

**Identificación y caracterización de
comunidades microbianas presentes en
pinturas sobre lienzo.
Estudio de su capacidad como agentes de
biodeterioro**



María del Mar López Miras

Tesis Doctoral
22 de Julio de 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María del Mar López Miras
D.L.: GR 490-2012
ISBN: 978-84-694-6935-4



Identificación y caracterización de comunidades microbianas presentes en pinturas sobre lienzo. Estudio de su capacidad como agentes de biodeterioro

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la Licenciada en Biología María del Mar López Miras para optar al grado de "Doctor por la Universidad de Granada".

Dirigida por los doctores:

Dra. Inés Martín Sánchez

Dr. Fernando Carlos Bolívar Galiano

22 de Julio de 2011

El presente trabajo se ha desarrollado en los laboratorios del Departamento de Microbiología en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada. La investigación realizada ha sido financiada por el Plan Propio de la Universidad de Granada, mediante la concesión de una beca predoctoral. Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación del Gobierno de España, a través de un Proyecto de Investigación de I+D+I (CVI-160).

“Todos los científicos deberían fumar, porque hay que tener la paciencia de una docena de santos Job para dedicarse a la investigación”.

Ernest Rutherford.

Agradecimientos

En primer lugar, mi más sincero agradecimiento a mis directores, la Dra. Inés Martín Sánchez y el Dr. Fernando Bolívar Galiano, por compartir conmigo sus conocimientos científicos, por su apoyo, sus consejos y por haberme guiado en mi etapa predoctoral que culmina con la redacción de esta Tesis Doctoral.

Un agradecimiento especial merece la Dra. Inés Martín Sánchez, porque me ha acompañado en un largo camino que comenzó cuando entré al departamento como alumna interna, hace ya algo más de siete años que se dice pronto, siempre dispuesta a ayudarme tanto a nivel científico como humano, con la que he tenido el privilegio de compartir muchos momentos buenos y otros no tan buenos, aunque todos ellos han merecido la pena, y porque siempre me ha tratado con mucho cariño, consiguiendo que me sintiera como en casa.

Agradecerle a Julio Romero su asesoramiento en temas artísticos y que siempre mostrara su disposición a colaborar con su experiencia en la consecución de esta investigación.

Agradecer al resto de profesores del departamento de Microbiología, así como a todos los compañeros con los que he tenido el placer de trabajar en el laboratorio en distintos momentos de esta etapa que finaliza, porque todos ellos me han ayudado en alguna ocasión, enriqueciéndome tanto a nivel humano como científico. En especial, agradecerle a Antonio Martín Platero sus enseñanzas durante mis primeros pasos en la investigación. También he de agradecer a Concepción Millán, que tantas veces tuvo que autoclavar mis hongos, y a M^a Carmen González por su ayuda en los temas burocráticos que tanto me gustan.

Agradecer a Guadalupe Piñar que me diese la posibilidad de trabajar durante tres meses en la University of Natural Resources and Applied Life Science, donde adquirí conocimientos científicos fundamentales para la realización de este Tesis, resultando una experiencia enriquecedora en todos los aspectos. Aquí no puedo olvidar dar las gracias a las Dras. Katja Sterflinger y Ksenija Lopandic y a Jörg Ettenauer por su permanente disposición a ofrecerme su ayuda.

Agradecer a Africa Yebra el gran interés mostrado por el presente estudio y permitirme disfrutar de su compañía, siempre agradable.

Agradecer a mis niñas, Fany, Luni y Emma todos los momentos buenos que hemos vivido durante nuestro paso por Granada; nunca podré olvidarlos. Y gracias por estar siempre cerca para tenderme vuestra mano en los malos momentos. Os echo de menos.

Agradecer a Fany que esto se acabe a la vez para las dos, porque nos hemos quedado a un paso de perder la cabeza del todo con tanta charla científica.

Agradecer a Jose Manuel por su infinita paciencia, especialmente durante los últimos meses, en los que ha fregado más platos que en toda su vida. Gracias por enseñarme a tomarme las cosas con un poquito más de calma, aunque no siempre lo consiga. Gracias por apoyarme y, simplemente, por estar ahí.

Agradecer a mi hermana Blanca sus dotes para la informática, que han permitido que esta Tesis esté paginada y tenga un índice medio decente. Con el helado y este agradecimiento estamos en paz.

Finalmente, aunque no por ello menos importante, agradecerle a mis padres que siempre me levantaran cuando no tenía fuerzas para seguir y que me hayan hecho ver que todo no es tan negro como yo suelo pintarlo. Agradecerles que siempre confiaran en mí, incluso cuando yo no lo hice. Agradecerle a mi madre que me descubriera el maravilloso mundo en miniatura de la microbiología, aunque acabe en el paro, y a mi padre el ser un ejemplo a seguir de constancia y superación.

Gracias a todos los que de un modo u otro habéis contribuído a que esta Tesis viera al fin la luz.

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	5
CAPITULO I: Introducción y objetivos	9
INTRODUCCION	11
1. CONCEPTO Y MECANISMOS DE BIODETERIORO	13
2. OLEOS SOBRE LIENZO	22
2.1. Materiales constitutivos	22
2.2. Biodeterioro	23
3. BIODETERIORO DE RESINAS NATURALES, SINTETICAS Y CEREORESINAS	30
3.1. Resinas naturales	30
3.2. Cereoresinas	33
3.3. Resinas sintéticas	33
4. METODOS PARA LA DETECCION Y ANALISIS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS PRESENTES EN OBRAS DE ARTE	37
4.1. Técnicas dependientes de cultivo	39
4.2. Técnicas independientes de cultivo	43
4.2.1. Extracción de ADN total	44
4.2.2. Técnicas de tipo <i>fingerprinting</i>	47
4.2.3. Creación de una genoteca	47
4.2.4. Rastreo de la genoteca mediante DGGE	48
4.2.5. Identificación de los miembros de la comunidad microbiana	49
4.3. Métodos dependientes de cultivo Versus Métodos independientes de cultivo	51
5. METODOS EMPLEADOS EN ESTUDIOS EXPERIMENTALES DE BIODETERIORO	53
5.1. Estratigrafía	53
5.2. Espectroscopía Raman	54
OBJETIVOS	57

CAPÍTULO II: Identificación y comunidades microbianas	63
MATERIAL Y METODOS	65
1. OBRAS SELECCIONADAS PARA EL ESTUDIO	67
2. TOMA DE MUESTRAS	68
3. TECNICAS DE ANALISIS ESTRATIGRAFICO	71
3.1. Microscopía óptica por reflexión y por transmisión, con luz polarizada	71
3.2. Espectroscopía IR por transformada de Fourier	72
3.3. Microscopía electrónica ambiental/análisis elemental por energía dispersiva de rayos X (ESEM/EDX)	72
3.4. Cromatografía en fase gaseosa	72
4. TECNICAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS	72
4.1. Aislamiento de microorganismos	72
4.2. Métodos de extracción de ADN	73
4.2.1. Extracción de ADN a partir de cultivos puros	73
4.2.2. Extracción de ADN total	75
4.3. DGGE	76
4.3.1. Amplificación mediante PCR	76
4.3.2. Preparación de geles de poliacrilamida y electroforesis	79
4.4. RAPD	80
4.4.1. Amplificación mediante PCR	80
4.4.2. Electroforesis en gel de agarosa	81
4.5. Construcción y rastreo de genotecas	82
4.5.1. Construcción de genotecas de clones	82
4.5.1.1. Amplificación	82
4.5.1.2. Purificación de los productos de PCR	83
4.5.1.3. Ligación	83
4.5.1.4. Transformación	84
4.5.1.5. Identificación de los recombinantes	84
4.5.2. Rastreo de librerías mediante DGGE	84
4.6. Identificación de los microorganismos integrantes de la comunidad microbiana presente en los lienzos	87
4.6.1. Bacterias y hongos aislados	87
4.6.1.1. Amplificación mediante PCR y secuenciación	87
4.6.1.2. Análisis de las secuencias	88
4.6.2. Secuencias correspondientes a los insertos de los clones	88

