

Consolidación de la piedra con bacterias

Carlos Rodríguez-Navarro | Dpto. Mineralogía y Petrología, U. de Granada
Fadwa Jroundi, M.^a Teresa González-Muñoz | Dpto. Microbiología, U. Granada
Kerstin Elert | Dpto. Mineralogía y Petrología, U. Granada

URL de la contribución <www.iaph.es/revistaph/index.php/revistaph/article/view/5373>

RESUMEN

La piedra de uso en esculturas y edificios históricos sufre con el tiempo distintos fenómenos de alteración, tanto naturales como antrópicos, que ocasionan daños y pérdidas de material. Para tratar de paliar los efectos del así llamado “mal de la piedra” se han desarrollado y aplicado distintos tratamientos de conservación basados en el uso de materiales consolidantes y protectores. Estos tratamientos tienen la finalidad de devolver al material alterado sus características físico-mecánicas perdidas y protegerlo frente al deterioro futuro. Sin embargo, los consolidantes y protectores convencionales de uso común desde la segunda mitad del siglo XX, tales como los polímeros sintéticos y los (alquil)alcóxisilanos, en muchas ocasiones han demostrado una eficacia limitada y, en otras, incluso han agravado los problemas de alteración que se trataban de resolver. Como alternativa a estos tratamientos convencionales se ha propuesto, y aplicado en las últimas décadas, la carbonatogénesis bacteriana como método más eficaz, natural y ecológico para la protección y consolidación de piedra ornamental. Aquí presentamos una visión general de los fundamentos de la protección y consolidación de la piedra con bacterias y las variantes de este tratamiento, así como sus efectos tanto en ensayos de laboratorio como en aplicaciones *in situ*. Finalmente, se indican algunas conclusiones y futuras líneas de investigación para favorecer y potenciar el uso de esta biotecnología de conservación.

Palabras clave:

Bacterias | Biomineralización | Carbonato cálcico | Conservación | Consolidación | Patrimonio cultural | Piedra |

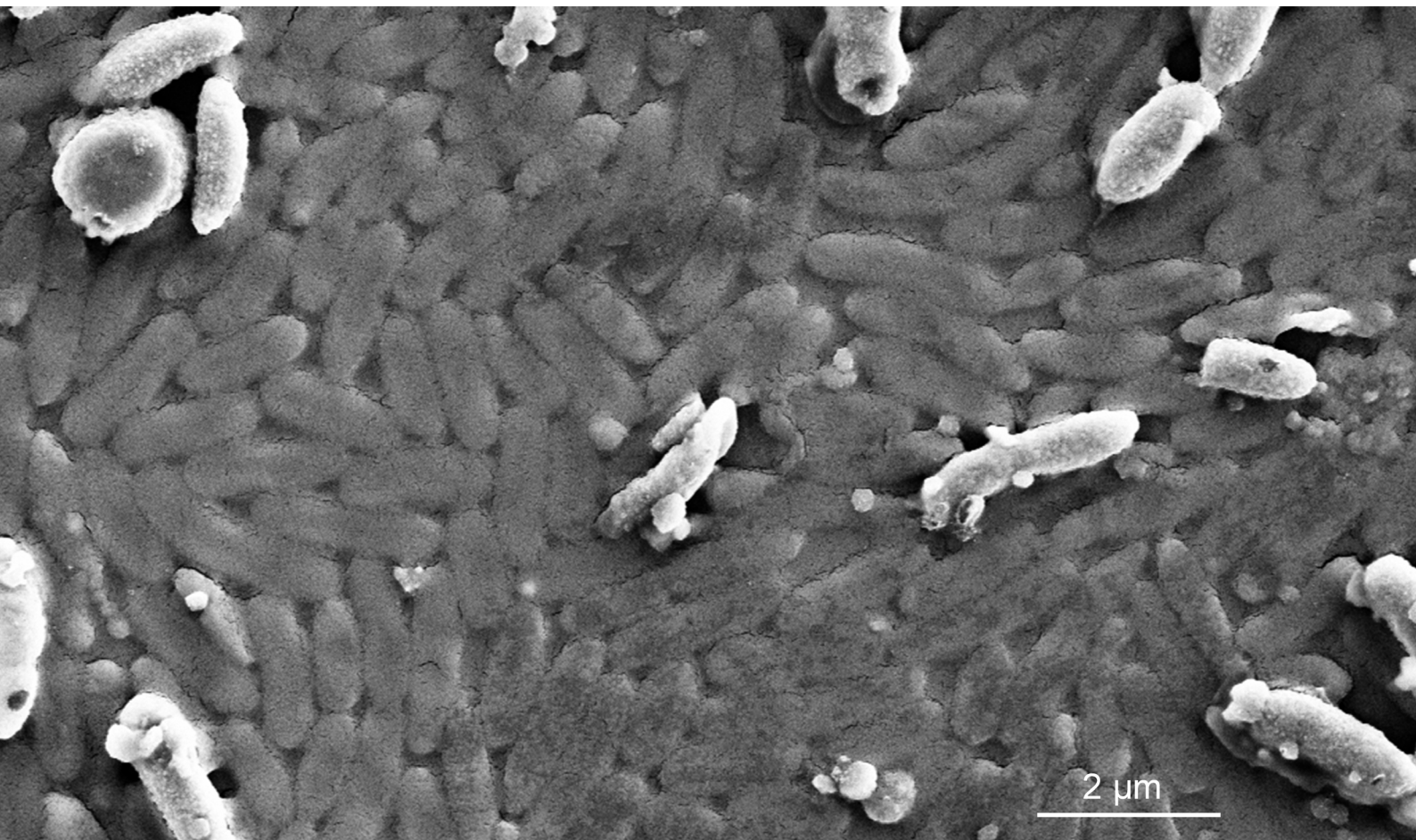


Imagen de microscopía electrónica de barrido de células bacterianas parcialmente calcificadas durante los primeros estadios de carbonatogénesis | fuente Jroundi et ál. 2017

INTRODUCCIÓN

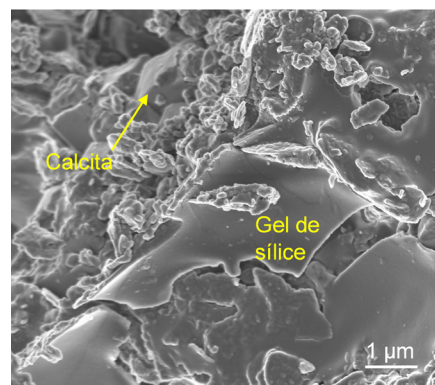
Los monumentos realizados en piedra sufren a lo largo del tiempo diversos procesos de alteración física (Rodríguez-Navarro et ál. 1998; Rodríguez-Navarro y Doehne 1999; Schiro et ál. 2012; Flatt et ál. 2017), química (Rodríguez-Navarro y Sebastian 1996; Doehne y Price 2010) y/o biológica (Warscheid y Braams 2000), causando pérdidas de material irreversibles que hacen peligrar la supervivencia de elementos clave del patrimonio histórico-artístico mundial (Siegesmund y Snethlage 2011). Las imágenes de esta página muestran un ejemplo de tales fenómenos, comúnmente conocidos como “mal de la piedra”, procesos agravados en las últimas décadas tanto por el aumento de emisiones contaminantes (SO_2 , NO_x y partículas) fruto del uso de combustibles fósiles, como por fenómenos de salinización y clima extremo asociados al calentamiento global (Bonazza et ál. 2009; Doehne y Price 2010; Siegesmund y Snethlage 2011).

