartado 1.11).



Figura II.17. Pesada hidrostática de probetas de ataurique para medir la porosidad abierta.

#### 4.4.4 Velocidad de propagación por ultrasonidos

Este ensayo se realizó para comprobar si los tratamientos afectan de alguna manera a los materiales sobre los que se han aplicado. Para ello se midió la velocidad de transmisión de ultrasonidos que está relacionada directamente con la compacidad del material trabajando con un emisor y un receptor a frecuencias bajas.

Para la realización de este ensayo se dispuso de un equipo STEINKAMP BP5 (KRAUFTKRAMER) de escala entre 0,1 y 999,9 microsegundos, cuya precisión es de  $\pm 1$  microsegundo (ver apartado 1.12). En este caso se han utilizado palpadores cilíndricos, ya que estos se adaptan mejor a la superficie plana de las probetas, y se ha empleado una frecuencia de 40 KHz.

#### 4.4.5 Absorción de agua por higroscopicidad

Es la propiedad higroscópica de la madera la que le otorga capacidad para que con relativa facilidad pueda absorber y eliminar humedad en relación con el ambiente en que se encuentre.

A estos dos fenómenos se les denomina sorción y desorción respectivamente y ocasionan hinchazón o merma de la madera. La sorción se produce cuando la madera está más seca que el ambiente que la rodea absorbiendo el vapor de agua hasta su equilibrio. Esta sorción se ve incrementada bajo unas condiciones de temperatura alta al producirse una mayor cantidad de vapor de agua ambiental.

En una madera se establece siempre un equilibrio entre la humedad (HR) contenida en el aire que rodea la madera y el grado de humedad de esta última cuando transcurre el tiempo necesario. Cuando se llega a este estado se dice que ha alcanzado el equilibrio higroscópico, y el grado de humedad adquirido entonces por la madera se llama humedad límite o de saturación.

Generalmente las maderas blandas que crecen en zonas húmedas tienen más cantidad de agua que las duras. Esta se concentra principalmente en las células de la corteza y la albura (huecos y membranas celulares) de maderas sin cortar y en las membranas celulares de las maderas cortadas.



En una madera que ha sido cortada y secada, la humedad solo se encuentra en las membranas celulares, y la que había en los huecos ya ha desaparecido.

Para realizar este ensayo se han usado desecadores cerrados herméticamente con agua en su parte inferior, en los que se ha hecho el vacío para poder alcanzar una humedad relativa del 100% y así saturar la madera. Las probetas han estado en esta atmósfera saturada de humedad durante 20 días, tras lo cual se ha determinado la cantidad de agua absorbida.

#### 4.4.6 Dureza superficial

La dureza de las probetas de madera, tras la aplicación de los distintos tratamientos se ha determinado mediante un ensayo conocido como ensayo de dureza Brinell, basado en la aplicación de una carga concentrada en un punto (ver apartado 1.13). Figura II.18.

En el ensayo se definieron dos caras de las probetas (T y D) y se tomaron 10 medidas por cada cara, calculando posteriormente el valor medio.



Figura II-18. Medida de la dureza superficial.

#### 4.4.7 Envejecimiento acelerado

El ensayo de alteración acelerada que se ha realizado en las probetas de madera es de tipo termohigrométrico, compuesto por ciclos de 24 horas formados por dos fases, una de humectación de las probetas y otra de secado. Se prepara una cubeta a la que se añade agua hasta que quede cubierta la base por completo, colocándose las probetas en el interior de forma que la cara inferior esté en continuo contacto con el agua (Figura II.19). Después de aproximadamente seis horas de absorción del agua, se introducen en una estufa a 80°C durante 18 horas para su secado completo. En cada ciclo se añade agua a la cubeta para evitar la interrupción del proceso de absorción. Se repite durante 20 ciclos sin que se llegue a sumergir la madera, para que el agua sea absorbida por capilaridad.

Durante el ensayo se controla el peso de las probetas en cada ciclo y se observa visualmente si aparecen alteraciones, como roturas, hinchazón, grietas, desprendimientos, etc.

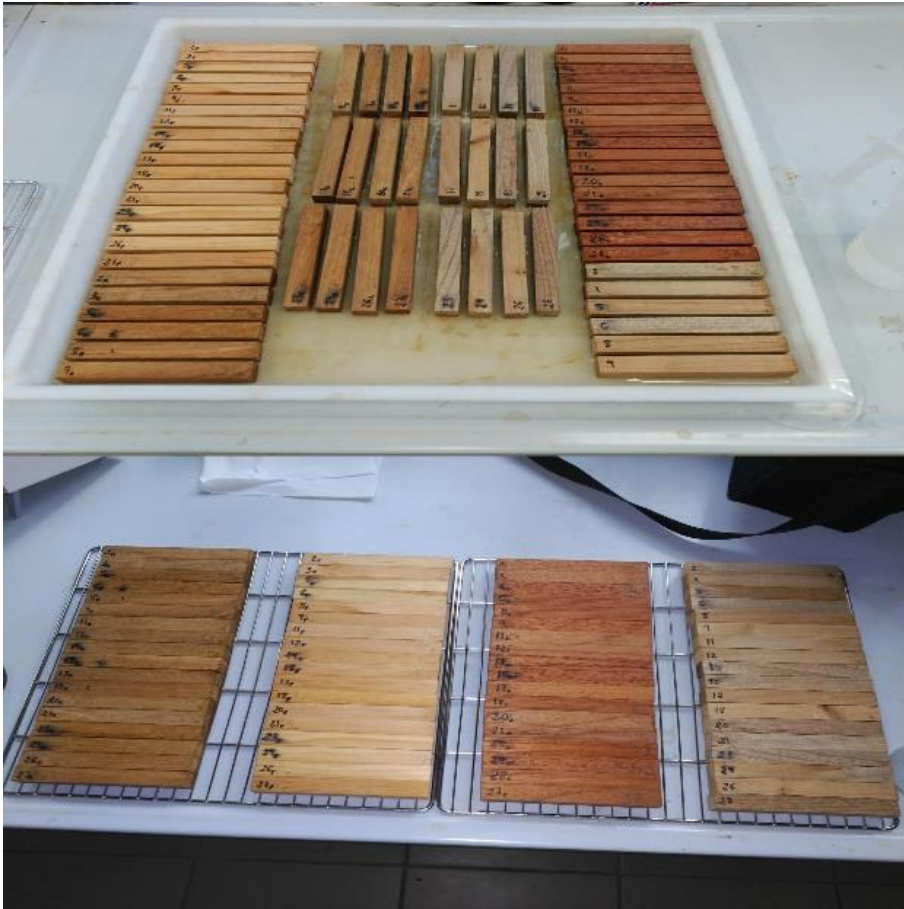


Figura II.19. Probetas de madera durante el ensayo de alteración: fases de humectación y secado.



## **BIBLIOGRAFÍA**



- AGAROSSO, G.; FERRARI, R.; DEL MONTE, M. (1984). *La Basilica di St. Clemente: Studi sul biodeterioramento*. Scientific Methodologies Applied to Works of Art: 52-56.
- AIRA, N. (2007). *Pátinas oscuras sobre rocas graníticas: Génesis y composición*. Universidade de Santiago de Compostela. Servizo de publicacións e intercambio científico.
- ALCALDE MORENO, M.; MARTÍN PÉREZ, A. (1996). *Indicadores de alteración de los materiales pétreos. Propuesta de una terminología*. Boletín del Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico, 15: 68.
- ALCALDE, M.; VILLEGAS, R.; VALE, J.; MARTÍN, A. (1990). *Diagnosis y Tratamiento de la Piedra. I. La alteración de la piedra en los monumentos. II. Consolidantes e hidrófugos. Productos para el tratamiento de materiales pétreos*. ICC E. Torroja (CSIC), Monog. nº 400, Madrid. 87 pp.
- ALEJANDRE, F.J.; VILLEGAS, R. (2009). *Estudio de la alterabilidad y efecto de tratamientos de conservación para los ladrillos de la portada de la iglesia de Santa María de Jesús (Sevilla)*. Materiales de Construcción. Vol. 59, 293: 85-103.
- ALLSOPP, D.; SEAL, K. (1986). *Introduction to biodeterioration*. Edward Arnold, London.
- ALLSOPP, D.; SEAL, K.; GAYLARDE, C. (2004). *Introduction to biodeterioration*. Cambridge University Press.
- ALONSO RODRÍGUEZ, F.J. (2010). *Propiedades físicas: densidad y porosidad*. Departamento de Geología (Petrología y Geoquímica). Universidad de Oviedo.
- ÁLVAREZ, F.; GONZÁLEZ, G.; GUZMÁN, R.; MOHAMED, S.; MERINO, S.; FIGUEROA, F. L. (2015). *Utilización de distintas combinaciones espectrales e intensidades lumínicas de lámparas LEDs para el estudio de la actividad fotosintética en algas que pueden producir biodeterioro del Patrimonio Cultural*. Estudio y Conservación del Patrimonio Cultural. Actas, Málaga: 179-183.
- AMADOR DE LOS RÍOS J.; AMADOR DE LOS RÍOS, R. (1879). *Monumentos latino-bizantinos de Córdoba*, (Madrid: 1879).
- ARIÑO, X.; ORTEGA-CALVO, J. J.; GÓMEZ-BOLEA, A.; SÁIZ-JIMÉNEZ, C. (1995). *Lichen colonization of the Roman pavement at Baelo Claudia (Cádiz, Spain): biodeterioration vs. bioprotection*. The Science of the Total Environment, 167: 353-363.
- ASCASO, C.; OLLACARIZQUETA, M. A. (1991). *Structural relationship between lichens and carved stonework of Silos monastery, Burgos, Spain*. International Biodeterioration, 21: 337-349.
- ASCASO, C.; WIERZCHOS, J.; SOUZA-EGIPSY, V., DE LOS RÍOS, A.; DELGADO RODRIGUEZ, J. (2002). *In situ evaluation of the biodeteriorating action of microorganisms and the effects of biocides on carbonate rock of the Jerónimos Monastery (Lisbon)*. International Biodeterioration and Biodegradation, 49: 1-12.
- ASCASO, C.; GARCÍA DEL CURA, MA.; DE LOS RÍOS, A. (2004). *Microbial biofilms on carbonated rocks from a quarry and monuments in Novelda (Alicante, Spain)*. In: L.L. St. Clair, M.R.D. Seaward (Eds.). Biodeterioration of stone surfaces. Lichens and biofilms as weathering agents of rocks and cultural heritage, 79-98. Dordrecht: Kluwer Academic Press.