5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS EMPLEADOS	89
5.1. Medios de cultivo	89
5.1.1. Medios de crecimiento	89
5.1.2. Medio de cultivo empleado para la identificación de recombinantes	89
5.2. Reactivos	90
RESULTADOS	91
1. OBRA VIRGEN DE GUADALUPE	91
1.1. Técnicas dependientes de cultivo	91
1.1.1. Microorganismos aislados	91
1.1.2. Diversidad genética de los microorganismos aislados	93
1.1.3. Identificación de los microorganismos aislados	96
1.2. Técnicas independientes de cultivo	99
1.2.1. Diversidad genética de los Microorganismos	99
1.2.1. Construcción y rastreo de genotecas	100
1.2.3. Identificación de miembros de la comunidad microbiana	102
1.3. Comparación entre técnicas dependientes e independientes de cultivo	105
2. OBRA CRISTO DE LA PACIENCIA	109
2.1. Técnicas dependientes de cultivo	115
2.1.1. Microorganismos aislados	115
2.1.2. Diversidad genética de los microorganismos aislados	114
2.1.3. Identificación de los microorganismos aislados	116
2.2. Técnicas independientes de cultivo	117
2.2.1. Diversidad genética de los microorganismos	117
2.2.2. Construcción y rastreo de genotecas	118
2.2.3. Identificación de los miembros de la comunidad microbiana	117
2.3. Comparación de técnicas dependientes e independientes de cultivo	119
DISCUSION	121
1. OBRA VIRGEN DE GUADALUPE	123
1.1. Técnicas dependientes de cultivo	123
1.2. Técnicas independientes de cultivo	129
1.3. Comparación entre técnicas dependientes e independientes de cultivo	131

2. OBRA CRISTO DE LA PACIENCIA	135
2.1. Técnicas dependientes de cultivo	135
2.2. Técnicas independientes de cultivo	137
2.3. Comparación entre las técnicas dependientes e independientes de cultivo	140
CAPITULO III: Biodeterioro	145
MATERIAL Y METODOS	147
1. CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS	149
1.1. Preparación de suspensiones bacterianas y fúngicas e inoculación de las galerías API® ZYM	149
1.2. Lectura de los resultados	149
2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ESTUDIOS EXPERIMENTALES DE BIODETERIORO	151
2.1. Preparación de los inóculos	151
2.1.1. Preparación de suspensiones bacterianas	151
2.1.2. Obtención de esporas fúngicas	151
2.2. Soportes de cultivo	152
2.2.1. Preparación de los soportes de cultivo	152
2.2.2. Inoculación de los soportes de cultivo	152
2.3. Probetas	153
2.3.1. Preparación de las probetas	153
2.3.2. Inoculación en las probetas e incubación	154
3. METODOS DE ESTUDIO	155
3.1. Control del crecimiento de hongos sobre soportes de cultivo	155
3.2. Espectroscopía Raman	155
RESULTADOS	157
1. CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LOS MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS	159
1.1. Obra Virgen de Guadalupe	159
1.2. Obra Cristo de la Paciencia	162
2. ESTRATIFICACIÓN DEL LIENZO VIRGEN DE GUADALUPE	165
3. SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS	169
4. CONTROL DEL CRECIMIENTO SOBRE LOS SOPORTES DE CULTIVO	170
4.1. Control del crecimiento de <i>Eurotium</i> sp. (VG7H5)	170
4.2. Control del crecimiento de <i>Penicillium</i> sp. (VG7H1)	170

5. ESPECTROSCOPIA RAMAN	179
5.1. Determinación de la viabilidad de los microorganismos seleccionados tras el periodo de incubación	179
5.2. Espectros Raman de referencia	181
5.2.1. Espectro Raman de referencia de la probeta tipo A	181
5.2.2. Espectro Raman de referencia de la probeta tipo B	182
5.2.3. Espectro Raman de referencia de la probeta tipo C	184
5.3. Análisis del espectro Raman de los distintos tipos de probetas inoculadas	185
5.3.1. Muestras de la probeta tipo A inoculadas con las bacterias y hongos seleccionados	186
5.3.2. Muestras de la probeta tipo B inoculadas con las distintas bacterias y hongos seleccionados	190
5.3.3. Muestras de la probeta tipo C inoculadas con las distintas bacterias y hongos seleccionados	193
DISCUSION	195
CAPITULO IV: Conclusiones	205
BIBLIOGRAFIA	213

ACRONIMOS

A: adenina.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNr: ADN ribosómico.

AP-PCR: Arbitrarily Primed PCR.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNr: ARN ribosómico.

C: citosina.

CTAB: hexadecyltrimethyl ammonium bromide.

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante).

FTIR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy; Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier

G: guanina.

IG-S: Intergenic Sequences.

ITS: Internal Transcribed Spacer (espaciador intergénico transcribible).

ENGasa: endo-N-acetil- β -glucosaminidasa.

PBMA: poli(n-butyl metacrilato).

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PDA: agar de patata dextrosada.

PDB: caldo de patata dextrosado.

RAPD: Randomly amplified polymorphic DNA.

SSCP: polimorfismo de conformación de cadena sencilla de ADN; single strand conformational polymorphisms.

SSU ARNr: ARN ribosómicos de la subunidad pequeña.

T: timina.

t-RFLP: polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción; terminal-restriction fragment length polymorphisms.

TSA :

TSB : caldo de tripticaseína soja.

U.A.: unidades arbitrarias.

UATR : Universal Attenuated Total Reflectance.

VBNC: viable but noncultivable (viable pero no cultivable).

RESUMEN

Se ha demostrado que los microorganismos pueden ser responsables del deterioro experimentado por distintos objetos del patrimonio cultural. Existen gran cantidad de artículos que tratan de determinar el papel que los microorganismos juegan en el biodeterioro de obras de arte tales como pinturas, piedra, materiales de construcción, madera, papel, mampostería, pergamino, vidrio y metal (Bock and Sand, 1993; Cifferi, 1999; Griffin et al., 1991; Piñar and Sterflinger, 2009).

Los principales factores responsables del crecimiento de microorganismos sobre obras pictóricas son la naturaleza química del soporte y las condiciones ambientales, tales como la disponibilidad de nutrientes y, fundamentalmente, la humedad respectivamente (Saiz-Jimenez, 1993). Los efectos del biodeterioro sobre las obras pictóricas pueden observarse tanto en el anverso como en el reverso de los mismos. Estos signos dependerán del soporte elegido (lienzo o tabla), en el caso del reverso, y de la técnica empleada (pintura al óleo, témpera o acuarela), en el caso de la superficie pictórica (Strzelczyk, 1981). Normalmente, el deterioro de los óleos sobre lienzo, objeto de nuestro estudio, comienza en el reverso, consecuencia de la mayor biodegradabilidad del lienzo de naturaleza celulósica y la presencia de otros componentes que pueden ser empleados por los microorganismos como fuentes de carbono, sobre todo por los hongos. Su crecimiento micelial puede provocar el desprendimiento de la capa pictórica a medida que las hifas van penetrando a través de las capas del lienzo (Cifferi, 1999; Schabereiter-Gurtner et al., 2001). Esto, unido a la excreción de productos generados en el metabolismo microbiano, como ácidos orgánicos e inorgánicos, y a la producción de enzimas extracelulares, puede incrementar la pérdida de material. Otros signos de biodeterioro son las decoloraciones y la aparición de manchas. Sólo en condiciones de elevada humedad, el biodeterioro suele comenzar por la superficie pictórica.

Para la correcta conservación y restauración de las obras pictóricas, el conocimiento de la microbiota presente en el lienzo es un requisito a la hora de elegir los métodos de restauración más adecuados (Schabereiter-Gurtner et al., 2001; Capodicasa et al., 2010; Alakomi et al., 2006; Young et al., 2006; Suihko et al., 2007).