Para evitar que la alteración progrese, y devolver al material pétreo degradado su resistencia mecánica y cohesión perdidas, se han aplicado distintos tratamientos de conservación, destacando los de protección y consolidación (Clifton 1980; Lazzarini y Tabasso 1980). Los primeros aportan características hidrofugantes a la superficie tratada, evitando que el agua, primer agente de deterioro que afecta a la piedra monumental, pueda interactuar con dicho sustrato y/o acceder a su sistema poroso (Charola 1995). Los segundos implican la aplicación de un producto consolidante que, al penetrar en el sistema poroso del material alterado, cementa los granos minerales del

Patio de los Leones de la Alhambra (Granada). Aspecto general (derecha) y detalle de dos de las columnas del ala este (izquierda) mostrando un elevado grado de alteración por pérdidas de material asociadas a desplazados y arenización del mármol de Macael. Los tratamientos previos con distintos materiales, incluyendo silicato de etilo, no han conseguido frenar el proceso de degradación | fotos Carlos Rodríguez Navarro



mismo y/o rellena fracturas, consiguiendo así un incremento de su resistencia mecánica (idealmente hasta alcanzar los valores de la piedra sin alterar) (Delgado Rodríguez 2022). Sin embargo, los tratamientos convencionales a base de polímeros orgánicos, tales como resinas acrílicas, vinílicas o epoxídicas (Horie 1987; Selwitz 1992), así como los organo-silícicos (alcoxisilanos y sus derivados) (Wheeler 2005), comúnmente utilizados como protectores y/o consolidantes en intervenciones de conservación de piedra monumental desde la segunda mitad del siglo XX, han demostrado una eficacia limitada y, en algunos casos, han agravado la alteración del sustrato tratado (Doehne y Price 2010; Giorgi et ál. 2010). En la imagen de la derecha se muestra un ejemplo de la poca eficacia de un tratamiento con silicato de etilo (alcoxisilano), aplicado sobre mármol de Macael (columnas del Patio de los Leones de la Alhambra, Granada), formándose un film superficial totalmente fracturado (debido a la retracción del gel de sílice durante el secado) y sin cohesión ni unión con el sustrato que se pretendía consolidar. Este tipo de efectos negativos propició que en las últimas décadas se desarrollasen nuevos tratamientos de protección y consolidación más eficaces y compatibles con sustratos inorgánicos (piedra, morteros, cerámicas). Entre estos destacan los de naturaleza inorgánica, que a priori deberían ser más compatibles con el sustrato inorgánico (piedra) al que se aplican (Hansen et ál. 2003). Tal es el caso, por ejemplo, de las nanocales, dispersiones alcohólicas de nanopartículas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, que al carbonatar en el seno poroso del material tratado generan un cemento de CaCO_3 que actúa como consolidante (Baglioni, Chelazzi y Giorgi 2015; Rodríguez-Navarro y Ruiz-Agudo 2018). Estos nuevos consolidantes, no obstante, también tienen ciertas limitaciones, como el escaso grado de penetración de las nanocales en ciertos casos, fundamentalmente por su migración hacia la superficie durante la evaporación del solvente (alcohol) (Borsoi et ál. 2016). Otros tratamientos inorgánicos, basados por ejemplo en la conversión de carbonatos de calcio de calizas y mármoles en oxalatos (Burgos-Cara, Ruiz-Agudo y Rodríguez-Navarro 2017) o en fosfatos de calcio (Sassoni, Naidu y Scherer 2011), fases extremadamente insolubles, son bastante prometedores como protectores, y en el caso del tratamiento de conversión en fosfatos también puede actuar como consolidante en piedras calizas porosas (Graziani, Sassoni y Franzoni 2015). Pero estos últimos tratamientos no permiten la protección y/o consolidación de sustratos pétreos no calcáreos.



Microscopía electrónica de barrido (SEM) del mármol de una de las columnas del Patio de los Leones de la Alhambra sobre la que se aplicó un consolidante de silicato de etilo. Se observa que el gel de sílice resultante del curado del tratamiento está totalmente fracturado y despegado del sustrato calcítico (mármol), no ofreciendo ningún efecto consolidante | imagen Carlos Rodríguez Navarro

LA BIOMINERALIZACIÓN BACTERIANA DE CARBONATOS DE CALCIO

Para tratar de evitar las limitaciones y problemas anteriormente indicados, y conseguir una consolidación más profunda y eficaz en diferentes sustratos, se ha explorado la posibilidad de generar *in situ*, en el seno poroso del material a consolidar, un nuevo cemento inorgánico, eficaz y compatible, mediante biomineralización de CaCO_3 inducida por bacterias (Adolphe et ál. 1990; Oriol et ál. 1993; Le Mateyer-Lebrel et ál. 1999; Tiano, Biagiotti y Mastromei 1999;

Rodríguez-Navarro et ál. 2003, 2012; Jiménez-López et ál. 2007, 2008; De Muynck, De Belie y Verstraete 2010; Jroundi et ál. 2010, 2012, 2017; Jroundi, González Muñoz y Rodríguez Navarro 2021; Elert et ál. 2021).

La biomineralización es el proceso mediante el cual determinados seres vivos producen minerales de forma controlada o inducida (Lowenstam y Weiner 1989). Tales biominerales (como las conchas de moluscos o nuestros huesos) son híbridos orgánico-inorgánicos con una determinada funcionalidad (por ejemplo, protección, visión o esqueleto/sopORTE). Un aspecto clave de los biominerales son sus propiedades físico-químico-mecánicas que trascienden las de sus componentes individuales. Por ejemplo, el nácar de las conchas de los bivalvos, formado por placas micrométricas de aragonito (CaCO_3) y una pequeña fracción (< 5 %) de biomoléculas orgánicas (proteínas y polisacáridos), presenta una resistencia a la fractura diez veces mayor que la del aragonito geogénico (Sun y Bhushan 2012). Además de por organismos pluricelulares, los biominerales también son generados por microorganismos tales como las bacterias. De hecho, la biomineralización de carbonatos por bacterias, la llamada carbonatogénesis, es un fenómeno ubicuo en todo tipo de ambientes naturales, llevado a cabo por diversas bacterias de muy distintas especies (Boquet, Boronat y Ramos-Cormenzana 1973), contribuyendo a la formación de sedimentos y rocas carbonatadas (Castanier, Le Métayer-Levrel y Perthuisot 1999), y encontrando aplicaciones tanto en la conservación del patrimonio histórico-artístico como en el campo de la construcción y la ingeniería civil (De Muynck, De Belie y Verstraete 2010; Dhami, Reddy y Mukherjee 2013, 2014; Zhu y Dittrich, 2016).