ASHURST, J. 1998. *The cleaning and treatment of limestone by the lime method*. In Conservation of Building and Decorative Stone, ed. J. Ashurst and F. G. Dimes, vol. 2, 169-76. Butterworth-Heinemann Series in Conservation and Museology. London and Boston: Butterworth-Heinemann.

BAGLIONI, R. (2014). *Las Pinturas de la Sala de los Reyes: Preparación de probetas para el ensayo de los productos de tratamiento*. Informe IAPH.

BARCELLONA-VERO, L.; BETTINI, C.; MONTE SILA, M. (1976). *Chemoautotrophic microorganisms in semi-insulated environment*. Proceedings of 2nd International Symposium on the Deterioration of Building Stones, Athens, 61-65.

BARCELLONA-VERO, L.; TABASSO LAURENZI, M. (1982). *La fontana del Tritone di L. Bernini a Roma: Un esempio di alterazione legato a fattori chimici, biologici e ambientali*. Deterioration and Preservation of Stone, Proceeding of the 3rd International Congress: 511-516.

BARIDON, M.A. (2012). *Métodos de extracción y purificación de ácidos nucleicos*. Laboratorio de Virología y Biología Molecular. HIGA Rossi La Plata.

BARQUÍN SAINZ DE LA MAZA, P.; TERRÓN ALFONSO, A. (1997). *Lichen communities in the cathedral of Leon*. Aerobiologia 13: 191-197.

BARTOLINI, M.; PIETRINI, A.M.; RICCI, S. (2007). *Valutazione dell'efficacia di alcuni nuovi biocidi per il trattamento di microflora fotosintética e di briofite su materiali lapidei*. Bolletino ICR. Nuova Serie 14, 101-111.

BERNIS MATEU, J. (1974). *Principales insectos xilófagos de la Península. Reconocimiento y prevención*. De re restauratoria, vol. 2. IV y V cursos de conservación y restauración de monumentos y ambientes. Universidad Politécnica de Barcelona, Barcelona.

BLANCA, G.; CABEZUDO, B.; CUETO, M.; FERNÁNDEZ LÓPEZ, C.; MORALES TORRES, C. (2009, eds.). *Flora Vasculare de Andalucía Oriental*, 4 vols. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla. ISBN obra completa: 978-84-92807-12-3.

BLETCHLY, J. D. (1967). *Insect and marine borer damage to timber and woodwork. Recognition, prevention and eradication*. Her Majesty's Stationery Office, London.

BLOOM, J.M. (1988). *The Revival of Early Islamic Architecture by the Umayyads of Spain, The Medieval Mediterranean*. Cross-Cultural Contacts, Minnesota: 35-41.

BOLÍVAR, F.; SÁNCHEZ-CASTILLO, P.M. (1997). *Biomíneralization processes in the Fountains of the Alhambra (Granada, Spain)*. International Biodeterioration & Biodegradation: 205-215.

BOLÍVAR, F.; SÁNCHEZ-CASTILLO, P.M. (1998). *Biodeterioro del Patrimonio artístico por cianobacterias, algas verdes y diatomeas*. Boletín del Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico, 24: 52-53.

CAI, Y.P.; WOLK C.P. (1990). *Use of a conditionally lethal gene in Anabaena sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences*. Journal of Bacteriology, 172(6):3138-3145.

CÁMARA, B.; DE LOS RÍOS, A.; GARCÍA-DEL-CURA, M. A.; GALVÁN, V.; ASCASO, C. (2008). *Biorreceptividad de las dolomías a la colonización fúngica*. Materiales de construcción, 58: 289-290.

- CÁMARA, B; DE LOS RÍOS, A; URIZAL, M; ÁLVAREZ DE BUERGO, M; VARAS, M.J; FORT, R; ASCASO, C. (2011). *Characterizing the microbial colonisation of a dolostone quarr: Implications for Stone biodeterioration and response to biocide treatment*. *Microbial Ecology*, 62: 299-313.
- CANEVA, G.; DE MARCO, G.; PONTRANDOLFI, M.A. (1993). *Plant communities on the walls of Venosa castle (Basilicata, Italy) as biodeteriogens and bioindicators*. *Conservation of stone and other materials*, 1: 263-270. (M.J.Thiel). Rilem, London.
- CANEVA, G.; NUGARI, M. P.; SALVADORI, O. (1994). *La biologia nel Restauro*. Nardini Editore, Firenze.
- CANEVA, G.; NUGARI M.P.; SALVADORI, O. (1996). *Il controllo del degrado biologico*. Nardini Editore , Firenze.
- CANEVA, G; NUGARI, M.P.; SALVADORI, O. (2000). *La biología en la restauración*. Editorial NEREA.
- CANEVA, G.; NUGARI, M.P.; SALVADORI, O. (2005). *La biologia Vegetale per i beni culturali. Biodeterioramento e Conservazione*. Nardini Editore , Firenze.
- CANEVA, G.; NUGARI, M.P.; RICCI, S.; SALVADORI, O. (1992). *Pitting of marble Roman Monuments and the related microflora*. 7th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone: 521-530.
- CARRILLO-GONZALEZ, R.; MARTINEZ-GOMEZ, M.A.; GONZALEZ-CHAVEZ, M.D.A.; HERNANDEZ, J.C.M. (2016). *Inhibition of microorganisms involved in deterioration of an archaeological site by silver nanoparticles produced by a green synthesis method*. *Science of the Total Environment*, 565: 872-881.
- CASAS SICART, C.; SAIZ JIMÉNEZ, C. (1982). *Los briofitos de la Catedral de Sevilla*. *Collectanea Botanica*, 13 (1): 163-175.
- CIARALLO, A.; FESTA, L.; PICCIOLI, C.; RANIELLO, M. (1985). *Microflora action in the decay of stone monuments*. Vth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone, Lausanne, 2: 607-615.
- CHINERY, M. (1977). *Guía de campo de los insectos de España y de Europa*. Omega, Barcelona.
- CLAUSEN, C.A.; YANG, V. (2007). *Protecting wood from mould, decay, and termites with multi-component biocide systems*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59: 20-24.
- CLAUSI, M.; CRISCI, G. M.; LA RUSSA, M. F.; MALAGODI, M.; PALERMO, A.; RUFFOLO, S. A. (2011). *Protective Action against fungal growth of two consolidating products applied to wood*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 12: 28-33.
- CRISCI, G.M.; La Russa, M.F.; MALAGODI, M.; RUFFOLO, S.A. (2010). *Consolidating properties of Regalrez 1126 and Paraloid B72 applied to Wood*. *Journal of Cultural Heritage* 11: 304-308.
- CONTRERAS, R. (1875). *Ligero Estudio sobre las pinturas de la Alhambra*. Imprenta de S. Noguera a cargo de M. Martínez. Madrid.
- DANIELE, V.; TAGLIERI, G. (2010). *Nanolime suspensions applied on natural lithotypes: The influence of concentration and residual water content on carbonatation process and on treatment effectiveness*. *Journal of Cultural Heritage* 11 (1): 102–6.