Cuando se trata de determinar las poblaciones microbianas capaces de colonizar los óleos, encontramos dos estrategias fundamentales: técnicas dependientes o independientes de cultivo. Las técnicas dependientes resultan útiles cuando se quiere estudiar el posible potencial degradador de

los microorganismos aislados; sin embargo, sólo permiten detectar aquellos microorganismos que pueden ser cultivados bajo condiciones de laboratorio (Suihko et al., 2007; Laiz et al., 2003; Piñar and Lubitz, 2004). Por otro lado, las independientes, proporcionan una información más general de las comunidades microbianas presentes en la obra pero incluyen microorganismos en estado viable pero no cultivable (VBNC) y otros muertos (Giovannoni et al., 1990; Ward et al., 1990; Muyzer et al., 1993; Ludwig and Schleifer, 1994; Amann et al., 1995; Head et al., 1998; Schabereiter-Gurtner et al., 2001).

Existen gran cantidad de estudios que tratan de determinar la diversidad asociada a pinturas murales y frescos (Ciferri, 1999; Gorbushina et al., 2004; González and Saiz-Jiménez, 2005; Urzì et al., 2008; Scheerer et al., 2009). Sin embargo, son muy pocos los que se centran en pinturas sobre lienzo o sobre tabla, como los de Capodicasa et al. (2010) y Jelena Vukojević y Milica Ljaljević Grbić (2010).

Como consecuencia, nuestro primer objetivo consistió en estudiar las comunidades microbianas (tanto bacterias como hongos) presentes en dos óleos sobre lienzo, Virgen de Guadalupe y Cristo de la Paciencia, ubicados en el Convento de San Antón, Granada (España), empleando métodos dependientes e independientes de cultivo. Las bacterias detectadas en mayor porcentaje a partir de ambos óleos pertenecen al género *Bacillus*, mientras que los hongos más frecuentes pertenecen al género *Penicillium*. Al comparar los resultados obtenidos mediante ambos tipos de técnicas, se advierte que las dependientes detectan microorganismos pertenecientes a los filos Firmicutes, Actinobacteria, Ascomycota (orden Eurotiales y Pleosporales) y Zygomycota, pero no proteobacterias ni ascomicetos del orden Saccharomycetales. Por el contrario, empleando técnicas independientes, la mayoría de microorganismos detectados pertenecen a los filos Proteobacteria, Actinobacteria y Ascomycota (orden Saccharomycetales o Pleosporales) pero no detectan ascomicetos del orden Eurotiales; los miembros del filo Firmicutes son detectados en una proporción mucho menor que mediante las técnicas dependientes.

Tras este estudio, llevamos a cabo la caracterización enzimática de bacterias y hongos aislados de ambos lienzos con objeto de comprobar su potencial como agentes de biodeterioro. Entre las actividades enzimáticas detectadas encontramos la actividad esterasa, esterasa lipasa, N-acetil- β -glucosaminidasa y β -glucosidasa, todas ellas, relacionadas en mayor o menor medida con el biodeterioro.

Finalmente, se trataron de reproducir las distintas capas de un óleo sobre lienzo para comprobar si los microorganismos aislados eran capaces de degradar sus materiales constitutivos empleando espectroscopía Raman. Los resultados de la misma ponen de manifiesto que, ni las bacterias (*Arthrobacter* sp. y *Paucislibacillus globulus*), ni los hongos (*Eurotium* sp. y *Penicillium* sp.) por separado, ni tampoco mezclas de ambos, producen cambios químicos sobre las resinas Plexisol y dammar cuando se inoculan en las probetas correspondientes. Tampoco los producen en el resto de materiales empleados en la preparación de las mismas.

ABSTRACT

Microorganisms are responsible for the degradation of cultural heritage. There are several reviews highlighting the role of microorganisms in the biodeterioration of different objects of art, such as paintings, stone, building materials, wood, paper, masonry, leather, parchment, glass and metal (Bock and Sand, 1993; Cifferi, 1999; Griffin et al., 1991; Piñar and Sterflinger, 2009).

Two main factors are responsible for the growth of microorganisms on paintings, the chemical nature of the substratum and the environmental conditions, as the availability of nutrients and suitable humidity (Saiz-Jimenez, 1993). Microbial-induced deterioration effects on canvas paintings occur both on the obverse and on the reverse side of the paintings. The observed signs of deterioration depend on the mode of painting and the kind of paints (oil paints, distemper or watercolours) in the case of the face whereas in the case of the reverse side, they depend on the nature of the support such as canvas or wood (Strzelczyk, 1981). Usually, the biodeterioration process starts on the reverse side of the painting due to the presence of support polymers and the glue sizing in the canvas. These material components can be used as substrates for microbial metabolism, particularly for fungi which use them as a carbon source. Their growth and production of mycelia result in detachment of the paint layer from the support (Cifferi, 1999; Schabereiter-Gurtner et al., 2001). The successive colonization of the paintings, the excretion of aggressive metabolic products (organic or inorganic acids) and the production of extracellular enzymes increase the loss of material. Other signs of biodeterioration, are changes in the colours of paints, appearance of stains or variations in the structure of the painted layer. However, in paintings kept under conditions of high humidity the microbial attack may begin on the painted surface.

For the correct conservation and restoration of art works, the detailed knowledge of the micro-biota inhabiting those substrates is a requisite to facilitate and conceive the most suitable restorative and preserving strategies (Schabereiter-Gurtner et al., 2001; Capodicasa et al., 2010; Alakomi et al., 2006; Young et al., 2006; Suihko et al., 2007).

There are two strategies to study the micro-biota colonising paintings: culture-dependent and -independent techniques. Culture-based approaches, while useful for the characterization of the deteriorative potential of the microorganisms isolated, cover only those microorganisms able to grow in the selective media used (Suihko et al., 2007; Laiz et al., 2003; Piñar and Lubitz, 2004). On the other hand, culture-independent approaches provide a

more complete view of the present microbial community than culture-based methods, including uncultured, viable but non-cultivable (VBNC) and dead microorganisms (Giovannoni et al., 1990; Ward et al., 1990; Muyzer et al., 1993; Ludwig and Schleifer, 1994; Amann et al., 1995; Head et al., 1998; Schabereiter-Gurtner et al., 2001).

There are many studies reporting on microbial diversity associated with biodeterioration of mural paintings and frescoes (Ciferri, 1999; Gorbushina et al., 2004; González and Saiz-Jiménez, 2005; Urzì et al., 2008; Scheerer et al., 2009). However, only few studies have been carried out describing microbial communities responsible for the biodeterioration of paintings on canvas or wood-panels. Examples of such studies include those by Capodicasa et al. (2010) and Jelena Vukojević and Milica Ljaljević Grbić (2010).

As a consequence, the first objective of this study was to investigate the microbial community (bacteria and fungi) inhabiting the oil on canvas paintings Virgen de Guadalupe and Cristo de la Paciencia, both located at the San Antón's convent, Granada (Spain), by culture-dependent and -independent techniques. Both methods revealed that the most common bacterial strains found on these paintings belongs to the genera *Bacillus*, while the most common fungal strains found belongs to the genera *Penicillium*. Comparing the microbial community revealed by culture-dependent and -independent techniques, it turns out that, using culture-dependent methods it was possible to detect microbial strains belonged to the phyla Firmicutes, Actinobacteria, Ascomycota (order Eurotiales and Pleosporales) and Zygomycota; however, we could not detect members of the phylum Proteobacteria or members of the phylum Ascomycota (order Saccharomycetales). On the contrary, using culture-independent techniques the identified sequenced clones affiliated with members of the phyla Actinobacteria, Proteobacteria and Ascomycota (order Saccharomycetales or Pleosporales).

After that, we tried to perform a phenotypic characterization on the bacterial and fungal isolates to elucidate their real potential as biodeterioration agents. This characterization demonstrated that fungal and bacterial isolates found on both paintings display the metabolic potential for being responsible of biological degradation of paintings. The most important enzymatic activities related with deterioration processes present in the microbial community were esterase, esterase lipase, N-acetyl- β -glucosaminidase and β -glucosidase.

Finally, mock paintings reproducing real layers of an oil on canvas painting, were examined for potential susceptibility to microbial degradation using Raman spectroscopy. Raman spectra revealed that, neither bacteria (*Arthrobacter* sp. and *Paucisalibacillus globulus*) nor fungi (*Eurotium* sp. and *Penicillium* sp.) separately, were able to cause chemical changes on resins (Plexisol and dammar) or others materials from the painting. When we used together one bacteria and one fungi, were not able to cause these changes either.