La capacidad de las bacterias carbonatogénicas de producir carbonatos tiene su origen en la posesión de diversas rutas metabólicas que inducen dicha biomineralización (Zhu y Dittrich 2016). Las más importantes son: (a) fotosíntesis oxigénica; (b) reducción de sulfatos y nitratos; (c) oxidación de metano; (d) amonificación por degradación de proteínas; y (e) degradación (hidrólisis) de urea o ácido úrico (Castanier, Le Métayer-Levrel y Perthuisot 1999). De estas rutas, las dos últimas son las implicadas en la producción bacteriana de carbonatos con aplicaciones en la conservación del patrimonio histórico-artístico.

Curiosamente, se ha comprobado que en determinados edificios históricos en los que de forma natural se ha desarrollado sobre la piedra una pátina que protege al substrato, ésta típicamente incluye biominerales, muchos de ellos carbonatos de calcio generados por bacterias (Urzi, García Vallés y Vendrell 1999). Lo anterior avala que la precipitación bacteriana de carbonatos es un fenómeno extendido que puede contribuir de forma natural a la protección de la piedra. Este hecho, junto con la existencia de numerosas especies de bacterias carbonatogénicas, con elevada capacidad de producir cementos carbonatados, han propiciado que en las últimas décadas se hayan desarrollado y aplicado diversos métodos de protección y/o consoli-

dación de piedra ornamental y otros materiales del patrimonio histórico-artístico basados en la precipitación de carbonatos por bacterias. Estos métodos podemos agruparlos en los tres tipos que se describen a continuación.

MÉTODO 1: EL MÉTODO CALCITE BIOCONCEPT Y SUS VARIANTES

El primer método de protección/consolidación bacteriana de piedra ornamental fue desarrollado por un grupo de investigadores de la Universidad Pierre et Marie Curie de Paris y de la Universidad de Nantes (Francia) a comienzos de la década de los noventa del siglo pasado (Adolphe et ál. 1990; Oriol et ál. 1993; Castanier et ál. 2000). Se basaba en la aplicación de una población de bacterias carbonatogénicas, de origen externo al sustrato a tratar, *Bacillus megaterium* o *Bacillus cereus*, sobre una piedra caliza alterada, aportando (durante varios días) un medio líquido nutritivo para favorecer el crecimiento y proliferación de las mismas. Al cabo de unos pocos días su actividad metabólica genera las condiciones fisicoquímicas óptimas (alcalinidad y concentración de Ca^{2+} y CO_3^{2-}) para la precipitación de un biocemento de CaCO_3 en la superficie de la piedra tratada, cemento que Le Métayer-Levrel et ál. (1999) denominaban “biocalcin”. Se asumía que la producción del cemento carbonatado bacteriano podría ocurrir no solo en la superficie de los materiales pétreos tratados, sino también en su seno poroso, ya que el tamaño bacteriano es suficientemente pequeño (frecuentemente entre ~1 y unos pocos μm) como para poder acceder a la mayoría de los poros de una piedra porosa. Este primer tipo de tratamiento de consolidación con bacterias fue patentado y comercializado con el nombre CALCITE Bioconcept y se aplicó en diversos edificios históricos de Francia (Le Métayer-Levrel et ál. 1999; Castanier et ál. 2000).

Sin embargo, la poca penetración del tratamiento (~ 10 μm), el uso de una bacteria potencialmente patógena (algunas cepas de *B. cereus* provocan gastroenteritis), y un medio nutritivo con carbohidratos como fuente de carbono (Adolphe et ál. 1990), que pueden favorecer la proliferación de bacterias productoras de ácidos (y por tanto, procesos de biodeterioro) (Jroundi et ál. 2021), así como la complejidad de la preparación del cultivo bacteriano (que hace necesaria la labor de expertos en microbiología), han hecho que el uso del tratamiento CALCITE Bioconcept no haya sido muy extendido.

Para tratar de paliar estas limitaciones, el grupo de la Universidad de Granada (UGR), dedicado al estudio y conservación de monumentos, propuso el uso de una bacteria carbonatogénica del suelo, no patógena, *Myxococcus xanthus*, como alternativa para la consolidación de piedra (Rodríguez-Navarro et ál. 2003). Esta bacteria utiliza los aminoácidos como fuente de carbono y de nitrógeno, generando como subproductos CO_2 y NH_3 . El último incrementa el pH del medio, favoreciendo la formación de iones carbonato a partir del CO_2

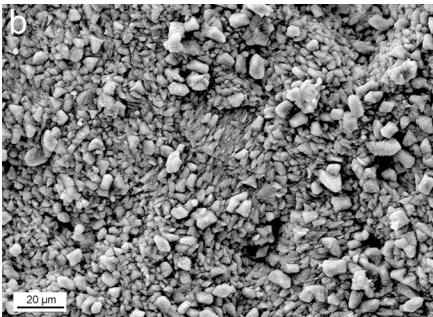
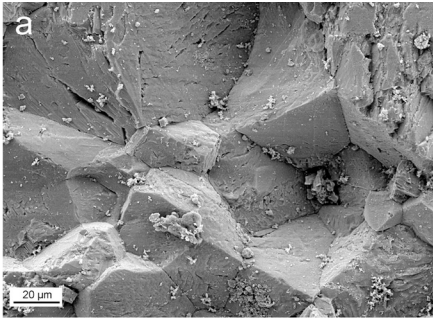
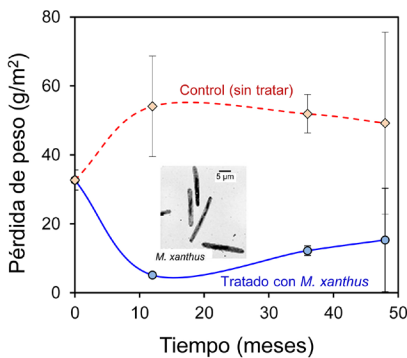


Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) del mármol de Macael antes (a) y después (b) del tratamiento de protección/consolidación mediante producción de CaCO_3 por *Myxococcus xanthus* inoculado en medio M-3P. Se observa la formación epitaxial de calcita bacteriana sobre los cristales de calcita del mármol | fuente modificado de Rodríguez-Navarro et ál. (2011)



Pérdida de peso a lo largo del tiempo (ensayo de la pegatina) de bloques de calcarenita del paramento externo de la girola del Monasterio de San Jerónimo (Granada) sin tratar (línea roja discontinua) y tratados con *M. xanthus* inoculado en solución nutritiva M-3P (línea azul continua). Obsérvese la gran reducción de pérdida de material superficial tras el tratamiento bacteriano y cómo esta eficacia consolidante y protectora se mantiene en el tiempo (hasta cuatro años tras la aplicación del tratamiento). Las barras de error muestran la desviación estándar | fuente modificado de Rodríguez-Navarro et ál. (2015)

del aire y del producido por el metabolismo bacteriano. Los iones carbonato reaccionan con los iones de calcio (aportados en el medio de cultivo) provocando la precipitación de un cemento bacteriano de CaCO_3 . Un aspecto interesante es que este tipo de bacterias forman colonias con cierta movilidad (por deslizamiento) lo que les permite acceder al interior del sistema poroso de los materiales pétreos en los que se aplican. Como resultado, se obtuvo una excelente consolidación en profundidad tanto en laboratorio como *in situ* en el caso de la piedra calcarenita de Santa Pudía de uso en el patrimonio construido de Granada (Rodríguez-Navarro et ál. 2003; Rodríguez Navarro, Jraundi y González Muñoz 2015). Además, al usarse la solución nutritiva M-3P, que incluye 1 % Bacto Casitone (hidrolizado de caseína), 1 % $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{-COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Ca total: 43.44 mM), 0.2 % $\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ (K total: 35.6 mM; CO_3^{2-} total: 17.8 mM), y 10 mM de tampón fosfato en agua destilada (pH 8), pero que no tiene carbohidratos como fuente de carbono, se evitaba la posible proliferación de bacterias productoras de ácidos.