- DE FILPO, G.; PALERMO, A.M.; RACHIELE, F.; NICOLETTA, F. P. (2013). *Preventing fungal growth in wood by titanium dioxide nanoparticles*. International Biodeterioration & Biodegradation, 85: 217-222.
- DE LOS RÍOS, A.; ASCASO, C. (2005). *Contribution of in situ microscopy to current understanding of stone biodeterioration process*. International Microbiology, 8: 181-188.
- DE LOS RÍOS, A; CÁMARA, B; WIERZCHOS, J; ASCASO, C. (2008). *Diagnóstico de procesos de biodeterioro por combinación de microscopía in situ y técnicas de biología molecular*. In: Saíz Jiménez y Rogelio Candellera (Eds). La investigación sobre Patrimonio Cultural: 183-195.
- DE LOS RÍOS, A.; CÁMARA, B; DEL CURA, M; A, RICO, V; GALVÁN, V; ASCASO, C. (2009). *Deteriorating effects of lichen and microbial colonization of carbonate building rocks in the Romanesque churches of Segovia, Spain*. Science of the Total Environment, 407: 1123-1134.
- DE LOS RÍOS, A.; PÉREZ-ORTEGA, S; WIERZCHOS, J; ASCASO, C. (2012). *Differential effects of biocide treatments on saxicolous communities: Case study of the Segovia cathedral cloister (Spain)*. International Biodeterioration and Biodegradation, 67: 64-72. Elsevier.
- DE TAGLE, A. (2008). El papel de las ciencias en la preservación del patrimonio cultural: la situación en Europa. Bienes culturales: Revista del Instituto de Patrimonio Histórico Español, Nº 8: 27-36.
- DEL ROSAL PADIAL, Y.; BAENA, C.; HERNÁNDEZ MARINÉ, M.; ROLDÁN MOLINA, M. (2014). *Phototrophic microorganism in the touristic cave of Nerja*. Proceedings of International Congress on Cultural Heritage, Science and Technology, Seville: 71.
- DELGADO-RODRIGUES, J.; GROSSI, A. (2007). *Indicators and ratings for the compatibility assessment of conservation actions*. Journal of Cultural Heritage 8: 32-43.
- DOEHNE, E.; PRICE, C.A. (2010). *Stone conservation. An overview of current research*. 2<sup>nd</sup> ed. The Getty Conservation Institute. Los Angeles. 158 pp.
- DURRANT L.R. (1996). *Biodegradation of lignocellulosic materials by soil fungi isolated under anaerobic conditions*. International biodeterioration and biodegradation, 37: 189-195.
- DURRELL, L. W. (1959). *Some Studies of Emericellopsis*. Mycologia, 51, No. 1: 31-43.
- ELOSEGI, A; SABATER, S. (EDS) (2009). Conceptos y técnicas de ecología fluvial. Fundación BBVA.
- ERNIZ MADRAZO, C. (1982). *Las pinturas de la Sala de los Reyes de la Alhambra de Granada: los asuntos, los trajes, las fechas*. Cuad. Alhambra 18: 21-50.
- ESBERT, R.M.; ORDAZ, J.; ALONSO, F.J.; MONTOTO, M. (1997). *Manual de diagnosis y tratamiento de materiales pétreos y cerámicos*. Col·legi d'Aparelladors i Arquitectes Tècnics de Barcelona. 126
- ESPINOSA, J; GUTIERREZ, F; VILLEGAS-SÁNCHEZ, R. (1996). *Estudio de indicadores y mecanismos de alteración de los atauriques del muro de fondo del Salón Rico de Medinat Al-zahra. Córdoba*. Actas del III Congreso Internacional de Rehabilitación del Patrimonio Arquitectónico. Congreso Internacional de Rehabilitación del Patrimonio Arquitectónico y Edificación: 530-533. Granada.

ESPINOSA, J. (2015). Informe: *Caracterización de materiales cerámicos de la portada de Niculoso Pisano del convento de Santa Paula (Sevilla)*. Área de Laboratorios. Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico.

EYSSAUTIER-CHUINE, S.; VAILLANT-GAVEAU, N.; GOMMEAUX, M.; THOMACHOT-SCHNEIDER, C.; FLECK, J.; FRONTEAU, G. (2015). *Efficacy of different chemical mixtures against green algal growth on limestone: A case study with *Chlorella vulgaris**. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103: 59-68.

FAGES SANTANA, E. (2013). *Investigación de fibras de polipropileno aditivadas con nanopartículas de plata para la mejora de propiedades bioactivas en el sector textil*. Tesis doctoral, Universitat Politècnica de Valencia.

FANELLI, C.; FABRI, A.A.; RICCELLI, A.; CARPITA, A.; ROSSI, R. (2001). *Effect of new synthetic antifungal compounds on the growth of fungi which are responsible for paper deterioration*. In: *Metodi Chimici, Fisici e Biologici per la salvaguardia dei beni culturali*, AICAT & GICAT, Roma: 105-111.

FAVERO-LONGO, S. E.; BENESPERI, R.; BERTUZZI, S.; BIANCHI, E.; BUFFA, G.; GIORDANI, P.; LOPPI, S.; MALASPINA, P.; MATTEUCCI, E.; PAOLI, L.; RAVERA, S.; ROCCARDI, A.; SEGIMIRO, A.; VANNINI, A. (2017). *Species-and site-specific efficacy of commercial biocides and application solvents against lichens*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 123: 127-137.

FIGUEROA, F.L.; GUZMÁN, R.; ÁLVAREZ-GÓMEZ, F.; GONZÁLEZ, G.; MOHAMED, S.; CELIS PLA, P.; DEL ROSAL, Y.; HERNÁNDEZ-MARINÉ, M.; MERINO, S. (2015). *Procedimiento bio-óptico basado en los espectros de acción de la fotosíntesis y lámparas LEDs para el control del biodeterioro por biofilms de algas y cianobacterias*. *Estudio y Conservación del Patrimonio Cultural*. Actas, Málaga: 174-178.

FRANQUELO ZOFFMANN, M. L. (2008). Informe: *Caracterización de materiales constitutivos de las pinturas sobre cuero de la Bóveda 2*. Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico.

FRECKMAN, D.W.; MANKAU, R.; FERRIS, H. (1975). *Nematode Community Structure in Desert Soils: Nematode Recovery*. *Journal of Nematology*, 7(4): 343- 346.

FRECKMAN, D.W. (1978). *Ecology of anhydro-biotic soil nematodes*. *Dried biological systems*. Academic Press, New York: 345- 357.

FUENTES-GONZÁLEZ, P. (2013). *Bóvedas de arcos entrecruzados entre los siglos X y XVI. Geometría, construcción y estabilidad*. Tesis. Univ. Politécnica de Madrid.

GALVÁN, V.; DE LOS RÍOS, A.; ASCASO, C. (2006): *Reevaluating the cultural value of Segovia's Romanesque churches*. In: Fort, R, Álvarez de Buergo, M; Gómez Heras, M; Vázquez-Calvo, C. (Eds) *Heritage, Weathering and Conservation*, London: 305-310. Taylor and Francis.

GARCÍA, S.; MARTÍN, A. (1996 a). *Los organismos vivos como factores que contribuyen activamente al deterioro de nuestros monumentos*. *Boletín del Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico*, 14: 67-74.

GARCÍA, S.; A. MARTÍN (1996 b). *Metodología para la evaluación del estado de conservación de obras monumentales en piedra en relación a fenómenos de bioalteración*. *Boletín del Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico*, 16: 38-47.

GARCÍA ESTEBAN, L., GUINDEO CASASÚS, A.; DE PALACIOS DE PALACIOS, P. (1996). *Maderas de coníferas: anatomía de géneros*. Fundación Conde del Valle de Salazar.

GARCÍA MURILLO, S. (1995). *Estudio de los procesos de bioalteración de la piedra en la catedral de Pamplona*. Tesis Doctoral. Universidad de Navarra. Pamplona.

GARCIA ORTEGA, R.; VALENTÍN RODRIGO, N. (1997). *La cigüeña blanca y el Patrimonio Arquitectónico*. Boletín del Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico, 18: 26-32.

GARCÍA-ROWE, J.; SÁIZ-JIMÉNEZ, C. (1991). *Lichens and bryophytes as agents of deterioration of building material in Spanish Cathedrals*. International Biodeterioration, 28: 151-163.

GARCÍA ROWE, J.; SÁIZ JIMÉNEZ, C. (1991). *Colonización y alteración de la piedra por líquenes, briofitos y plantas superiores en las catedrales de Salamanca, Sevilla y Toledo*. Jornadas sobre restauración y conservación de monumentos (1989-Madrid). Ministerio de Cultura. Dirección General de Bellas Artes y Archivos. Instituto de Conservación y Restauración de Bienes Culturales: 71-79.

GAYLARD, C.C.; MORTON, L.H.G.; LOH, K.; SHIRAKAWA, M.A. (2011). *Biodeterioration of external architectural paint films-A review*. International Biodeterioration, 65: 1189-1198.

GIACOBINI, C.; M. P. NUGARI; M. P. MICHELI; B. MAZZONE; M. R. D. SEAWARD (1986). *Lichenology and the conservation of ancient monuments: An interdisciplinary study*. Biodeterioration 6: papers presented the 6th International Biodeterioration Symposium: 386-392.

GIACOBINI, C.; PIETRINI, A. M.; RICCI, S.; ROCCARDI, A. (1987). *Problemi di biodeterioramento*. Bolletino d'Arte, suplemento al n. 41, Materiali Lapidei, vol. 1: 53-64.

GIL, J.A.; SÁIZ-JIMENEZ, C. (1992). *Biodeterioration of Roman Mosaics by Bryophytes*. 7th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone: 511-519.

GIORGI, R. L. DEI; BAGLIONI, P. (2000). *A new method for consolidating wall paintings based on dispersions of lime in alcohol*. Studies in Conservation 45 (3): 154-61.