CAPITULO I

Introducción y objetivos.

INTRODUCCION

1. CONCEPTO Y MECANISMOS DE BIODETERIORO.

El término biodeterioro puede definirse como cualquier alteración irreversible llevada a cabo por microorganismos u otro grupo de seres vivos, que conlleva cambios en las propiedades de un material (Hueck, 1965; 1968; Giacobini et al., 1987). Por material biodegradable se entiende aquellos materiales cuya estructura química los hace susceptibles de ser degradados y asimilados por microorganismos tales como hongos y bacterias. Estos materiales biodegradables pueden ser orgánicos, tanto naturales como sintéticos, o inorgánicos. Por su parte, los polímeros naturales son más susceptibles al biodeterioro (Cappitelli et al., 2004). En el caso que nos ocupa, por materiales entenderíamos obras de arte, centrándonos en los óleos sobre lienzo.

Una definición más actual de biodeterioro lo considera como el resultado de la actividad de microorganismos capaces de crecer en la superficie o en el interior de un material (Hueck, 2001; Walsh, 2001).

Desde una perspectiva general, el biodeterioro de los materiales que forman parte de una obra de arte se produce a través de mecanismos de distinto tipo: procesos físicos o mecánicos y procesos químicos. Suelen producirse de forma simultánea aunque el predominio de uno u otro dependerá del agente de biodeterioro implicado, el tipo de sustrato o las condiciones ambientales. Además, el desarrollo inicial de microorganismos permite un cambio en las condiciones que puede resultar favorable para el desarrollo de otras especies, dando así lugar a una sucesión ecológica.

Los **procesos físicos** incluyen aquellos mecanismos que originan la pérdida de cohesión del sustrato como consecuencia de la acción mecánica llevada a cabo por los microorganismos, como pueden ser el movimiento o crecimiento de los mismos. No se produce cambio alguno en la composición química de los fragmentos generados y se desprenden de forma fácil del sustrato como consecuencia de la presión ejercida. Al ser reducidos a fragmentos más pequeños, los materiales ofrecen una mayor superficie con lo que aumenta la probabilidad de actuación de los factores ambientales. Un ejemplo de este tipo de mecanismos lo constituye el desprendimiento de la película pictórica del soporte debido al crecimiento de los micelios de hongos o actinobacterias.

Los **procesos químicos** incluyen todos los mecanismos que conllevan la descomposición o transformación del sustrato debido al metabolismo de los microorganismos, tanto por la asimilación de sustancias, en la que el material es utilizado como fuente de carbono o energía, como por la excreción de productos generados en el metabolismo.

Tanto las bacterias como los hongos poseen una elevada relación superficie-volumen, consecuencia de su pequeño tamaño, lo que facilita la difusión de los productos metabólicos entre la célula y el medio que la rodea.

El biodeterioro originado mediante mecanismos químicos puede producirse de diversas formas, entre las que destacan la acidificación, la alcalinización, la quelación, la producción de pigmentos o la degradación enzimática.

La acidificación, consecuencia del metabolismo, está mediada por la síntesis de ácidos orgánicos e inorgánicos. Entre los orgánicos podemos citar los ácidos oxálico, cítrico, glucónico, glioxílico, oxalacético, fumárico (Jenings and Lysek, 1996). Otros ácidos como el succínico, adípico y láctico, son liberados como consecuencia de la hidrólisis de numerosos polímeros (Göpferich, 1996; Lindström et al., 2004; Trinh Tan et al., 2008). La acidificación del medio puede dar lugar a la aparición tanto de especies halotolerantes como acidófilas.

Estos ácidos presentan diversas formas de actuación. Algunos son capaces de reaccionar con diferentes compuestos que formen parte del material, erosionando con ello su superficie (Lugauskas et al., 2003). Otros son capaces de extraer iones metálicos que formen parte de la composición del material (Ca^{2+} , Al^{3+} , Si^{4+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+}), originando complejos estables. Este proceso se conoce como quelación. Este mecanismo de quelación constituye una de las principales causas de biodeterioro (Warscheid and Braams, 2000). Los ácidos orgánicos son mejores agentes quelantes que los inorgánicos.

Parece ser que determinados microorganismos, como bacterias filamentosas u hongos, son capaces de utilizar ácidos orgánicos como fuente de carbono para aumentar la longitud de sus hifas y de esta forma, incrementar la extensión del micelio (Hakkarainen et al., 2000).

Por otra parte, como consecuencia de los procesos metabólicos pueden generarse sustancias básicas como el amoníaco, procedentes de la degradación de proteínas, capaces de reaccionar con moléculas de determinados sustratos originando la disolución de los mismos. Al aumentar el pH se favorece el desarrollo de una microflora basófila.

Siguiendo con los mecanismos químicos de biodeterioro, es necesario citar la capacidad deteriorante de los pigmentos de distinta naturaleza sintetizados por muchos microorganismos.

El color de algunos pigmentos depende en parte de la naturaleza del sustrato, la presencia de elementos traza como hierro, cinc, etc., la acidez o basicidad del medio e incluso las condiciones ambientales. Encontramos dos tipos de pigmentos:

- **Endopigmentos.** Se localizan en el interior de la célula y sólo salen al exterior tras la lisis de la misma. Un ejemplo, lo constituyen los pigmentos fotosintéticos, como la clorofila y las ficobilinas.
- **Exopigmentos.** Emitidos al exterior de la célula, como diversos pigmentos coloreados de los hongos (violeta, azul, verde, púrpura).

Otro de los mecanismos más importantes de biodeterioro químico lo constituye la degradación enzimática. Las enzimas son sustancias de naturaleza proteica con una función catalizadora específica. Pueden ser endoenzimas o enzimas intracelulares, enzimas unidas a membrana y exoenzimas o enzimas extracelulares. Las endoenzimas son producidas en el interior de las células y no se liberan al exterior de las mismas, por lo que no afectan a los materiales constitutivos de las obras de arte. Por el contrario, las exoenzimas o enzimas extracelulares, también son producidas en el interior de la célula, pero son liberadas al medio externo lo que les permite digerir los sustratos que no pueden entrar en la célula (Priest, 1977). Como consecuencia, estas enzimas son capaces de generar cambios químicos en los materiales, transformando moléculas complejas (celulosa, colágeno) en otras más simples (monosacáridos y aminoácidos respectivamente) liberando así componentes que puedan ser absorbidos por las células donde serán empleados como nutrientes para el crecimiento (Gibb and Strohl, 1987 and Oh, et al., 2000). Esta actividad secretora de enzimas puede continuar incluso si las células productoras están muertas (Lucas et al., 2008). Por último, las enzimas unidas a membrana, son sintetizadas en el interior de la célula sin llegar a separarse de ésta.

Las enzimas constitutivas son sintetizadas a lo largo de toda la vida de la célula, independientemente de que en el medio se encuentre presente un sustrato determinado. Las enzimas inducibles, a diferencia de las anteriores, sólo se sintetizan cuando la célula recibe una determinada señal molecular relacionada con la presencia de un sustrato específico en el medio; en este caso, la síntesis no es inmediata puesto que se requiere un periodo para que la maquinaria de la célula se ponga en marcha.

Las distintas enzimas se nombran y numeran (EC number) de acuerdo a una serie de normas elaboradas por la IUPAC (Enzyme Commission of the International Union of a Pure and Applied Chemistry). El primer número proporciona información acerca del tipo de reacción química que catalizan.

Así, las enzimas se pueden clasificar en seis grupos:

- a) **EC1-oxidoreductasas.** Enzimas que catalizan reacciones de oxidoreducción.
- b) **EC2-transferasas.** Catalizan la transferencia de un grupo químico entre un donante y un aceptor.
- c) **EC3-hidrolasas.** Catalizan la ruptura de enlaces químicos (reacciones hidrolíticas).
- d) **EC4-liasas.** Catalizan reacciones en las cuales se produce la adición o sustracción de grupos químicos a dobles enlaces.
- e) **EC5-isomerasas.** Catalizan cambios geométricos o estereoisométricos dentro de una molécula (interconversión de dos isómeros).
- f) **EC6-ligasas.** Catalizan la unión covalente de dos moléculas con ruptura de un enlace de pirofosfato del ATP.