Un resultado clave de este último tipo de tratamiento bacteriano fue observar que la calcita recién formada crecía sintaxialmente (en continuidad cristalográfica) sobre los cristales de calcita del sustrato (en el caso de calizas y mármoles) (ver imágenes del margen izquierdo). Por otra parte, la calcita bacteriana es un biomineral que incluye subproductos orgánicos de la propia actividad metabólica bacteriana y restos celulares (Rodríguez-Navarro et ál. 2003; Jroundi et ál. 2017), con lo que la incorporación de tales productos orgánicos en la red cristalina de la calcita incrementa su dureza y resistencia mecánica, tal y como ocurre por la incorporación de biomoléculas en los biominerales de calcita producidos por distintos organismos (por ejemplo, conchas de moluscos) (Pokroy, Fitch y Zolotoyabko 2006). Todo ello propició, por una parte, que el cemento carbonatado bacteriano presentase una excelente unión con los carbonatos de la piedra tratada y, por otra, que el material adquiriese una mayor resistencia frente al estrés mecánico y la meteorización química que la calcita puramente abiótica de un material sin tratar. Esto se pudo comprobar mediante diversos ensayos, como el de pérdida de peso por aplicación de una pegatina en la superficie tratada (gráfico en el margen izquierdo).

El grupo de la UGR pudo comprobar que, usando un cultivo de *M. xanthus*, no solo era posible consolidar calizas porosas como la calcarenita de Santa Pudía, sino que se obtenían buenos resultados en otros sustratos carbonatados, tales como el mármol, y en sustratos silicatados tales como las areniscas y el vidrio poroso (Rodríguez-Navarro et ál. 2012). En estos dos últimos casos, la ausencia de un sustrato de cristales de calcita favorecía la nucleación y crecimiento de vaterita, uno de los polimorfos del carbonato cálcico.

Otros grupos de investigación han utilizado otros medios de cultivo y otras especies de bacterias para consolidar distintos tipos de piedras porosas, fundamentalmente calizas, con resultados generalmente satisfactorios

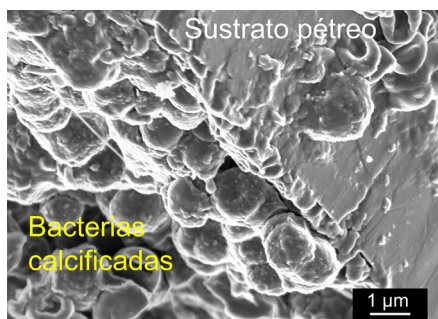
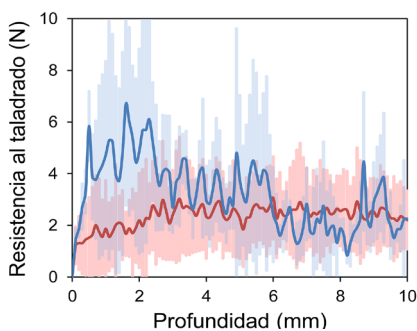
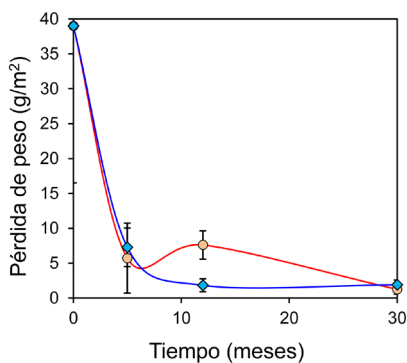
(De Muynck, De Belie y Verstraete 2010). No obstante, Tiano, Biagiotti y Mastromei (1999) observaron que la aplicación en piedra de Lecce (calcarenita) de cultivos de *Micrococcus* sp. (aislado de un monumento) y de *Bacillus subtilis* producía una consolidación muy limitada y favorecía la proliferación de hongos, concluyendo que tal tipo de tratamiento no era recomendable para la consolidación de piedra calcárea. En este caso hay que señalar que el medio de cultivo utilizado (medio B4, que contiene acetato cálcico 0.25 %; extracto de levadura, 0.4 %; dextrosa, 0.5 %; pH 8) podría estar relacionado con la formación de colonias de hongos. Por otro lado, el consorcio Biobrush utilizó bacterias sulfato reductoras para eliminar costras de yeso desarrolladas sobre piedra calcárea, al mismo tiempo que se inducía la precipitación de calcita como material cementante (May 2005; Webster y May 2006). El grupo de la Universidad de Gante, además de aplicar la biomineralización bacteriana utilizando un cultivo de *Bacillus* sp. para la consolidación de piedra calcárea porosa (Dick et ál. 2006), utilizó este mismo tipo de tratamiento para la protección de morteros de cemento y hormigón (De Muynck et ál. 2008).

MÉTODO 2: ACTIVACIÓN DE LAS BATERÍAS CARBONATOGÉNICAS INDÍGENAS

Si bien varios de los tratamientos arriba indicados dieron resultados positivos, estos métodos son complejos y costosos ya que se necesita personal especializado (microbiólogos) y un laboratorio adecuado para preparar los cultivos bacterianos. Además, hay que asegurarse de que la aplicación *in situ* se hace en el momento óptimo, es decir cuando el cultivo bacteriano está en la fase de crecimiento exponencial. Esto hace que, en la práctica, la aplicación de estos tratamientos sea compleja, limitando su aceptación por parte de la comunidad de conservadores y restauradores.

Para tratar de paliar estas limitaciones, nuestro grupo patentó en 2008 un nuevo método de consolidación bacteriana basado en la activación selectiva de la microbiota bacteriana carbonatogénica indígena de la piedra ornamental a tratar (González-Muñoz et ál. 2008). Dicha activación se consigue mediante la aplicación de un medio de cultivo estéril con una composición muy específica. Este medio de cultivo es el M-3P, citado más arriba.