GIORGI, R.; BOZZI, C.; DEI, L.; GABBIANI, CH.; NINHAM, BW.; BAGLIONI, P. (2005): *Nanoparticles of Mg(OH)<sub>2</sub>: Synthesis and application to paper conservation*. Langmuir 21: 8495-8500

GODDIO, F.; MANCINI, S. I.; GERVASIO, S.; LÓPEZ, G. (2013). *Nanotecnología Aplicada a la preservación de la Madera*. Universidad Tecnológica Nacional. Simposio Internacional sobre Materiales Lignocelulosicos, Facultad Regional Santa Fe. Santa Fe, Argentina: Lavaise 610 (S3004EWB).

GOLUBI, S; PIETRINI A.M; RICCI, S. (2015). *Euendolithic activity of the cyanobacterium Chroococcus lithophilus Erc. In biodeterioration of the Pyramid of Caius Cestius, Rome, Italy*. International Biodeterioration and Biodegradation, 100: 7-16.

GÓMEZ GONZALEZ, M. L. (1994). *Examen científico aplicado a la conservación de obras de arte*. Ministerio de Cultura. Instituto de Conservación y Restauración de Bienes Culturales.

GÓMEZ, A.; POLVORINOS, A.; CASTAING, J.; PLEGUEZUELO, A. (2013). *Cerámicas de Niculoso Pisano y análisis cuantitativo de vidriados por FRX portátil*. PH investigación, 1:17-39. [en línea].



- GÓMEZ MORENO, M. (1911). *Alhambra*. En El arte en España. Comisaría Regia del Turismo y Cultura Artística, Barcelona.
- GÓMEZ-MORÓN, M.A.; ORTIZ, P.; MARTÍN-RAMÍREZ, J.M.; ORTIZ, R. CASTAIGN, J. (2016). *A new insight into the vaults of the kings in the Alhambra (Granada, Spain) by combination of portable XRD and XRF*. *Microchemical Journal* 125: 260-265.
- GÓMEZ-VILLALBA, L.S.; LÓPEZ-ARCE, P.; FORT, R.; ÁLVAREZ DE BUERGO, M.; (2010). *La aportación de la nanociencia a la conservación de bienes del patrimonio cultural*. Ministerio de Cultura. 43-56
- GONZÁLEZ ALFARO, J. GONZÁLEZ GONZÁLEZ, B; BARRIAL GONZÁLEZ ROSA T. (2004). *Laboratorio de Microbiología: Instrumentación y principios básicos*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas.
- GONZÁLEZ-BALLESTER, D., DE MONTAIGU, A., HIGUERA, J. J., GALVÁN, A., & FERNÁNDEZ, E. (2005). *Functional Genomics of the Regulation of the Nitrate Assimilation Pathway in Chlamydomonas*. *Plant Physiology*, 137(2), 522–533. <http://doi.org/10.1104/pp.104.050914>
- GONZÁLEZ LÓPEZ, M.J.; MONTERO MORENO, A.; BAGLIONI, R. 2012. *Las pinturas de la Sala de los Reyes de la Alhambra de Granada. Un proyecto, un método, una intervención*. *Revista PH*, 83, Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico, 74–89.
- GORBUSHINA, A.A.; HEYRMAN, J.; DORNIEDEN, T.; GONZALEZ-DELVALLE, M.; KRUMBEIN, W.E.; LAIZ, L.; SAIZ-JIMENEZ, C.; SWINGS, J. (2004). *Bacterial and fungal diversity and biodeterioration problems in mural painting environments of St. Martin's church (Greene-Kreiensen, Germany)*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 53: 13-24.
- GRAN ENCICLOPEDIA DE ANDALUCÍA, vol 2 (1979). Promociones Culturales Andaluzas, S.A, Tierras del Sur, Cultura Viva, Ediciones Anel: 721-722
- GRAN ENCICLOPEDIA DE ANDALUCÍA, vol 6 (1979). Promociones Culturales Andaluzas, S.A, Tierras del Sur, Cultura Viva, Ediciones Anel: 2417-2418.
- GRIFFIN, P.S.; INDICTOR, N.; KOESTLER, R.J. (1991). *The biodeterioration of stone: a review of deterioration mechanisms, conservation case histories and treatment*. *International Biodeterioration*, 28: 187-207. *Biodeterioration of Cultural Property* (Ed. Robert J. Koestler). Elsevier, London and New York.
- GUILLAUME-CHAVANNES, G. (1988). *Peintures et moisissures: une approche originale du problème par le "Conservation Department" de la Tate Gallery à Londres. Patrimoine culturel et alterations biologiques*. Actes des journées d'études de la SFIIC: 217-226.
- GULLAN, P. (1994). *The insects: an outline of Entomology*. Chapman & Hall, London.
- HANSEN, E.; DOEHNE, E.; FIDLER, J.; LARSON, J.; MARTIN, B.; MATTEINI, M.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, C.; SEBASTIÁN-PARDO, E.; PRICE, C.; DE TAGLE, A.; TEUTONICO, J.M.; WEISS, N.R. (2003). *A review of selected inorganic consolidants and protective treatments for porous calcareous materials*. *Reviews in Conservation* 4: 13–25.
- HEDGES, S.A.; LACEY, M.S. (2002). *A Field Guide for the Management of Structure-Infesting Beetles*. Cleveland, OH: G.I.E Inc. Publishers,

HENRIQUES, D.; DE BRITO, J.; DUARTE, S.; NUNES, L. (2014). *Consolidating preservative-treated Wood: Combined mechanical performance of boron and polymeric products in Wood degraded by Coniophora puteana*. Journal of Cultural Heritage, 15: 10-17

HUECK, H.J. (1965). *The Biodeterioration of materials as part of hylobiology*. En: Mater org.,1 (1): 5-34

HUNT, D. (2012). *Properties of wood in the conservation of historical wooden artifacts*. Journal of Cultural Heritage, 13S, S10-S15

IONITA, I. (1971). *Contribution to the study of the biodeterioration of the works of art and historic monuments. II. Species of fungi isolated from oil and tempera paintings*. Rev. Roum. Biol. Ser. Bot., 16: 377-381.

JABAJI, S.; CHAMOUN, R. (2011). *Expression of genes of Rhizoctonia solani and the biocontrol Stachybotrys elegans during mycoparasitism of hyphae and sclerotia*. Mycologia, 103 nº3: 483-493.

JATON, C. (1986). *Biologie-ecologie. Traitement des materiaux pierreux*. 2emmes rencontres Internationales pour la protection du Patrimoine Culturel, 201-214.

JEANSON, C. (1978). *Microécologie minéralogique et altération des oeuvres d'art: St. Marc de Venise et la Céne de Milan*. Altération et protection des monuments en pierre (deterioration and protection of stone monuments): colloque international (international symposium); UNESCO, Paris

JENTOFT, F.C. (2004). *Diffuse Reflectance IR and UV-vis Spectroscopy*. Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft. [en línea].

KARBOWSKA-BERENT, J. & STRZELCZYK, A.B. (2000). *The role of Streptomyces in the biodeterioration of historic parchment*. Wydawnictwo Uniwersytetu Mikolaja Kopernika, Torun.

KARTAL, S. N.; TERZI, E.; YILMAZ, H.; GOODELL, B. (2015). *Bioremediation and decay of wood treated with ACQ, micronized ACQ, nano-CuO and CCA wood preservatives*. International Biodeterioration & Biodegradation, 99: 95-101.

KIM, E. K.; WON, J.; KIM, J.; KANG, Y.S. KIM, S.D. (2008). *TEOS/GPTMS/silica nanoparticle solutions for conservation of Korean heritage stones*. In Proceedings of the 11th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone, 15–20 September 2008, Torun', Poland, ed. J. W. Lukaszewicz and P. Niemcewicz, 915–23. Torun', Poland: Nicolaus Copernicus University.

KINGSLEY, H.; PINNIGER, D.; XAVIER-ROWE, A.; WINSOR, P. (2001). *Integrated Pest Management for Collections*. London: James & James.

KOESTLER, R.J.; WARSCHEID, T.; NIETO, F. (1997). *Biodeterioraton: risk factors and their management*. BAER, N.S., SNETHLAGE, R. (Eds), Saving our architectural heritage: the conservation of historic stone structures, John Wiley & Sons Ltd.: 25-36

KOESTLER, R.J.; SALVADORI, (1996). *Methods of evaluating biocides for the conservation of porous building materials*. Science and Technology for Cultural Heritage 5 (1): 63-68

KORMONDY, E.J. (1973). *Conceptos de Ecología*, 75-77. Alianza editorial, Madrid.

KOZIROG, A.; OTLEWSKA, A.; PIOTROWSKA, M.; RAJKOWSKA, K.; NOWICKA-KREAWCZYK, P.; HACHULKA, M.; WOLSKI, G. J.; GUTAROWSKA, B.; KUNICKA-STYCZYNSKA, A.; LIBUDZISZ, Z.; ZAKOWSKA, Z.; ZYDZIK-BIALEK, A. (2014). *Colonising organisms as a biodegradation factor affecting historical wood material at the former concentration camp of Auschwitz II – Birkenau*. International Biodeterioration & Biodegradation, 86: 171-178.

KRIENITZ, L.; BOCK, C.; DADHEECH, P.; PRÖSCHOLD, T. (2011). *Taxonomic reassessment of the genus Mychonastes (Chlorophyceae, Chlorophyta) including the description of eight new species*. Phycologia.

KRUMBEIN, W. E. (1988). *Biotransformations in monuments. A sociobiological study*. Durability Build. Mater., 5(3-4): 359-382.