Las principales enzimas microbianas relacionadas con degradación de polímeros son las lipasas, las esterases y las proteasas (Flemming, 1998;Lugauskas et al., 2003). Todas ellas pertenecen a la clase de las hidrolasas, dentro de la cual, a su vez, encontramos distintos grupos: lipasas (esterasa C4, esterasa lipasa C8, lipasa C14), proteasas (Leucina, Valina y Cistina arilamidasa, tripsina y α -quimotripsina), fosfatasas (fosfatasa alcalina y ácida, Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa) y oxidasas (α - galactosidasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, α - manosidasa, α - fucosidasa).

Las actividades desarrolladas por algunas de las enzimas más importantes implicadas en procesos de biodeterioro son las siguientes:

- **EC 3. Enzimas con actividad hidrolasa.**
 - **EC 3.1. Actuación sobre enlaces éster.**
 - **EC 3.1.1. Hidrolasas de éster carboxílico.**
 - **EC 3.1.1.3. Lipasa (triacilglicerol lipasa).**

Las lipasas (actividad lipolítica) catalizan la hidrólisis de los enlaces éster de los triglicéridos, produciendo ácidos grasos libres, monoglicéridos, diglicéridos y glicerol. De forma general, llevan a cabo la hidrólisis de ésteres de glicerol y ácidos grasos

de cadena larga ($\geq C_{10}$) (Jaeger et al., 1999). Actúan específicamente sobre ésteres insolubles en agua, en una interfase lípido-acuosa.



- **EC 3.1.1.6.** Esterasa (acetilesterasa).

Se diferencia de las lipasas en que hidrolizan ésteres de ácidos grasos de cadena corta ($< C_{10}$) y además, el sustrato debe ser soluble en agua (Schmid and Verger, 1998; Jaeger et al., 1999).

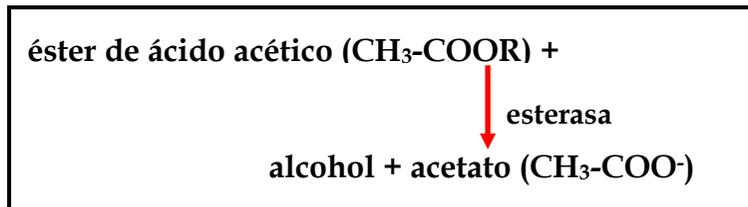


Fig. 1. Reacción catalizada por la esterasa.

- **EC 3.1.3.** Hidrolasas de monoéster fosfórico.
 - **EC 3.1.3.1.** Fosfatasa alcalina.

Las fosfatasas alcalinas son enzimas que, a pH alcalino, tienen la propiedad de catalizar la hidrólisis de fosfomonoésteres, liberando como productos de la reacción fosfato inorgánico y un alcohol, cuya naturaleza depende del sustrato utilizado como nucleótidos o proteínas.



- **EC 3.1.3.2.** Fosfatasa ácida.

Catalizan la misma reacción que las anteriores pero a pH ácido (aproximadamente 5,0) en lugar de alcalino. Podemos encontrarlas en el interior de los lisosomas.

- **EC 3.2.** Glicosilasas.
 - **EC 3.2.1.** Glicosidasas.

Las glicosidasas actúan sobre los glicósidos catalizando la liberación de azúcares de bajo peso molecular. Estos azúcares liberados por acción de las glicosidasas proporcionan una fuente inmediata de energía para los microorganismos (García-Izquierdo et al., 2003).

- EC 3.2.1.20. α -glucosidasa (maltasa).

La maltosa, sustrato de esta enzima, procede de la hidrólisis del almidón y está formada por dos unidades de D-glucosa unidas mediante un enlace $\alpha(1\rightarrow4)$. Así, la α -glucosidasa hidroliza enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$ terminales y no reductores liberando moléculas de D-glucosa al medio.

- EC 3.2.1.21. β -glucosidasa (celobiasa).

La celulosa consiste en un polímero de unidades de D-(+)-glucosa unidas entre sí mediante enlaces glucosídicos $\beta(1\rightarrow4)$. Las moléculas de celulosa se unen entre sí mediante puentes de hidrógeno de dos tipos distintos, generando así una estructura polimórfica que resulta difícil degradar (a pesar de que romper el enlace glucosídico $\beta(1\rightarrow4)$ es relativamente sencillo) puesto que las enzimas no pueden penetrar en ella.

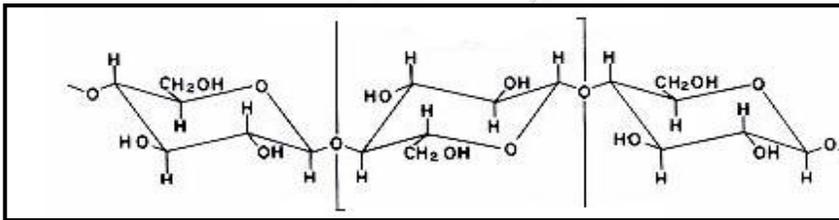


Fig.2 . Molécula de celulosa.

Como consecuencia, la hidrólisis de la celulosa se lleva a cabo en una serie de etapas en las que intervienen distintas enzimas (García-Izquierdo et al., 2003). El proceso se resume como sigue:

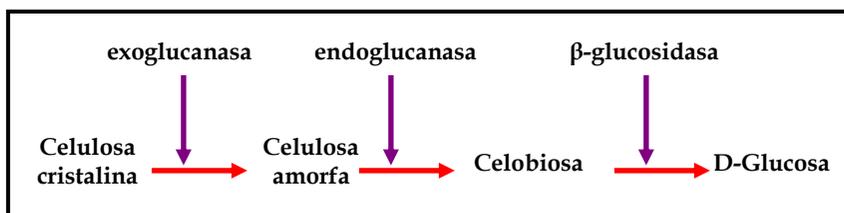


Fig. 3. Hidrólisis de la celulosa.

Así, la β -glucosidasa cataliza la ruptura del enlace glicosídico $\beta(1\rightarrow4)$ del disacárido desempeñando un papel fundamental en la hidrólisis total de la celulosa al liberar moléculas de glucosa empleadas como fuente de carbono por los microorganismos (García-Izquierdo et al., 2003).

- EC 3.2.1.22. α -galactosidasa (melibiasa).

En general, esta enzima libera residuos de α -D-galactosa terminales y no reductores presentes en α -D-galactósidos, incluyendo oligosacáridos de galactosa y galactomananos.

Más concretamente, cataliza la hidrólisis de la melibiosa que es un disacárido constituido por una unidad de D-galactosa y otra de D-glucosa unidas mediante un enlace glicosídico $\alpha(1\rightarrow6)$. La melibiosa puede encontrarse en plantas leguminosas

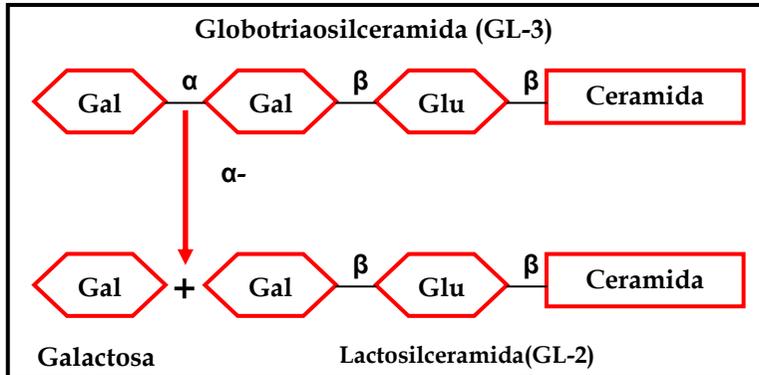


Fig. 4. Reacción catalizada por la enzima α -galactosidasa.

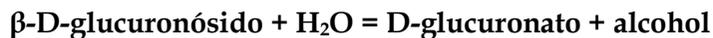
- EC 3.2.1.23. β -galactosidasa (lactasa).

Cataliza la hidrólisis de la lactosa, principal azúcar de la leche consistente en un disacárido formado por una unidad de D-galactosa y otra de D-glucosa unidas mediante un enlace β -1,4.