Obviamente, existe una premisa para que el tratamiento sea eficaz: que en la piedra o sustrato a tratar existan bacterias carbonatogénicas. En este sentido hay que señalar que numerosos estudios demuestran que en la inmensa mayoría de los sustratos pétreos de edificios históricos la microbiota extraída y analizada incluye abundantes bacterias carbonatogénicas (Urzi, García Vallés y Vendrell 1999; Jiménez-López et ál. 2007, 2008; Jroundi et ál. 2010; 2017; Ettenauer et ál. 2011; Montañó-Salazar, Lizarazo-Marriaga y Brandão 2018; Rodríguez-Navarro et ál. 2012, 2015; Elert et ál. 2021; Tiano, Biagiotti y



Tratamiento de piedra por activación de las bacterias indígenas carbonatogénicas con medio de cultivo estéril M-3P. Imagen superior: pérdida de peso con el tiempo (ensayo de la pegatina) de la piedra calcarenita de la crestería de la Capilla Real (Granada) tratada *in situ* con M-3P (línea roja) y con silicato de etilo (línea azul). Nótese que ambos tratamientos tienen un comportamiento parecido | fuente modificado de Rodríguez-Navarro et ál. 2015. Imagen central: DR de calcarenita del paramento del claustro del Monasterio de San Jerónimo (Granada) sin tratar (línea roja) y tratada con M-3P (línea azul). Las bandas de coloración rosa y azul claro marcan la desviación estándar | fuente Jroundi et ál. 2017. Imagen inferior: imagen de SEM de toba volcánica del Templo 10L-18 del sitio arqueológico Mmaya de Copán (Honduras) tras el tratamiento con solución estéril M-3P. Nótese las células bacterianas calcificadas, unidas entre si y al sustrato pétreo, mediante un cemento bacteriano carbonatado | imagen Kerstin Elert

Mastromei 1999). En particular, se ha detectado que una fracción importante de las bacterias identificadas por métodos genómicos/moleculares incluye numerosas especies de los filos *Bacillota*, *Actinomycetota* y *Pseudomonadota*, todas ellas capaces de producir carbonatos si se cultivan en el medio M-3P (Jroundi et ál. 2010, 2017, 2020). Dichas bacterias carbonatogénicas están presentes en distintos tipos de sustratos (piedras calcáreas y silicatadas, morteros de cal y yeserías) y en ambientes muy diversos (desde zonas de clima mediterráneo hasta zonas tropicales) (Tiano, Biagiotti y Mastromei 1999; Urzi, García Vallés y Vendrell 1999; Ettenauer et ál. 2011; Montañó-Salazar, Lizarazo-Marriaga y Brandão 2018; Fang et ál. 2017; Li et ál. 2018; Jroundi et ál. 2010, 2017, 2020). En algunos casos, su capacidad de producción de carbonatos es tan elevada que, por ejemplo, bacterias del género *Bacillus* y *Pseudomonas*, se han usado para cementar suelos (Dhami, Reddy y Mukherjee 2013). Además, los análisis de microbiota total de diversos sustratos pétreos y de morteros muestran que el 100 % de las bacterias cultivables en el medio M-3P son carbonatogénicas y no prolifera ninguna bacteria productora de ácidos (Jroundi et ál. 2010, 2017, 2020). Por otro lado, en piedras degradadas se han observado tamaños de poblaciones de tales bacterias carbonatogénicas en torno a 10^3 unidades formadoras de colonias (UFC)/g, aumentando hasta valores de 10^7 UFC/g tras la aplicación del tratamiento M-3P (Jroundi et ál. 2017; Elert et ál. 2021), lo que subraya la eficacia de este tipo de tratamiento de activación de la comunidad indígena bacteriana carbonatogénica. Además, un aspecto muy positivo de este tipo de tratamiento es su capacidad de disminuir la cantidad de bacterias productoras de ácidos, si éstas estaban presentes antes de su aplicación (Jroundi et ál. 2020). Estos resultados demuestran que el tratamiento es extraordinariamente selectivo, puesto que solo activa las bacterias carbonatogénicas, y puede ser eficaz para múltiples tipos de sustratos y en diversos ambientes, ya que en todas las situaciones ensayadas hasta la fecha se ha conseguido que se activen suficientes bacterias carbonatogénicas como para producir un biocemento de carbonato de cálcico con un elevado poder consolidante (Delgado Rodríguez y Ferreira-Pinto, 2019; Jroundi et ál. 2017; Elert et ál. 2021).

Respecto al poder consolidante del tratamiento de activación con solución nutritiva estéril M-3P, los ensayos realizados tanto en laboratorio como *in situ* (en edificios históricos) indican un notable incremento de la resistencia mecánica, tanto en superficie (medidas de pérdida de peso por ensayo de la pegatina) como en profundidad (ensayo de resistencia al taladrado, DR), tal y como se observa en las imágenes de esta página. Estos efectos son debidos a la formación de un biocemento de CaCO_3 que recubre las paredes de los poros de las piedras tratadas, sin bloquearlos (imagen inferior).

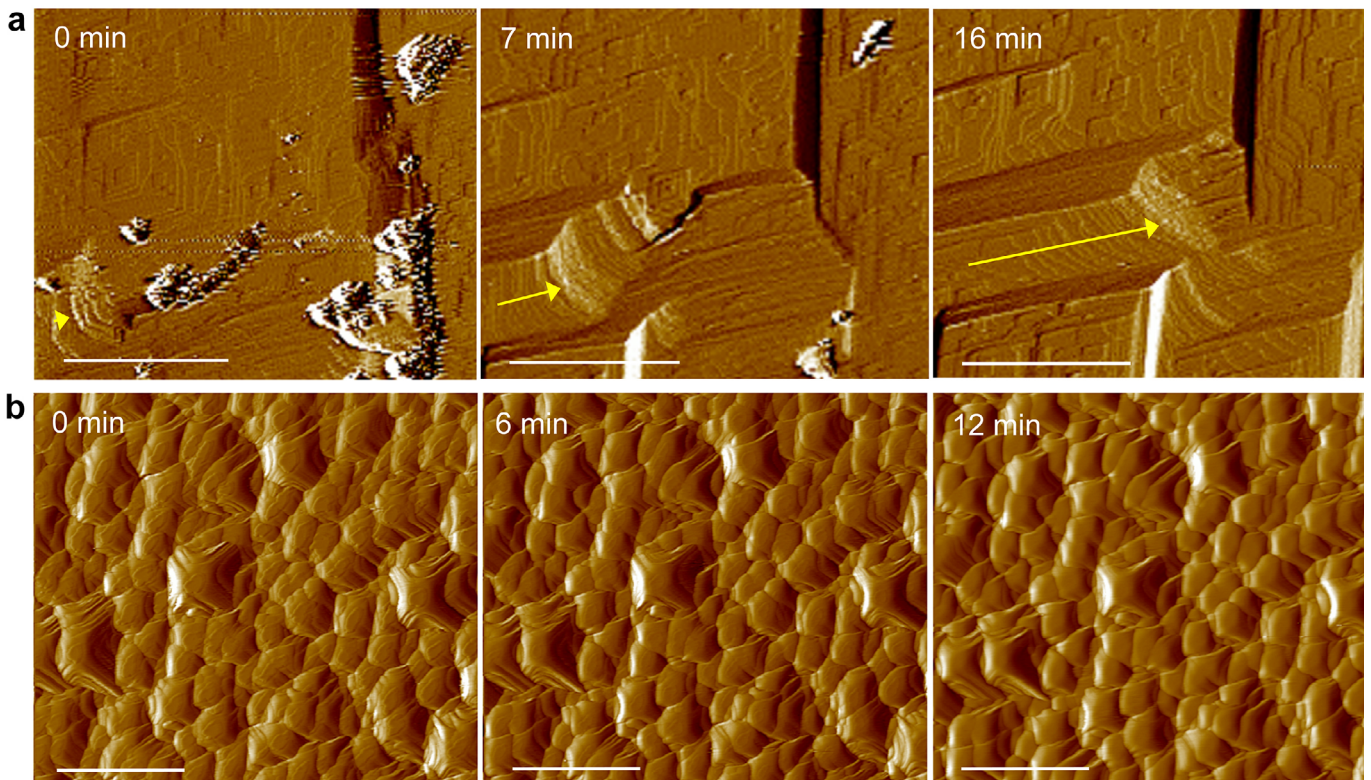
Es importante señalar que la eficacia de este tratamiento no se limita a climas moderados (de tipo mediterráneo), sino que se extiende a otros ambientes más complejos y agresivos, caso del área Maya, con un clima tropical.

neralización bacteriana no sólo fue eficaz consolidando la piedra volcánica de Copán, sino que también generó un importante efecto protector, posiblemente por la acción de las sustancias exopoliméricas (EPS) bacterianas. El EPS junto con las células bacterianas forman biopelículas, que pueden ser hidrofóbicas (Epstein et ál. 2011). Además, el EPS puede interactuar con las arcillas expansivas inhibiendo/limitando su expansión (Alimova et ál. 2009).