LAZZARINI, L.; TABASSO, M. (1986). *Il restauro della pietra*. Ed. Cedam, Padova. 317 pp.

LEGANÉS, F; BOLAÑOS, L. *Técnicas experimentales en biología molecular*. Departamento de biología. Universidad Autónoma de Madrid.

LEPIDI, A.A.; SHIPPA, G. (1972). *Some aspects of the growth of chemotrophic and heterotrophic microorganisms on calcareous surfaces*. 1er Colloque Internazionale sur la Deterioration des Pierres en Oeuvre: 143-148.

LEPIDI, A.A.; SHIPPA, G. (1972). *Growth of a sulphide oxidizing bacterium estimated by various methods and a new method of sulphide determination*. 1er Colloque Internazionale sur la Deterioration des Pierres en Oeuvre: 139-141.

LÓPEZ-ARCE, P.; GÓMEZ-VILLALBA, L.S.; PINHO, L.; FERNÁNDEZ-VALLE, M.E.; ÁLVAREZ DE BUERGO, M.; FORT, R. (2010). *Influence of porosity and relative humidity on consolidation of dolostone with calcium hydroxide nanoparticles: effectiveness assessment with non-destructive techniques*. Materials characterization, 61(2). 168-184.

LÓPEZ PERTÍÑEZ, M. C. (2006). *La carpintería en la Arquitectura nazarí*. Instituto Gómez-Moreno de la Fundación Rodríguez- Acosta. Granada. 442 p.

LUCEÑO, M.; JIMÉNEZ, P.; ESCUDERO, M.; MARTÍN, S.; NARBONA, E. (2005). *Flora silvestre y Ornamental del Campus de la Universidad Pablo de Olavide*.

LÜRLING, M. (1999). *The Smell of Water: Grazer-Induced Colony Formation in Scenedesmus*. Thesis. Agricultural University of Wageningen.

MAGAUDA, G. (1994). *Il Biodeterioramento dei Beni Culturali*. Enea e Borgia, Roma.

MANSOUR, M.M.A.; SALEM, M.Z.M. (2015). *Evaluation of wood treated with some natural extracts and Paraloid B-72 against the fungus Trichoderma harzianum: Wood elemental composition, in-vitro and application evidence*. International Biodeterioration & Biodegradation, 100: 62-69.

MARFIL RUIZ, P. (2004). *Estudio de las linternas y el extradós de las cúpulas de la Maqsura de la Catedral de Córdoba, antigua mezquita Aljama*, Arqueología de la Arquitectura, 3: 99-105.

MARGALEF, R. (1974). *Ecología*. Omega, Barcelona.

MARTÍN, A. (1990). *Bioalteración de la piedra*. Ensayos y experiencias de alteración en la conservación de obras de piedra de interés histórico-artístico. Características mecánicas, térmicas y eléctricas. Madrid: Fundación Ramón Areces, pp. 339-369.

MARTÍN GARCÍA, L. (2012). Informe: *Estudio estratigráfico de capas pictóricas. Determinación de compuestos orgánicos. Pinturas de la Sala de los Reyes. Alhambra (granada)*. Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico

MARTÍN GARCÍA, L.; BOCALANDRO RODRÍGUEZ, A. (2012a). Informe: *Estudio estratigráfico de capas pictóricas. Pinturas de la Sala de los Reyes. Sala 1. "Dama jugando al ajedrez". Alhambra (Granada)*. Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico

MARTÍN GARCÍA, L.; BOCALANDRO RODRÍGUEZ, A. (2012b). Informe: *Estudio estratigráfico de capas pictóricas. Pinturas de la Sala de los Reyes. Sala 3. "Fuente de la Juventud". Alhambra (Granada)*. Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico

MARTÍN GARCÍA, L.; SAMEÑO PUERTO, M.; GÓMEZ MORÓN, A.; MENGUIANO CHAPARRO, V. (2014). Informe: *Pinturas de la Sala de los Reyes de la Alhambra de Granada. Envejecimiento acelerado y evaluación de productos de intervención en probetas de ensayo*. Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico

MARTÍN GARCÍA, L. (2017). Informe: *Estudios científico-técnicos para el conocimiento, diagnóstico y conservación de la Maqsura de la Mezquita-Catedral de Córdoba. Estudio de capas pictóricas*. Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico

MATTEINI, M.; MOLES, A. 2001. *La química en la restauración: los materiales del arte pictórico*. Ed. Nerea.

MEANEY, P. (2004). *Carpet Beetles, Textile Moths and Related Insect Pests*. The Harvard Library – Handbook One. Leicester, UK: Harvard Pest Consultancy.

MENÉNDEZ VALDERREY, J.L. (2007). *Misopates orontium* L. Raf Asturnatura.com nº142, ISSN 1887-5068, 2007 [en línea]

MENGUIANO CHAPARRO, V. M.; PÉREZ CASTIÑEIRA, J.R.; SAMEÑO PUERTO, M. (2012). *Identificación de hongos causantes de pudrición en las bóvedas de las pinturas de la Sala de los Reyes de la Alhambra de Granada mediante técnicas de Biología Molecular*. La Ciencia y el Arte IV: Ciencias y tecnologías aplicadas a la conservación del patrimonio. Ed. Instituto del Patrimonio Cultural de España, Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Madrid: 245-250.

MENGUIANO CHAPARRO, V.M.; PÉREZ CASTIÑEIRA, J.R.; SAMEÑO PUERTO, M. (2013). *Estudio de microorganismos causantes de biodeterioro mediante técnicas de biología molecular en el IAPH*. Revista PH, nº 84, Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico, pp. 174-187.

MENGUIANO CHAPARRO, V. M.; SAMEÑO PUERTO, M. (2012). Informe: *Determinación del pH, tipo de curtido y grado de deterioro en muestras de cuero de las pinturas de la Sala de los Reyes de la Alhambra de Granada*. Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico

MOMPLET, A. (2012). *De la fusión a la difusión en el arte de la Córdoba califal: la ampliación de al-Ḥakam II en la mezquita aljama*, en Anales de Historia del Arte, vol. 22, Nº especial 2, (Madrid: Universidad Complutense, 2012), 237-258.

- MONRROY, M.; ORTEGA, I.; RAMÍREZ, M.; BAEZA, J.; FREER, J. (2011). *Structural change in Wood by Brown rot fungi and effect on enzymatic hydrolysis*. Enzyme and Microbial Technology, 49: 472-477
- MONTAGNA, G. 1993. *I pigmenti: Prontuario per L'arte e il Restauro*. Ed. Nardini
- MONTE, M; NICHI, D. (1997). *Effects of two biocides in the elimination of lichens from stone monuments: preliminary findings*. Science and technology for cultural heritage, 6: 209-216.
- MONTE SILA, M.; TARANTINO, G. (1981). *The metabolic state of microorganisms of the genus thiobacillus on stone monuments*. Proceeding of International Symposium The Conservation of Stone II, Bologna: 117-138.
- MORALES, A.J. (1991). *Francisco Niculoso Pisano*. Colección Arte hispalense vol.14 Excma. Diputación Provincial.
- MORENO APARICIO, G. (2017). *Evaluación de compatibilidad de tratamientos biocidas y consolidantes para maderas en el patrimonio histórico andaluz*. Trabajo Fin de Grado en Ingeniería Química. Escuela Técnica Superior de Ingeniería. Universidad de Sevilla.
- NIETO CUMPLIDO, M. (2007). *La Catedral de Córdoba (2ª edición)*. Córdoba: Publicaciones de la Obra social y cultural de Cajasur. ISBN 978-84-7959-652-1.
- NIMIS, P.L; PINNA, D; SALVADORI, O. (1992). *Lichene e conservazione dei monumento*. Editrice Bologna.
- NIMIS, P.L., SCHEIDEGGER C., WOLSELEY P.A. (EDS.), (2002). *Monitoring with lichens. Monitoring lichens*. Kluwer, NATO Science series, Earth and Envir. Ser. 7
- Doc. NORMAL 3/80 (1980). *Materiali lapidei: campionamento*. CNR-ICR, Comas Grafica, Roma.
- Doc. NORMAL 8/81 (1981). *Esame delle caratteristiche morfologiche al microscopio elettronico a scansione (SEM)*. CNR-ICR, Comas Grafica, Roma.
- Doc. NORMAL 9/82 (1982). *Microflora autotrofa ed eterotrofa: tecniche di isolamento in coltura*. CNR-ICR, Comas Grafica, Roma.
- Doc. NORMAL 19/85 (1985). *Microflora autotrofa ed eterotrofa: tecniche di indagine visiva*. CNR-ICR, Comas Grafica, Roma.
- Doc. NORMAL 24/86 (1986). *Metodologia di rilevamento e di analisi della vegetazione*. CNR-ICR, Comas Grafica, Roma.
- Doc. Normal 43/93 (1994). *Analisi colorimétrica*. ICR-CNR, Comas Grafica, Roma.
- NUGARI, M.P. (2008). Informe: *Granata – Alhambra. Progetto di indagini e interventi sulle pitture su cuoio della Sala de los Reyes. Indagini biologiche – 1º rapporto*. Laboratorio di Indagini Biologiche. Istituto centrale per il restauro, Roma.
- NUGARI, M.P.; PALLECHI, P.; PINNA, D. (1993). *Methodological evaluation of biocidal interference with stone materials - Preliminary laboratory tests*. Conservation of stone and other materials, 1: 205-212. (M.J. Thiel). Rilem, London.