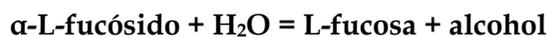
- EC 3.2.1.24. α -manosidasa.

Esta enzima lleva a cabo la hidrólisis de residuos de α -D-manosa terminales y no reductores en α -D-manósidos.

- EC 3.2.1.31. β -glucuronidasa.



- EC 3.2.1.51. α -fucosidasa.



- **EC 3.2.1.96.** N-acetil-β-glucosaminidasa.

La endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidasas (ENGasas) hidroliza los enlaces glicosídicos entre un residuo de N-acetil- β -D-glucosamina y el monosacárido adyacente dentro de una cadena oligosacáridica.

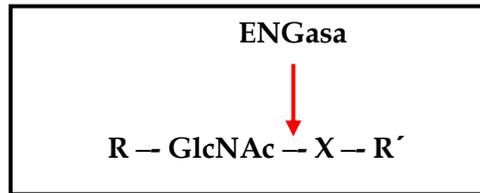


Fig. 5. Actividad enzimática desarrollada por la N-acetil-β-glucosaminidasa

Distinguimos tres tipos de N-acetil-β-glucosaminidasas (Karamanos, 1997):

- Tipo I. Actúan sobre el peptidoglicano de la pared celular bacteriana. Hidrolizan este polímero actuando sobre el enlace entre la N-acetil-D-glucosamina y el ácido N-acetilmurámico.
- Tipo II. Aquellas que actúan sobre la quitina. Se incluyen tanto las endoquitinasas, que actúan en el interior del polímero de quitina, como las exoquitinasas, que actúan liberando unidades de quitobiosa. Se han descrito algunas quitinasas con mayor o menor actividad lisozima.
- Tipo III. Aquellas que actúan sobre los N-glicanos.

- **EC 3.4.** Peptidasas: actúan sobre enlaces peptídicos.
- **EC 3.4.11.** Aminopeptidasas.

- **EC3.4.11.1.** Leucina arilamidasa (leucil aminopeptidasa).

Las arilamidases representan una subclase de aminopeptidasas capaces de hidrolizar substratos peptídicos. Permiten liberar aminoácidos N-terminales, preferentemente leucinas.

- **EC3.4.11.3.** Cistina arilamidasa(cistinil aminopeptidasa).

Libera aminoácidos N- terminales CysXaa-.

Los **daños estéticos** son alteraciones en el aspecto externo de la obra debidas al crecimiento de comunidades microbianas en las que los distintos materiales que la componen no son utilizados como fuentes de carbono o energía. La sola presencia de un microorganismo, vivo o muerto, sus excrementos o pigmentos origina el manchado de la misma.

A veces resulta difícil diferenciar los daños estéticos de los estructurales puesto que, cuando una comunidad microbiana está creciendo sobre la obra de arte, aunque los materiales de ésta no sean utilizados como fuente de carbono o energía, la liberación de productos del metabolismo puede generar degradaciones químicas en la mayoría de los casos. Entre los daños estéticos podemos citar las alteraciones cromáticas debido a la pigmentación de la estructura celular y la formación de pátinas o costras.

Un aspecto muy importante, en lo que se refiere al biodeterioro de obras de arte, lo constituye el **sustrato** del que partimos. Así, las características de los distintos materiales constitutivos de la obra van a condicionar el desarrollo de agentes de biodeterioro determinados. Esto es debido a que, mientras algunos procesos metabólicos están presentes en todos los organismos vivos, otros son exclusivos de microorganismos concretos y dependen de la posibilidad de utilizar un sustrato específico como fuente de carbono o energía. De este modo, aquellos sustratos susceptibles al biodeterioro, deben servir como fuente de carbono, energía y como factores de crecimiento para los microorganismos (Crispim and Gaylarde, 2005). Existen estudios que demuestran que los contaminantes atmosféricos también constituyen una posible fuente de nutrientes para determinados microorganismos (Zanardini et al., 2000; Nuhoglu et al., 2006).

En el deterioro de materiales orgánicos estarán implicados fundamentalmente microorganismos heterótrofos, capaces de degradar enzimáticamente estos materiales. Sin embargo los principales microorganismos implicados en la degradación de materiales inorgánicos son los microorganismos autótrofos.

- El pH del material influirá en el desarrollo de una microbiota acidófila, en caso de que el pH sea ácido, o basófila, en caso de que el pH del material sea básico.
- El contenido en agua del material es uno de los factores más importantes. Por norma general, los materiales orgánicos serán mucho más higroscópicos (propiedad de las sustancias de absorber y exhalar la humedad según el medio en que se encuentran) que los inorgánicos.
- La presencia de impurezas es otro factor condicionante. Estas impurezas normalmente proceden de las técnicas de manufactura y permiten aumentar o disminuir el rango de microorganismos capaces de intervenir en el biodeterioro del material

2. OLEOS SOBRE LIENZO.

De forma genérica podemos decir que los materiales que conforman las pinturas sobre lienzo se disponen en una serie de capas sobre un soporte, distinguiendo: capa de preparación, capas pictóricas y capa de protección. Para la correcta conservación de la obra, un requisito muy importante es la adecuada cohesión entre las diferentes capas.

MATERIALES CONSTITUTIVOS

- En este tipo de obras pictóricas, el **soporte** consiste en una tela de lino (lienzo) que se extiende y fija en un bastidor. El lino es un material de origen vegetal constituido por fibras celulósicas que se obtiene a partir del *Linum usitatissimum*, planta perteneciente a la familia de las lináceas. Su color va del blanco amarillento al marrón. Su composición química varía en función del tratamiento al que se haya sometido a la planta. Suele contener un 75-90% de celulosa, susceptible de biodeterioro, mientras que el contenido en lignina, sustancia más resistente al mismo, es bajo. Puede absorber agua hasta un 13% de su peso.
- La **capa preparatoria o imprimación**, se interpone entre la tela y la película pictórica. Se trata de un elemento de fundamental importancia para el resultado final de la obra y, por consiguiente, debe estar constituida por materiales de composición y comportamiento bien conocidos que puedan aportar la elasticidad requerida para soportar los movimientos de la tela. Entre estos materiales, suelen encontrarse las colas (generalmente animales), el yeso y el carbonato de calcio. Entre las funciones de esta capa, encontramos: facilitar una distribución uniforme del color e impedir que la capa pictórica sea absorbida por la tela.
- Las **capas pictóricas** suelen estar constituidas por pigmentos incluidos en un aglutinante filmógeno que los mantiene adheridos al soporte. Los aglutinantes actúan como vehículo para los pigmentos, por lo que su estado de fluidez debe permitir la incorporación fácil y uniforme de los distintos pigmentos. Otra propiedad de los aglutinantes debe ser su total transparencia y ausencia de color, de modo que el color sea aportado únicamente por el pigmento.

Entre los utilizados con mayor frecuencia, podemos citar los aceites secantes como el de linaza o los de naturaleza proteica como el huevo. Los pigmentos son finos granos de sustancias inertes de origen natural (animal, vegetal o mineral) o sintéticos. Existe una amplia variedad de compuestos químicos empleados como tales: óxidos, carbonatos, cromatos, sulfatos, fosfatos, silicatos de metales pesados, etc.

- **Capa de protección.** La capa pictórica necesita protección frente a los ataques provenientes de distintas fuentes como el ambiente. Para protegerla se emplean los barnices, naturales o sintéticos, los cuales deben aplicarse de modo que formen una película resistente, incolora y transparente.

BIODETERIORO DE OLEOS SOBRE LIENZO

Las obras pictóricas contienen una amplia variedad de constituyentes orgánicos e inorgánicos, muchos de los cuales son biodegradables, proporcionando diferentes nichos ecológicos a explotar por distintos tipos de microorganismos. Existe una amplia variedad de signos que pueden aparecer sobre las obras pictóricas advirtiéndonos que está teniendo lugar un proceso de biodeterioro sobre la misma. Estos signos, al igual que los microorganismos implicados en el proceso, dependerán no sólo de la naturaleza del soporte elegido (lienzo, tabla), sino también de la técnica pictórica empleada (pintura al óleo, acuarela, témpera).