MÉTODO 3: AUTOINOCULACIÓN CON LA MICROBIOTA INDÍGENA

Nuestro grupo de la UGR también ensayó una variación del anterior tratamiento para un problema muy difícil: la alteración masiva de la calcarenita porosa del Monasterio de San Jerónimo (Granada), muy degradada por problemas de cristalización de sales. La nueva estrategia conllevó el aislamiento, identificación y cultivo en laboratorio (en medio M-3P) de las bacterias carbonatogénicas indígenas presentes en la piedra calcarenita alterada del Monasterio de San Jerónimo. A continuación, este cultivo de bacterias carbonatogénicas que incluía numerosas especies (Jroundi et ál. 2017) se (re)aplicó (autoinoculación) sobre la misma piedra de la que se extrajo esta microbiota bacteriana autóctona. Tras la aplicación del cultivo, durante 6 días se aplicó solución nutritiva M-3P estéril (dos veces al día, hasta saturación).

Imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) *in situ* con resolución temporal de la disolución de calcita. a) Control (sin tratar) y b) Superficie de calcita tratada con bacterias carbonatogénicas, expuestas a una solución 1 M de MgSO₄. Tiempo = 0 min representa el momento en que se inyectó la solución salina en la celda de fluidos del AFM. Las flechas amarillas en (a) muestran el retroceso con el tiempo del macropeldaño (debido a la rápida disolución de la calcita). No se observa disolución en (b) durante el transcurso del experimento. Barra de escala: 1 µm. | fuente Jroundi et ál. (2017)



Finalmente, tras la aplicación del tratamiento, se evaluó su eficacia comparándola con la de los tratamientos (i) *M. xanthus* (Método 1) y (ii) solución M-3P sin inocular (estéril) (Método 2). Los tres tratamientos se aplicaron al mismo tiempo en bloques de calcarenita del edificio con igual exposición y nivel de alteración (Jroundi et ál. 2017). El tercer método, el de autoinoculación, produjo el mayor nivel de consolidación (medido *in situ* mediante pruebas de la pegatina y DR), posiblemente porque las bacterias carbonatogénicas aisladas y cultivadas en el laboratorio ya estaban adaptadas al ambiente salino de la calcarenita degradada. Ello favoreció que al re-aplicarlas sobre la piedra proliferaran fácilmente y generaran abundante cemento de CaCO₃. No obstante, hay que señalar que el Método 2 permitió obtener una consolidación, si no tan elevada como el Método 3, sí bastante aceptable, mientras que el Método 1 produjo un menor grado de consolidación. Por otro lado, se observó que todos los tratamientos generaban una notable protección superficial frente a la disolución (imagen de la página anterior) (Jroundi et ál. 2017).

CONCLUSIONES

La protección y consolidación de la piedra mediante el uso de bacterias es un método novedoso, ecológico y muy efectivo, que en gran medida permite paliar los problemas y/o ineficacia de los tratamientos de conservación tradicionalmente aplicados a la piedra ornamental.

Existen básicamente tres métodos de tratamiento de la piedra con bacterias productoras de carbonatos (bacterias carbonatogénicas): (i) Método 1: aplicación de un cultivo bacteriano externo a la piedra; (ii) Método 2: activación de las bacterias carbonatogénicas presentes en un sustrato pétreo mediante aplicación de una solución nutritiva estéril (M-3P); y (iii) Método 3: extracción y cultivo en laboratorio de la microbiota bacteriana carbonatogénica indígena de un sustrato pétreo, y posterior autoinoculación de la misma en dicho sustrato. Los tres métodos consolidan y protegen la piedra tratada, especialmente en el caso de sustratos calcáreos. No obstante, los mejores resultados, considerando aspectos tales como facilidad de aplicación, así como grado de protección y consolidación alcanzados, se obtienen con el Método 2. Sin embargo, los mejores resultados en términos absolutos de protección y consolidación se obtienen con el Método 3, aunque dada su mayor complejidad, este último método debería preferentemente usarse en casos extremos de degradación de la piedra.

Una conclusión clave del estudio de las aplicaciones de bacterias para la conservación de la piedra es que, de forma natural, existen numerosas bacterias carbonatogénicas indígenas en prácticamente todos los sustratos y ambientes analizados hasta la fecha. Ello abre la posibilidad de usar los

métodos 2 y 3 en prácticamente todo tipo de sustratos pétreos degradados. Destacar que en la actualidad se comercializa el tratamiento de activación de la microbiota bacteriana carbonatogénica mediante la aplicación del medio estéril M-3P (patentado). Dicha comercialización la realiza la empresa KBYO Biological S.L.

Es necesario seguir evaluando la efectividad de estos nuevos métodos de conservación de la piedra monumental aplicándolos tanto en laboratorio, como en ensayos *in situ*, a pequeña escala, en distintos sustratos y en un número más amplio de ambientes, evaluando su efectividad de forma precisa. Nótese que un aspecto a considerar en el futuro es el desarrollo de nuevos métodos de evaluación *in situ* de la efectividad de tales tratamientos, aspecto bastante complejo y que no ha sido resuelto hasta la fecha. Tales ensayos y aplicaciones *in situ* del tratamiento de consolidación y protección de la piedra con bacterias están permitiendo en la actualidad, y permitirán en el futuro, evaluar su eficacia a medio y largo plazo, ofreciendo a los restauradores y conservadores resultados que avalen su aplicación a gran escala en intervenciones de conservación y restauración.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Gobierno de España, proyectos PID2021.125305NB.I00 financiado por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033 y por FEDER; la Junta de Andalucía, grupos de investigación RNM-179 y BIO-103, y proyectos B-RNM-574-UGR20 y P20_00675; y la Universidad de Granada, Unidad Científica de Excelencia UCE-PP2016-05.