NUGARI, M.P.; PIETRINI, A.M.; CANEVA, G.; IMPERI, F.; VISCA, P. (2009). *Biodeterioration of mural paintings in a rocky habitat: The Crypt of the Original Sin (Matera, Italy)*. International Biodeterioration and Biodegradation, 63: 705-711.

NUGARI M., REALINI M., ROCCARDI A. (1993). *Contamination of mural paintings by indoor airborne fungal spores*. En: Aerobiologia. 9 p. 131-139.

NUGARI, M.P; SALVADORI, O. (2002). *Biocides and treatment of stone: limitations and future prospects*. Art, biology, and conservation: biodeterioration of works of art. The Metropolitan Museum of Art, New York: 89-93

NUGARI, M.P; SALVADORI, O. (2003a). *Biocides and treatment of stone: limitations and future prospects*. Art, biology, and conservation: biodeterioration of works of art. Koestler, R.J.; Koestler,V.hH.; Charola, A. E.; Nieto-Fernandez,F.E. (Eds). The Metropolitan Museum of Art, New York: 518-535.

NUGARI, M.P; SALVADORI, O. (2003b). *Biodeterioration control in cultural heritage: methods and products*. Molecular biology and cultural heritage, Proceedings of International Congress on Molecular Biology and Cultural Heritage, Sevilla. Balkema Publishers, Lisse (NL): 233-242

OHSAS 18001:2007. *Sistemas de gestión de la seguridad y salud en el trabajo*.

ORTEGA-CALVO, J.J; ARIÑO, X; STAL, L, SAIZ-JIMÉNEZ,C. (1994). *Cyanobacterial sulfate accumulation from a historic building black crust*. Geomicrobiology Journal, 12: 15-22.

ORTEGA-CALVO, J.J.; HERNÁNDEZ-MARINÉ, M.; SÁIZ-JIMÉNEZ, C. (1990). *Mechanical deterioration of building stone by cyanobacteria and algae*. Biodeterioration and Biodegradation, 8: 362-394. Elsevier.

ORTEGA-CALVO, J.J; HERNÁNDEZ-MARINE, M.; SAIZ-JIMÉNEZ, C. (1991). *Biodeterioration of buildings materials by cyanobacteria and algae*. Biodeterioration and Biodegradation 28: 165-185. Elsevier

ORTEGA-CALVO, J.J.; HERNÁNDEZ MARINE, M.; SAIZ-JIMÉNEZ, C. (1992). *Experimental strategies for investigating algal deterioration of stone*. 7th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone: 541-549.

ORTEGA-CALVO, J.J.; SANCHEZ-CASTILLO, P.M.; HERNÁNDEZ -MARINÉ, M.; SÁIZ JIMÉNEZ, C. (1993). *Isolation and characterization of epilithic chlorophytes and cyanobacteria from two Spanish cathedrals (Salamanca and Toledo)*. Nova Hedwigia, 57 (1/2): 239-253.

OZENDA, P; CLAUZADE, G. (1970). *Les lichens, étude biologique et flore illustrée*. Paris: Masson et Cie.

PALENI, A.; CURRI, S.B.; BENASSI, R. (1978). *Lipids in stone*. Abstract Proceedings of Sections Lipids in Art, 1.

PANOV, D.; TERZIEV, N. (2009). *Study on some alkoxysilanes used for hydrophobation and protection of wood against decay*. International Biodeterioration & Biodegradation, 63: 456-461.

PARRA CREGO, E.; GARCÍA GÓMEZ, B. (2005). *Derivación con MTBSTFA de aminoácidos y ácidos grasos. Una determinación simultánea de aglutinantes proteicos y grasos en capas de pintura*. Investigación en conservación y restauración : II Congreso del Grupo Español del IIC : 5



- PASQUARIELLO, G., PITZURRA O, SAVINO A. (2000). The index of microbial air contamination. *J Hosp Infect.* 2000 Dec; 46(4):241-56.
- PERAZA, C. (1964). Estudio de las maderas de coníferas españolas y de la zona norte de Marruecos. Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias Forestales.
- PÉREZ CASTIÑEIRA, J.R (2010). Identificación de microorganismos mediante técnicas de biología molecular. Informe de trabajo realizado. IBVF. CSIC.
- PIETRINI, A.M. (1989). *Fontana del Tritone. Studi ed interventi di carattere biologico.* Istituto centrale del Restauro-ICR.
- PIETRINI, A.M.; RICCI, S. (1993). *Occurrence of a calcareous blue-green alga, Scytonema julianum (Kütz) Meneghini, on the frescoes of a church carved from the rock in Matera, Italy.* *Cryptogamic Botany*, 3: 290-295.
- PIETRINI, A.M.; RICCI, S.; BARTOLINI, M; GIULIANI, M.R. (1985). *A reddish color alteration caused by algae on stone Works: Preliminary studies.* 5th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone, 653-662.
- PINNIGER, D. (2004). *Pest Management in Museums, Archives and Historic Houses.* London: Archetype Publications Ltd., Re-impreso el año 2004.
- POLO, A.; CAPPITELLI, F.; BRUSETTI, L.; PIRINCIPI, P.; VILLA, F.; GIACOMUCCI, L.; RANALLI, G.; SORLINI, C. (2010). *Feasibility of removing surface deposits on stone using biological and chemical remediation methods.* *Microbial Ecology*, 60: 1-14.
- PORTA PELAYO, J. (2009). *Estudio genético de muestras biológicas procedentes de tejidos animales obtenidos en los trabajos de recuperación de los restos históricos de la Alhambra de Granada.* Informe efectuado por el Laboratorio Genoclinics, Departamento de la Empresa Biotechnology Consulting S.L.
- PRICE, C.; ROSS, K.; WHITE, G. (1988). *A further appraisal of the "lime technique" for limestone consolidation, using a radioactive tracer.* *Studies in Conservation* 33 (4): 178-86.
- PRIETO, B.; SILVA, B.; LANTES, O. (2004). *Biofilm quantification on stone surfaces: comparison of various methods.* *Science of the Total Environment*, 333:1-7.
- PRIN, J.L.; GONZÁLEZ, N.; VILLARROEL, H.; RAMÍREZ, M.; ROJAS DE GÁSCUE, B. (2012). *El secado de punto crítico (SPC) como técnica aplicada en la preparación de geles de poli(acrilimida-CO-ácido acrílico) por microscopía electrónica de barrido.* *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 5: 20-23
- RAGHUKUMAR, C. (2012). *Biology of Marine Fungi.* Springer Science & Business Media.
- REAL DECRETO 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. Ministerio de la Presidencia. «BOE» núm. 124, de 24 de mayo de 1997. Referencia: BOE-A-1997-11144
- RICELLI, A.; FABRI, A.; FANELLI, C.; MENICAGLI, R.; SAMARITANI, S.; PINI, D.; RAPACCINI S.M.; SALVATOTI, P. (1999). *Fungal growth on samples of paper: inhibition by new antifungal*, 20: 97-107

- RIMINESI, C.; OLMÍ, R. (2016). *Localized microwave heating for controlling biodeteriogens on cultural heritage assets*. *International Journal of Conservation Science*, 7, Número especial 1: 281-294
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. (1979). *Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria*. *J. Gen. Microbiol.* 111: 1-61.
- RODRIGUEZ DE LOS SANTOS, M. (1996). *Patrimonio arquitectónico y patrimonio natural*. *Boletín del Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico*, 14: 96-97.
- RODRIGUEZ-NAVARRO, C.; RUIZ-AGURDO, E.; ORTEGA-HUERTAS, M.; HANSEN, E. (2005). *Nanostructure and Irreversible Colloidal Behavior of Ca(OH)<sub>2</sub> : Implications in Cultural Heritage Conservation*. *Langmuir* 21(24), 10948-57.
- RODRIGUEZ-TROBAJO, E. (2017). *Informe: Estudio dendrocronológico y constructivo de la Mezquita de Córdoba*. INIA-IAPH.
- ROGERIO-CANDELERIA, M.A.; MILLER, A.Z.; DIONÍSIO, A.; MACEDO, M.F.; SAIZ-JIMÉNEZ, C. (2012). *Técnicas no destructivas para la monitorización cuantitativa y cualitativa de procesos de biodeterioro en materiales pétreos*. *Estudios Arqueológicos de Oeiras*, 19: 287-294.
- ROWE, J. G., A. APARICIO & C. SAIZ JIMÉNEZ (1991). *Weeds settling in Spanish cathedrals (Salamanca, Seville and Toledo)*, in N. S. BAER, C. SABBIONI & A. I. SORS (eds.). *Science, Technology and European Cultural Heritage*. Bologna.
- RUFFOLO, S. A.; DE LEO, F.; RICCA, M.; ARCUDI, A.; SILVESTRI, C.; BRUNO, L.; URZI, C.; LA RUSSA, M. F. (2017). *Medium-term in situ experiment by using organic biocides and titanium dioxide for the mitigation of microbial colonization on stone surfaces*. *INTERNATIONAL BIODETERIORATION & BIODEGRADATION*, 123: 17-26.
- SAIZ JIMÉNEZ, C. (1982). *Causas del deterioro de los murales de Vázquez Díaz, Monasterio de Santa María de la Rábida, Huelva*. *Mundo Científico*, 18: 1007- 1011.
- SAIZ JIMÉNEZ, C.; SAMSON, R.A. (1981). *Micoorganisms and enviromental pollution as deteriorating agents of the frescoes of the Monastery of Santa María de la Rábida, Huelva, Spain*. 6th Triennial Meeting of ICOM Commitee for Conservation, 1-14.
- SAIZ JIMÉNEZ, C. (1981). *Weathering of building materials of the Giralda (Seville, Spain) by lichens*. 6th Triennial Meeting ICOM, Committee for Conservation, Ottawa, paper 81/10/4.
- SAIZ JIMÉNEZ, C. (1984). *Weathering and colonization of limestones in an urban enviroment*. *Soil Biology and Conservation of the Biosphere* (ed. J. Szegi), pp. 757-767. Akamemiai Kiado. Budapest.
- SAIZ JIMÉNEZ, C. (1991). *Characterization of organic compounds in weathered stones*, in N. S. BAER, C. SABBIONI & A. I. SORS (eds.). *Science, Technology and European Cultural Heritage*. Bologna.
- SAIZ JIMÉNEZ, C.; ROWE, J. G.; GARCÍA DEL CURA, M. A.; ORTEGA CALVO, J. J.; ROEKENS, E.; VAN GRIEKEN, R. (1990). *Endolithic cyanobacteria in Maastricht limestone*. *The Science of the Total Environment*, 94: 209-220.