Nos centraremos en analizar distintos aspectos relacionados con el biodeterioro originado por la acción de microorganismos sobre pinturas al óleo sobre lienzo, es decir, el soporte es un lienzo y la técnica pictórica escogida, la pintura al óleo. Analizaremos los sustratos, los factores ambientales relacionados con la colonización por microorganismos, los microorganismos implicados, así como los mecanismos de biodeterioro y sus consecuencias para la obra pictórica.

Como se ha comentado, el soporte empleado en estas obras es el lienzo, material de naturaleza celulósica, que puede ser degradado por los microorganismos celulolíticos, entre los que encontramos bacterias y hongos. La celulosa es un polisacárido cuya unidad constitutiva es la D-glucosa; distintas unidades de compuesto se unen mediante enlaces glucosídicos $\beta(1\rightarrow4)$ forma cadenas lineales, las cuales a su vez se enlazan en fibras paralelas llamadas microfibrillas. En la degradación de la celulosa intervienen distintas enzimas cuya acción combinada va destruyendo los enlaces presentes en la celulosa, obteniéndose como producto final moléculas de glucosa que pueden ser asimiladas por los microorganismos como fuente de carbono.

Además del soporte, las pinturas sobre lienzo contienen otras moléculas orgánicas que pueden ser utilizadas por los microorganismos para su crecimiento, entre ellas encontramos:

- Sustancias de naturaleza lipídica como el aceite de linaza.
- Sustancias de naturaleza proteica, como la cola de conejo, cuyo componente fundamental es el colágeno. Este tipo de colas pueden concentrar humedad debido a su higroscopicidad, lo que facilita un ataque biológico (Villarquide, 2005).

El variado espectro de materiales constitutivos de los óleos sobre lienzo que pueden ser usados por los microorganismos se ve incrementado debido a la presencia de aquellos que se añaden en los procesos de restauración y reentelado (Ciferri, 1999). Por otro lado, la suciedad, el polvo así como otros contaminantes atmosféricos acumulados sobre la superficie pictórica de la obra representan otra fuente de nutrientes añadida.

Incluso determinados biocidas orgánicos empleados en la formulación de algunos materiales pueden ser empleados por los microorganismos para sustentar su crecimiento sobre la obra, por lo que resulta necesario ser extremadamente cuidadoso a la hora de elegir la mejor forma de conservación para la obra (Krumbein and Gross 1992; Leznicka, 1992; Warscheid, 2000).

La superficie de los óleos sobre lienzo puede contener una rica comunidad microbiana que se deposita sobre ella procedente principalmente del aire. Se ha demostrado que la acumulación de células muertas también puede facilitar la colonización microbiana de la obra puesto que pueden servir como fuente de nutrientes a distintos microorganismos (Flemming, 1998). De ahí que la limpieza de la obra durante los procesos de restauración sea fundamental.

La diversidad y biomasa de los microorganismos capaces de desarrollarse sobre las obras pictóricas ubicadas en zonas interiores, va a estar determinada principalmente por los factores ambientales dominantes (Piñar and Sterflinger, 2009).

Los microorganismos van a ser influenciados por gran variedad de factores como: humedad ambiental, creación de microclimas que inducen la condensación de agua, fluctuaciones de temperatura, luz, concentración de oxígeno y dióxido de carbono así como la de otros contaminantes atmosféricos, pH, disponibilidad de nutrientes, naturaleza química de los componentes de la obra susceptibles de ser usados como nutrientes y por las propiedades físicas de estos materiales y su capacidad de absorber agua (Valentin, 2003).

Más allá de la composición química de los constituyentes de la obra, las condiciones ambientales permitirán el desarrollo de distintas comunidades microbianas en función de la localización del objeto artístico. Así, los microorganismos capaces de colonizar una pintura mural situada en la fachada de una iglesia, donde recibe una considerable cantidad de luz, serán distintos a los desarrollados sobre una pintura mural realizada con los mismos materiales pero localizada en el interior de la misma iglesia donde la cantidad de luz es reducida (Ciferri, 1999).

De todos estos factores que condicionan la presencia de los microorganismos en la obra, el más importante sin duda es la disponibilidad de agua (Strzelczyk, 1981; Piñar and Sterflinger, 2009). Por esta razón, resulta fundamental controlar los niveles de humedad relativa, así como el contenido de agua de los materiales constituyentes para mantener la presencia de los microorganismos bajo mínimos.

Los materiales porosos, capaces de absorber agua y mantenerla durante largos periodos de tiempo, son atacados por los microorganismos con mayor facilidad.

La humedad capaz de afectar al desarrollo de comunidades microbianas en el lienzo, puede proceder de diferentes fuentes, algunas de las cuales pueden controlarse para prevenir los problemas de biodeterioro. Determinados defectos de construcción pueden contribuir a la aparición de problemas de humedad en los muros o paredes que favorecerán el crecimiento microbiano.

El peligro de colonización microbiana aumenta también como consecuencia de la condensación de agua, que suele ocurrir en edificios antiguos que carecen de un control de la humedad y la temperatura como consecuencia de la diferencia de temperatura entre el aire templado y los muros, más fríos (Camuffo, 1998).

A pesar del importante papel desempeñado por el agua, en presencia de elevadas concentraciones de nutrientes, los microorganismos parecen aumentar su tolerancia frente a una baja humedad (Ayerst, 1968).

Altos niveles de humedad, de temperatura y de luz, propios de climas templados, son responsables de disminuir la vida media de las obras pictóricas, al aumentar su susceptibilidad al ataque biológico así como al envejecimiento (Ciferri, 1999).

La elaboración de un único y completo esquema de los mecanismos que intervienen en el biodeterioro llevado a cabo por los microorganismos en un óleo sobre lienzo es una tarea complicada. La dificultad reside fundamentalmente en la enorme variedad de materiales que pueden emplearse en la creación de este tipo de obras de arte, siendo difícil en ocasiones averiguar todos los materiales constituyentes de la misma (Ciferri, 1999).

La formación de biofilms pigmentados, la disolución de metales por la acción de ácidos y compuestos quelantes, la degradación de aglutinantes y consolidantes y la degradación y decoloración de los pigmentos son algunos de los mecanismos de deterioro empleados por los microorganismos (Piñar and Sterflinger, 2009).

En los óleos sobre lienzo, los efectos del biodeterioro pueden observarse tanto en el anverso como en el reverso de la obra. La superficie pictórica se va a ver fuertemente influenciada por las alteraciones experimentadas por el soporte celulósico.

El ataque microbiano suele comenzar por el reverso de la obra, puesto que se trata del lugar donde la humedad es mayor como consecuencia del contacto con la pared fría, sobre todo en aquellos casos en que existan problemas de humedad en las paredes (Strzelczyk, 1981).

Partiendo del reverso del lienzo, los mecanismos por los cuales tiene lugar el deterioro de la obra transcurren en el siguiente orden:

- La cola en contacto con el lienzo absorbe agua rápidamente y se hincha, constituyendo un sustrato adecuado para el crecimiento de los microorganismos, hongos principalmente.
- A continuación, los microorganismos alcanzan la capa de preparación del lienzo originando la pérdida de cohesión de la misma. Como consecuencia del daño ocasionado en el lienzo, se puede producir una pérdida de adhesión de la capa pictórica con respecto al soporte.
- Más adelante, la producción de enzimas extracelulares origina un incremento en la desintegración de las distintas capas de la obra.
- Esto facilita la penetración de las hifas de los hongos, a medida que van creciendo, a través de las capas pictóricas, llegando a atacar incluso la capa de barniz.