BIBLIOGRAFÍA

- Adolphe, J.M., Loubière, J.F., Paradas, J. y Soleilhavoup, F. (1990) *Procédé de traitement biologique d'une surface artificielle*. European patent 90400G97.0 (after French patent 8903517, 1989)
- Alimova, A., Katz, A., Steiner, N., Rudolph, E., Wei, H., Steiner J.C. y Gottlieb P. (2009) Bacteria-clay interaction: structural changes in smectite induced during biofilm formation. *Clays Clay Minerals*, vol. 57, pp. 205-212
- Baglioni, P., Chelazzi, D. y Giorgi, R. (2015) *Nanotechnologies in the conservation of cultural heritage: a compendium of materials and techniques*. Dordrecht: Springer
- Bonazza, A., Messina, P., Sabbioni, C., Grossi, C.M. y Brimblecombe, P. (2009) Mapping the impact of climate change on surface recession of carbonate buildings in Europe. *Science of the Total Environment*, vol. 407, pp. 2039-2050
- Boquet, E., Boronat, A. y Ramos-Cormenzana, A. (1973) Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature*, vol. 246, pp. 527-529
- Borsoi, G., Lubelli, B., van Hees, R., Veiga, R. y Silva, A.S. (2016) Understanding the transport of nanolime consolidants within Maastricht limestone. *Journal of Cultural Heritage*, vol. 18, pp. 242-249
- Burgos-Cara, A., Ruiz-Agudo, E. y Rodríguez-Navarro, C. (2017) Effectiveness of oxalic acid treatments for the protection of marble surfaces. *Materials and Design*, vol. 115, pp. 82-92
- Castanier, S., Le Métayer-Levrel, G. y Perthuisot, J.P. (1999) Ca-carbonates precipitation and limestone genesis—the microbiogeologist point of view. *Sedimentary Geology*, vol. 126, pp. 9-23
- Castanier, S., Le Metayer-Levrel, G., Oriol, G., Loubiere, J.F. y Perthuisot, J.P. (2000) Bacterial carbonatogenesis and applications to preservation and restoration of historic property. En: Ciferri, O., Le Tiano, P. y Mastromei, G. (ed.) *Of Microbes and Art: The Role of Microbial Communities in the Degradation and Protection of Cultural Heritage*. New York: Springer, pp. 203-218
- Charola, A.E. (1995) Water-repellent treatments for building stones: A practical overview. *APT Bulletin*, vol. 6, pp. 10-17
- Clifton, J.R. (1980) *Stone consolidating materials: a status report* (vol. 1118). Washington D.C.: Department of Commerce, National Bureau of Standards
- Delgado Rodrigues, J. y Ferreira-Pinto, A.P. (2019) Stone consolidation by biomineralisation. Contribution for a new conceptual and practical approach to consolidate soft decayed limestones. *Journal of Cultural Heritage*, vol. 39, 82-92
- Delgado Rodrigues, J. (2022) Stone Consolidation. Between Science and Practice. En: Gherardi, F. y Maravelaki, P.N. (ed.) *Conserving Stone Heritage*. Cham: Springer, pp. 101-135
- De Muynck, W., Debrouwer, D., De Belie, N. y Verstraete, W. (2008) Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cement and Concrete Research*, vol. 38, pp. 1005-1014
- De Muynck, W., De Belie, N. y Verstraete, W. (2010) Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review. *Ecological Engineering*, vol. 36, pp. 118-136
- Dhama, N.K., Reddy, M.S. y Mukherjee, A. (2013) Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. *Frontiers in Microbiology*, vol. 4. Disponible en; <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2013.00314/full> [Consulta: 08/09/2023]
- Dhama, N.K., Reddy, M.S. y Mukherjee, A. (2014) Application of calcifying bacteria for remediation of stones and cultural heritages. *Frontiers in Microbiology*, vol. 5. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00304/full> [Consulta: 08/09/2023]
- Dick, J., De Windt, W., De Graef, B., Saveyn, H., Van der Meer, P., De Belie, N. y Verstraete, W. (2006) Biodeposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. *Biodegradation*, 1vol. 7, pp. 357-367
- Doehne, E. y C. Price (2010) *Stone Conservation—An Overview of Current Research*. Los Angeles, CA.: The Getty Conservation Institute
- Elert, K., Ruiz-Agudo, E., Jroundi, F., González-Muñoz, M.T., Fash, B.W., Fash, W. L., Valentín, N., De Tagle, A. y Rodríguez-Navarro, C. (2021) Degradation of ancient Maya carved tuff stone at Copan and its bacterial bioconservation. *npj Materials Degradation*, 5, 44
- Elert, K. y Rodríguez-Navarro, C. (2022) Degradation and conservation of clay-containing stone: A review. *Construction and Building Materials*, 330, 127226
- Epstein, K., Pokroy, B., Seminara, A. y Aizenberg, J. (2011) Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, vol. 108, n.º 3, pp. 995-1000
- Ettenauer, J., Piñar, G., Sterflinger, K., González-Muñoz, M.T. y Jroundi, F. (2011) Molecular monitoring of the microbial dynamics occurring on historical limestone buildings during and after the in situ application of different bio-consolidation treatments. *Science of the Total Environment*, vol. 409, pp. 5337-5352
- Fang, B.Z., Salam, N., Han, M.X., Jiao, J.Y., Cheng, J., Wei, D.Q., Xiao, M. y Li, W.J. (2017) Insights on the

effects of heat pretreatment, pH, and calcium salts on isolation of rare Actinobacteria from karstic caves. *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, 1535. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01535/full> [Consulta: 28/09/2023]

- Flatt, R.J., Aly Mohamed, N., Caruso, F., Derluyn, H., Desarnaud, J., Lubelli, B., Espinosa-Marzal, R.M., Pel, L., Rodríguez-Navarro, C., Scherer, G.W., Shahidzadeh, N. y Steiger, M. (2017) Predicting salt damage in practice: a theoretical insight into laboratory tests. *RILEM Technical Letters*, vol. 2, pp. 108-118

- Giorgi, R., Baglioni, M., Berti, D. y Baglioni, P. (2010) New methodologies for the conservation of cultural heritage: micellar solutions, microemulsions, and hydroxide nanoparticles. *Accounts of Chemical Research*, vol. 43, n.º 6, pp. 695-704

- González-Muñoz, M.T., Rodríguez-Navarro, C., Jiménez-López, C. y Rodríguez-Gallego, M. (2008) *Method and product for protecting and reinforcing construction and ornamental materials*. Spanish patent P200602030 (WO2008009771)

- Graziani, G., Sassoni, E. y Franzoni, E. (2015) Consolidation of porous carbonate stones by an innovative phosphate treatment: mechanical strengthening and physical-microstructural compatibility in comparison with TEOS-based treatments. *Heritage Science*, 3, 1

- Hansen, E., Doehne, E., Fidler, J., Larson, J., Martin, B., Matteini, M., Rodríguez-Navarro, C., Sebastián, E., Price, C., De Tagle, A., Teutonico, J.M. y Weiss, N. (2003) A review of selected inorganic consolidants and protective treatments for porous calcareous materials. *Studies in Conservation*, vol. 48 (supl. 1), pp. 13-25

- Horie, C.V. (1987) *Materials for Conservation: Organic Consolidants, Adhesives and Coatings*. London: Butterworths

- Jiménez-López, C., Rodríguez-Navarro, C., Pinar, G., Carrillo-Rosua, F.J., Rodríguez-Gallego, M. y González-Muñoz, M.T. (2007) Consolidation of degraded ornamental porous limestone stone by calcium carbonate precipitation induced by the microbiota inhabiting the stone. *Chemosphere*, vol. 68, pp. 1929-1936