SÁIZ JIMÉNEZ, C.; VIDELA, H.A (EDS) (2002). *Biodeterioro de Monumentos de Iberoamérica*. CYTED: 11-12.

SALEM, MOHAMED Z.M.; ZIDAN, YASSIN E.; MANSOUR, MAISA M.A.; EL HADIDI, NESRIN M.N.; ABO ELGAT, WAEL A.A. (2016). *Antifungal activities of two essential oils used in the treatment of three commercial woods deteriorated by five common mold fungi*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 106: 88-96.

SALVADORI, O.; NUGARI, M.P. (1987). *The effect of microbial growth on synthetic polymers use don Works of art*, *Biodeterioration* 7: 424-427 D.R. Houghton, R.N. Smith, H.O.W. Eggings, Elsevier Applied Science, Londres & New York.

SAMEÑO PUERTO, M. (2003). *Factores biológicos de alteración*. Cuadernos técnicos. Metodología de diagnóstico y evaluación de tratamientos para la conservación de los edificios históricos: 72-93. Comares.

SAMEÑO PUERTO, M. (2007-2008) *Estudios de biodeterioro y propuesta de tratamiento*. Cuadernos de Arqueología de Ronda: 521-260.

SAMEÑO PUERTO, M. (2008). Informe: *Estudio biológico. Estudios de biodeterioro. Identificación de factores biológicos de alteración en las Pinturas de la Sala de los Reyes de la Alhambra de Granada*. Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico

SAMEÑO PUERTO, M.; GARCÍA ROWE, J. (1995). *Biodeterioro. Alteración Biológica de Monumentos y Obras de Arte*. Boletín Informativo, I.A.P.H., 10: 26-27.

SAMEÑO PUERTO, M.; MARTÍN GARCÍA, L. (2014). *Analysis of materials and biodeterioration study on corn cane sculpture: "Crucificado del Capítulo de Bornos (Cádiz)"*. II International congress "Science and Technology for the Conservation of Cultural Heritage": 251-256. Sevilla. ISBN: 978-1-138-02744-2 (Hbk). ISBN: 978-1-315-71242-0 (eBook).

SAMEÑO PUERTO, M.; MENGUIANO CHAPARRO, V. M. (2008). Informe: *Pinturas de la Sala de los Reyes. Alhambra, Granada. Proyecto de intervención en el reverso de las bóvedas. Caracterización de materiales: identificación de madera*. Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico.

SAMEÑO PUERTO, M.; MENGUIANO CHAPARRO, V. M. (2017). Informe: *Estudios científico-técnicos para el conocimiento, diagnóstico y conservación de la Maqsura de la Mezquita-Catedral de Córdoba. Estudio biológico: Estudios de biodeterioro y análisis de factores de alteración biológicos. Identificación de maderas y evaluación de tratamiento*. Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico.

SAMEÑO PUERTO, M.; VILLEGAS SÁNCHEZ, R.; GARCÍA ROWE, J. (1996). *Inventario de la Vegetación y Estudio de la Interferencia Biocida con los Materiales Pétreos del Yacimiento del Cerro de la Plaza de Armas de Puente Tablas (Jaén)*. Boletín del Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico, 14: 67-74.

SAMEÑO PUERTO, M.; VILLEGAS SÁNCHEZ, R.; GARCÍA ROWE, J. (1996). *Estudio de la interacción de los biocidas con los materiales pétreos del yacimiento del cerro de la plaza de armas de Puente Tablas (Jaén)*. III Congreso Internacional de Rehabilitación del Patrimonio Arquitectónico y Edificación, Granada: 520-524

SÁNCHEZ ROMERO, I. (2007). Informe: *Determinación del curtido de los cueros. Fase: ejecución proyecto de intervención de urgencia: fijación preliminar y facing de protección. Pinturas de la Sala de los Reyes. Alhambra, Granada*. Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico.

SANMARTÍN, P; VILLA, F; SILVA, B; CAPITELLI, F; PRIETO, B. (2010). *Color measurement as a reliable method for estimating chlorophyll degradation to phaeopigments*. *Biodegradation*, 22: 763-771.

SARRÓ, M.I.; GARCÍA, A.M.; RIVALTA, V.M.; MORENO, D.A.; ARROYO, I. (2006). *Biodeterioration of the Lions Fountain at the Alhambra Palace, Granada (Spain)*. *Building and Environment* 41: 1811–1820.

SCHNABEL, L. (1991). *The treatment of biological growths on stone: A conservator's viewpoint*. *International Biodeterioration*, 28: 125-131. *Biodeterioration of Cultural Property* (Ed. Robert J. Koestler). Elsevier, London and New York.

SCHOCH, W.; HELLER, I.; SCHWEINGRUBER, F.H.; KIENAST, F. (2004) *Wood Anatomy of Central European Species*. (Online Version).

SCHWEINGRUBER, F.H. (1990a). *Microscopic Wood Anatomy* (Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research).

SCHWEINGRUBER, F.H. (1990b) *Anatomy of European Woods* (Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research,).

SCLOCCHI, C. (2002). *La disinfezione e la disinfestazione dei supporti archivistici*. In: *Chimica e biologia applicate alla conservazione degli archive*, Ministero per I Beni e le Attività Culturali, Direzione generale degli archivi dei stato. Union Pringting, Roma: 557-575

SEAWARD M. D.; GIACOBINI, C. (1988). *Lichen-induced biodeterioration of italian monuments, frescoes and other archaeological materials*. *Lichens and monuments*. C.N.R. Centro di studio. Cause di deperimento e metodi di conservazione delle opere d'arte.- Roma. P. L. Nimis & M. Monte, Trieste.

SHABIR MAHR, M.; HÜBERT, T.; STEPHAN, I.; MILITZ, H. (2013). *Decay protection of wood against brown-rot fungi by titanium alkoxide impregnations*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 77: 56-72

SILVA, M.; SALVADOR, C.; CANDEIAS, M. F.; TEIXEIRA, D. ; CANDEIAS, A. ; CALDEIRA, A.T. (2016). *Toxicological assessment of novel green biocides for cultural heritage*. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CONSERVATION SCIENCE*, 7, Número especial 1: 265-272.

SKIPPER, P.J.A.; SCHULZE, H.; WILLIAMS, D.R.; DIXON, R.A. (2016). *Biodeterioration of limestone built heritage: A multidisciplinary challenge*. Hughes, J., & Howind, T. (Eds.) (2016). *Science and Art: A Future for Stone: Proceedings of the 13<sup>th</sup> International Congress on the Deterioration and Conservation of Stone*, Volume 1. Paisley: University of the West of Scotland.

SORLINI, C. (1984). *Il ruolo degli inquinanti atmosferici nel deterioramento chimico e microbiologico dei manufatti artistici e edifizii*. *Acqua Aria*, 2: 181-188.

SOUTHWOOD, T. R. E. (1978). *The components of diversity. The diversity of insect faunas* (ed. L. A. Mound & N. Waloff), pp. 19-40. Blackwell Scientific Publications, London.

STUPAR, M.; GRBIC, M. L.; DZAMIC, A.; UNKOVIC, N.; RISTIC, M.; JELIKIC, A.; VUKOJEVIC, J. (2014). *Antifungal activity of selected essential oils and biocide benzalkonium chloride against the fungi isolated from cultural heritage objects*. South African Journal of Botany, 93: 118-124.

TERZI, E.; KARTAL, S. N.; YILGÖR, N.; RAUTKARI, L.; YOSHIMURA, T. (2016). *Role of various nanoparticles in prevention of fungal decay, mold growth and termite attack in wood, and their effect on weathering properties and water repellency*. International Biodeterioration & Biodegradation, 107: 77-87.

TIANO, P.; BIANCHI, R.; VANNUCI, S. (1975). *Researches on the presence of sulphur cycle bacteria in the Stone of some ancient buildings of Florence*. Plant and Soil, 43, 211-217.

TIANO, P. (1986). *Problemi biologici nella conservazione del materiale lapideo esposto*. La Prefabbricazione anno 22, Num. 4: 261-272.

TIRADO HERNÁNDEZ, A. M. (2015). *Estudio de biodeterioro y tratamientos biocidas sobre diversos geomateriales de bienes culturales*. Trabajo Fin de Máster. Máster de Diagnóstico del Estado de conservación del Patrimonio Histórico. Universidad Pablo de Olavide (UPO). Sevilla

TIRADO HERNÁNDEZ, A.M.; SAMEÑO PUERTO, M.; VELÁZQUEZ JIMÉNEZ; J.M. (2015). *Estimación de la biomasa fotosintética en el estudio de la eficiencia de tratamientos biocidas sobre sustratos pétreos*. Congreso Nacional: Estudio y Conservación del Patrimonio Cultural – Noviembre 2015, Málaga

TOMASELLI, L.; LAMENTI, G.; TIANO, P. (2002). *Chlorophyll fluorescence for evaluating biocide treatments against phototrophic biodeteriogens*. Annals of Microbiology, 52: 197-206.

TORRES BALBÁS, L. (1946). *Bóvedas romanas sobre arcos de resalto*, Archivo Español de Arte, 19: 173-208, p. 175

TRETIACH, M. CRISAFULLI, P; IMAI, N; KASHIWADANI, H; HEE MOON, K; WADA, H; SALVADORI, O. (2007). *Efficacy of a biocide tested on selected lichens and its effects on their substrata*. International Biodeterioration and Biodegradation, 59: 44-54.

TRETIACH, M.; STEFANO BERTUZZI, S.; SALVADORI, O. (2010). *Chlorophyll a fluorescence as a practical tool for checking the effects of biocide treatments on endolithic lichens*. International Biodeterioration & Biodegradation, 64: 452–460.

UNE-EN 15886:2011. *Conservación del patrimonio cultural. Métodos de ensayo. Medición del color de superficies*.

UNE-EN 1936:2007. *Métodos de ensayo para piedra natural. Determinación de la densidad real y aparente y de la porosidad abierta y total*.

UNE-EN ISO 4044. *Cuero. Preparación de muestras para ensayos químicos*.

UNE-EN ISO 4045:1999. *Cuero. Determinación del pH*.

UNGER, A. (2012). *Decontamination and "deconsolidation" of historical wood preservatives and wood consolidants in cultural heritage*. Journal of Cultural Heritage, 13, Número 3: S196-S202.

URZI, C.; DE LEO, F.; KRAKOVA, L.; PANGALLO, D.; BRUNO, L. (2016). *Effects of biocide treatments on the biofilm community in Domitilla's catacombs in Rome*. Science of the Total Environment , 572: 252-262

VAILLANT CALLOL, M.; VALENTÍN RODRIGO, N. (1996). *Principios básicos de la Conservación Documental y Causas de su Deterioro*. Ministerio de Educación y Cultura. Instituto de Patrimonio Histórico Español.

VALDÉS CASTRILLÓN, B.; TALAVERA LOZANO, S., FERNÁNDEZ-GALIANO FERNÁNDEZ, E. (eds.) (1987). *Flora vascular de Andalucía Occidental*, 3 volúmenes. Ketres Editora S.A. Barcelona. ISBN: 84-85256-63-8.

VALENTÍN, N., M. LIDSTROM Y F. PREUSER (1990). *Microbial control by low oxygen and low relative humidity environment*. *Studies in Conservation*, 35: 222-230.

VALENTÍN, N. (1994). *Comparative Analysis of Insect Control by Nitrogen, Argon and Carbon Dioxide in Museum, Archive and Herbarium Collections*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 32. Elsevier, Science Limited, England: 263-278.

VALENTÍN, N. (2007). *Microbial Contamination in Archives and Museums: Health Hazards and Preventive Strategies Using Air Ventilation Systems*. In *Contribution to the Experts, Roundtable on Sustainable Climate Management Strategies*. Tenerife. Spain.

VÍLCHEZ VÍLCHEZ, C. (2006). *Granada en tus manos*. Alhambra y Generalife. Ideal.

VILLEGAS SÁNCHEZ, R. (2003). *Metodología para la evaluación y estudio previo de tratamientos*. Cuadernos técnicos. Metodología de diagnóstico y evaluación de tratamientos para la conservación de los edificios históricos: 194-207. Comares.

VILLEGAS, R.; BAGLIONI, R.; SAMEÑO, M. (2003). *Tipología de materiales para tratamiento*. Cuadernos técnicos. Metodología de diagnóstico y evaluación de tratamientos para la conservación de los edificios históricos: 168-193. Comares.

WARSCHEID, T; BRAAMS, J. (2000). *Biodeterioration of stone: a review*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 46: 343-368.

WARSCHEID, TH. (2002). *The evaluation of biodeterioration processes on cultural objects and approaches for their effective control*” Art, biology, and conservation: biodeterioration of works of art. Editores, Koestler, R; Koestler,V; Charola, A; Nieto-Fernandez,F. The Metropolitan Museum of Art.

WELSCH, U.; SOBOTTA, J. (2009). *Histología*. 2ª edición. Editorial médica Panamericana.

WIRTH, V.; DÜLL, R.; LLIMONA, X.; ROS, R.; WERNER, O. (2004). *Guía de campo de los líquenes, musgos y hepáticas*. Ediciones Omega.

YELA, J.L.; SAMEÑO, M. (1995). *Los insectos y el biodeterioro del Patrimonio Histórico Cultural*. PH. Boletín del IAPH, 18: 67-76. Sevilla.

YOUNG, M.E.; ALAKOMI, H.L.; FORTUNE, I.; GORBUSHINA, A.A.; KRUMBEIN, W. E.; MAXWELL, I.; MCCULLAGH, C.; ROBERTSON, P.; SAARELA, M.; VALERO, J.; VENDRELL, M. (2008). *Development of a biocidal treatment regime to inhibit biological growths on cultural heritage: BIODAM*. *ENVIRONMENTAL GEOLOGY*, 56 (3-4): 631-641.

ZELITCH, I. (1973). *Plant Productivity and the Control of Photorespiration*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, vol.70 (2): 579-584.

Electrónica:

Aula virtual. Universidad de Salamanca.

([http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/curso/UNI\\_02/u2c5s2.htm](http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/curso/UNI_02/u2c5s2.htm))

GRUPO ESPAÑOL DE CONSERVACIÓN. International Institute for conservation of historic and artistic works.

[http://geiic.com/index.php?option=com\\_fichast&Itemid=83&tasko=viewIso&task=view&id=14](http://geiic.com/index.php?option=com_fichast&Itemid=83&tasko=viewIso&task=view&id=14)

HERBARIO VIRTUAL del Mediterráneo Occidental. Àrea de botànica, departament de biologia, Universitat de les Illes Balears, Universitat de Barcelona, Universitat de Valencia.

<http://herbarivirtual.uib.es/cas-med/>

<http://herbarivirtual.uib.es/cas-ub/especie/4709.html>

Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico. Consejería de Cultura, Junta de Andalucía.

<http://www.iaph.es/patrimonio-inmueble-andalucia/resumen.do?id=i2764>

Martí Solé, María del Carmen (1999). *NTP 299: Método para el recuento de bacterias y hongos en aire*. Instituto nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. España.

[http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/201a300/ntp\\_299.pdf](http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/201a300/ntp_299.pdf)

<http://es.slideshare.net/BiocientificaSA/mara-ngeles-baridon-mtodos-de-extraccin-y-purificacin-de-cidos-nucleicos>

Portal de museos de Andalucía. Consejería de Cultura, Junta de Andalucía

<http://www.museosdeandalucia.es/culturaydeporte/museos/CAMA>

“Técnicas de tinción. Fundamentos.” Seminario, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. [www.microinmuno.qb.fcen.uva.ar/SeminarioTinciones.htm](http://www.microinmuno.qb.fcen.uva.ar/SeminarioTinciones.htm)

GenBank, del National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

Universidad Nacional del Litoral, Argentina <http://nematode.unl.edu/cephasp.htm>

Sun Chlorella < <http://www.chlorella.es/que-es-chlorella/> >

<http://www.monografias.com/docs111/nanoparticulas-preservado-madera/nanoparticulas-preservado-madera2.shtml#ixzz5CNvyK7RQ>

<http://www.alhambraedgranada.org/historia/alhambraSReyes.asp>

[http://es.wikipedia.org/wiki/Alhambra#Sala\\_de\\_los\\_Reyes](http://es.wikipedia.org/wiki/Alhambra#Sala_de_los_Reyes)

<http://legadoandalusi.es/legado/contenido/rutas/obras/21681.htm>

[https://es.wikipedia.org/wiki/Mezquita-catedral\\_de\\_C%C3%B3rdoba](https://es.wikipedia.org/wiki/Mezquita-catedral_de_C%C3%B3rdoba)

<https://es.wikipedia.org/wiki/Macsura>

<http://blogarteehistoria.blogspot.com/2010/12/comentario-maxura-de-la-mezquita-de.html>

<http://microbiology.ucdavis.edu/meeks/allenarnon.htm>