- Jiménez-López, C., Jroundi, F., Pascolini, C., Rodríguez-Navarro, C., Pinar-Larrubia, G., Rodríguez-Gallego, M. y González-Muñoz, M.T. (2008) Consolidation of quarry calcarenite by calcium carbonate precipitation induced by bacteria activated among the microbiota inhabiting the stone. *International Biodeterioration and Biodegradation*, vol. 62, pp. 352-363

- Jroundi, F., Fernández-Vivas, A., Rodríguez-Navarro, C., Bedmar, E.J. y González-Munoz, M.T. (2010) Bioconservation of deteriorated monumental calcarenite

stone and identification of bacteria with carbonatogenic activity. *Microbial Ecology*, vol. 60, pp. 39-54

- Jroundi, F., Gómez-Suaga, P., Jiménez-López, C., González-Muñoz, M.T. y Fernández-Vivas, M.A. (2012) Stone-isolated carbonatogenic bacteria as inoculants in bioconsolidation treatments for historical limestone. *Science of the Total Environment*, vol. 425, pp. 89-98

- Jroundi, F., Schiro, M., Ruiz-Agudo, E., Elert, K., Martín-Sánchez, I., González-Muñoz, M.T. y Rodríguez-Navarro, C. (2017) Protection and consolidation of stone heritage by self-inoculation with indigenous carbonatogenic bacterial communities. *Nature Communications*, 8, 279

- Jroundi, F., Elert, K., Ruiz-Agudo, E., González-Muñoz, M.T. y Rodríguez-Navarro, C. (2020) Bacterial diversity evolution in Maya plaster and stone following a bio-conservation treatment. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2824. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.599144/full> [Consulta: 28/09/2023]

- Jroundi, F., González-Muñoz, M.T. y Rodríguez-Navarro, C. (2021) Protection and Consolidation of Stone Heritage by Bacterial Carbonatogenesis. En: Joseph, E. (ed.) *Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage*. Berlin: Springer, pp. 281-299

- Lazzarini, L. y Tabasso, M. (1986) *Il Restauro della Pietra*. Padua: Ceda

- Le Metayer-Levrel, G., Castanier, S., Oriol, G., Loubiere, J.F. y Perthuisot, J.P. (1999) Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony. *Sedimentary Geology*, vol. 126, pp. 25-34

- Li, Q., Zhang, B., Ge, Q. y Yang, X. (2018) Calcium carbonate precipitation induced by calcifying bacteria in culture experiments: Influence of the medium on morphology and mineralogy. *International Biodeterioration and Biodegradation*, vol. 134, pp. 83-92

- Lowenstam, H.A. y Weiner, S. (1989) *On biomineralization*. Oxford: Oxford University Press

- May, E. (2005) *Biobrush research monograph: novel approaches to conserve our European heritage*. EVK4-CT-2001-00055 2002-2005

- Montaña-Salazar, S.M., Lizarazo-Marriaga, J. y Brandão, P.F. (2018) Isolation and potential biocementation of calcite precipitation inducing bacteria from Colombian buildings. *Current Microbiology*, vol. 75, pp. 256-265

- Oriol, G., Castanier, S., Le Métayer-Levrel, G. y Loubiere J.F. (1993) The biomineralization: a new process to protect calcareous stone applied to historic monuments. En: Ktoishi, H., Arai, T. y Yamano, K. (ed.) *Proceedings of the 2nd International Conference on Biodeterioration of Cultural Property*. Tokyo: International Communications Specialists, pp. 98-116

- Pokroy, B., Fitch, A. y Zolotoyabko, E. (2006) The microstructure of biogenic calcite: A view by high-resolution synchrotron powder diffraction. *Advanced Materials*, vol. 18, pp. 2363-2368
- Rodríguez-Navarro, C. y Sebastián, E. (1996) Role of particulate matter from vehicle exhaust on porous building stones (limestone) sulfation. *Science of the Total Environment*, vol. 187, pp. 79-91
- Rodríguez-Navarro, C., Sebastián, E., Doehne E. y Ginell, W.S. (1998) The role of sepiolite-palygorskite in the decay of ancient Egyptian limestone sculptures. *Clays and Clay Minerals*, vol. 46, pp. 414-422
- Rodríguez-Navarro, C. y Doehne, E. (1999) Salt weathering: influence of evaporation rate, supersaturation and crystallization pattern. *Earth Surface Processes and Landforms*, vol. 24, pp. 191-209
- Rodríguez-Navarro, C., Rodríguez-Gallego, M., Ben Chekroun, K. y González-Muñoz, M.T. (2003) Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, pp. 2182-2193
- Rodríguez-Navarro, C., González-Muñoz, M.T., Jiménez-López, C. y Rodríguez-Gallego, M. (2011) Bioprotection. En: Reitner, J. y Thiel, V. (ed.) *Encyclopedia of Geobiology*. Encyclopedia of Earth Sciences Series. Dordrecht: Springer, pp. 185-189
- Rodríguez-Navarro, C., Jroundi, F., Schiro, M., Ruiz-Agudo, E. y González-Muñoz, M.T. (2012) Influence of substrate mineralogy on bacterial mineralization of calcium carbonate: implications for stone conservation. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 78, pp. 4017-4029
- Rodríguez-Navarro, C., Jroundi, F. y González-Muñoz, M.T. (2015) Stone consolidation by bacterial carbonatogenesis: evaluation of in situ applications. *Restoration of Buildings and Monuments*, vol. 21, pp. 9-20
- Rodríguez-Navarro, C. y Ruiz-Agudo, E. (2018) Nanolimes: from synthesis to application. *Pure and Applied Chemistry*, vol. 90, pp. 523-550
- Sassoni, E., Naidu, S. y Scherer, G. W. (2011) The use of hydroxyapatite as a new inorganic consolidant for damaged carbonate stones. *Journal of Cultural Heritage*, 12, 346-355
- Schiro, M., Ruiz-Agudo, E. y Rodríguez-Navarro, C. (2012) Damage mechanisms of porous materials due to in-pore salt crystallization. *Physical Review Letters*, 109, 265503
- Selwitz, C. (1992) *Epoxy Resins in Stone Conservation*. Los Angeles: Getty Publications
- Siegesmund, S. y Snethlage, R. (2011) *Stone in Architecture: Properties, Durability*. Berlin: Springer Science
- Sun, J. y Bhushan, B. (2012) Hierarchical structure and mechanical properties of nacre: a review. *RSC Advances*, vol. 2, pp. 7617-7632
- Tiano, P., Biagiotti, L. y Mastromei, G. (1999) Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 36, pp. 139-145
- Urzi, C. E., Garcia Valles, M. y Vendrell, M. (1999) Biomineralisation processes of the rock surfaces observed in field and in laboratory. *Geomicrobiology Journal*, vol. 16, pp. 39-54
- Warscheid, T. y Braams, J. (2000) Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, vol. 46, pp. 343-368
- Webster, A. y May E. (2006) Bioremediation of weathered-building stone surfaces. *Trends in Biotechnology*, vol. 24, pp. 255-260
- Wheeler, G. (2005) *Alkoxysilanes and the Consolidation of Stone*. Los Angeles, CA: Getty Conservation Institute
- Zhu, T. y Dittrich, M. (2016) Carbonate precipitation through microbial activities in natural environment, and their potential in biotechnology: a review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 4, 4 Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2016.00004/full> [Consulta: 28/09/2023]