En obras mantenidas durante cierto tiempo bajo condiciones de humedad extrema, la colonización microbiana puede comenzar por la superficie pictórica e ir penetrando hacia el soporte a medida que la comunidad microbiana se va estabilizando y creciendo. El desarrollo de los microorganismos sobre la superficie pintada, origina daños que estropean tanto su diseño como su color, hasta producir el deterioro completo de la misma. Los principales microorganismos implicados suelen ser hongos de diferentes géneros. La secuencia de acontecimientos se resume a continuación:

- En primer lugar, el desarrollo de los microorganismos sobre la superficie pictórica da lugar a que las hifas de los hongos se vayan extendiendo lo que acaba enmascarando el dibujo y los colores, sobre todo en el caso de micelios pigmentados.
- A medida que las hifas van penetrando hacia el interior, se genera un desplazamiento en las capas pictóricas.
- La producción de enzimas extracelulares permite a las hifas continuar su penetración en el lienzo. Como consecuencia, las capas pictóricas comienzan a disgregarse y romperse. Finalmente pueden desprenderse fragmentos de la obra lo que da lugar a una pérdida de peso.
- Una vez que el micelio alcanza cierto nivel de desarrollo, comienza a excretar al medio distintos productos resultado de su actividad metabólica, entre los que encontramos diversos ácidos capaces de comenzar la degradación de la imprimación del lienzo. Esto no hace más que acelerar el proceso de exfoliación (Ross et al., 1968).
- Como resultado del metabolismo fúngico, pueden producirse compuestos pigmentados que dan lugar a la aparición de manchas sobre la superficie pictórica, muchas de las cuales resultan imposibles de eliminar.

Determinados pigmentos como la siena natural, favorecen el ataque de los microorganismos al ser muy higroscópicos y ricos en microelementos. Por el contrario, otros pigmentos son capaces de inhibir el crecimiento microbiano; se trata de aquellos que contienen metales pesados como el blanco de plomo o albayalde, cuyos iones de plomo tienen efecto fungicida además de ser resistente a la absorción de agua; en la actualidad está prohibido por su toxicidad.

Entre los microorganismos que normalmente están implicados en el biodeterioro de óleos sobre lienzo se incluyen en primer lugar los hongos, puesto que la humedad asociada a los materiales constitutivos de la obra así como la humedad relativa, habitual en ambientes de interior, no suele favorecer el desarrollo de bacterias. A esto, hay que sumarle el hecho de que las esporas de muchas especies de hongos son capaces de germinar empleando el agua de condensación que puede formarse sobre superficies frías al entrar en contacto con aire caliente. Por ello, los hongos pueden suponer un problema derivado de la condensación de agua en aquellos lugares que carecen de aislamiento térmico así como de sistemas de control de la humedad (Flannigan et al. 2002). Otras características que llevan a los hongos a desempeñar un importante papel en procesos de deterioro son su capacidad para producir gran variedad de enzimas y sus bajos requerimientos nutricionales.

Los hongos son capaces de germinar y crecer a valores de actividad de agua cercanos a 0,65 ($a_w > 0.65$), mientras que las bacterias requieren valores mayores ($a_w > 0.98$).

Entre los hongos que con más frecuencia se relacionan con el deterioro, encontramos:

- *Penicillium* sp. Muchas especies de este hongo poseen la capacidad de desarrollarse tanto sobre el anverso como sobre el reverso de la obra. Se trata de hongos oligotrofos y xerófilos, que poseen la habilidad de producir enormes cantidades de esporas en cortos periodos de tiempo. Pueden generar manchas superficiales.
- *Aspergillus* sp. Son capaces de cubrir la superficie pictórica con sus esporas y de degradar aglutinantes.
- *Alternaria* sp. y *Cladosporium* sp. Capaces de causar desintegración de la capa pictórica y manchas tanto en anverso como en el reverso.
- *Mucor* sp. y *Rhizopus* sp. Crecen preferentemente en el reverso de la obra, atacando las colas.
- *Chaetomium* sp. Atacan al soporte de lienzo hidrolizando la celulosa.
- *Geotrichium* sp. Aparece frecuentemente en presencia de caseína, formando micelios blancos sobre la superficie y aumentando la porosidad de los barnices.
- *Botrytis* sp. Degrada la celulosa del lienzo.
- *Trichothecium* sp. Forma depósitos rosados en anverso y reverso; también degrada la celulosa del lienzo.

Una humedad relativa en torno al 55% suele considerarse el límite para el desarrollo de los hongos, por lo que museos y salas de exposición suelen mantener niveles inferiores. La capacidad de crecer por debajo de este nivel queda restringida a los microorganismos xerófilos o xerotolerantes tales como *Eurotium* sp., *Aspergillus* sp. o *Wallemia* sp. Aún así, en los museos podemos encontrar microorganismos mesófilos puesto que las condiciones climáticas son difíciles de controlar y mantener constantes. Esto se debe a las corrientes de aire generadas al abrir y cerrar puertas, cambios de temperatura como consecuencia de la mayor exposición al sol durante el día, etc (Camuffo, 1998). De este modo, el crecimiento fúngico suele tener lugar a pesar de todas las precauciones.

Durante el proceso de deterioro, los microorganismos pueden originar daños estructurales y estéticos en los lienzos (Ciferri, 1999; Schabereiter-Gurtner et al., 2001a; Piñar and Sterflinger, 2009).

Como daños estéticos podemos considerar la decoloración de pigmentos, la aparición de manchas, de eflorescencias debidas a depósitos de yeso formando agregados, o la formación de veladuras que enmascaran la superficie pintada como consecuencia del crecimiento microbiano. Por otro lado, podemos considerar daños estructurales el agrietamiento y desintegración de la superficie pictórica, la aparición de burbujas de pintura o la degradación del soporte y de las colas presentes en el mismo que acaban con el desprendimiento de la capa pictórica. Estas alteraciones van a distorsionar la obra y lo que es peor, normalmente se trata de cambios irreversibles que continúan mientras los microorganismos (principalmente hongos) se encuentran activos (Inoue and Koyano, 1991). Ambos tipos de daños están estrechamente relacionados pudiendo generarse uno a partir del otro.

3. BIODETERIORO DE RESINAS NATURALES, SINTÉTICAS Y CEREORRESINAS.

El deterioro de las resinas origina cambios químicos en las mismas, tales como polimerizaciones (entrecruzamientos entre las cadenas de los polímeros), hidrólisis de las cadenas poliméricas, oxidación de la cadena principal o de grupos laterales provocando la hidrólisis de la molécula lo que puede generar la formación de productos oxidados. Estos cambios suelen conducir a que la resina se vuelva cada vez más insoluble, a una pérdida de su resistencia y a cambios de color, entre otras alteraciones (Doménech-Carbó, 2008).

Las **resinas naturales** son exudados producidos por diferentes plantas. Desde la antigüedad hasta hoy, han sido empleadas como capa de protección puesto que dan lugar a películas resistentes que presentan buena reversibilidad con el tiempo. Por otra parte, son susceptibles de alteración por acción de la luz.

Una de las resinas naturales más ampliamente utilizadas por su escasa tendencia al amarilleo, en comparación con los barnices de coníferas, su buena solubilidad en disolventes orgánicos comunes y sus excelentes propiedades ópticas, superiores a las de los más estables barnices sintéticos, es el dammar. Su uso como material artístico es muy amplio, al estar considerado como el mejor barniz de origen natural. Tiene una buena estabilidad a la luz y es compatible con otras resinas, ceras, aceites y pigmentos. Forma películas muy brillantes, lo que en determinadas épocas ha sido considerado un inconveniente, que puede solventarse añadiendo una pequeña cantidad de cera de abejas para aligerarlo, o bien mediante preparación en caliente, lo que produce barnices de tono mate (Mayer, 1985). El dammar es soluble en trementina, white spirit y sustancias aromáticas. Posee gran capacidad adhesiva, baja acidez y escasa sensibilidad a la humedad.

Se obtiene a partir de resinas producidas por árboles adultos de la familia de las Dipterocarpaceas (especies principales *Hopea* y *Shorea*). Las resinas que pueden encontrarse en Europa provienen de Nueva Zelanda, Filipinas y especialmente Malasia e Indonesia. La calidad del producto varía según el tamaño de los fragmentos de resina, su transparencia y contenido en impurezas (Mayer, 1985; Masschelein-Kleiner, 1992; Mills and White, 1994).

Químicamente se trata de una mezcla compleja de sustancias sintetizadas por ciertas plantas, a partir del escualeno, que presentan un esqueleto de treinta átomos de carbono, predominando básicamente los de tipo tetracíclico y pentacíclico (Fig.6) (Masschelein-Kleiner, 1992; Mills and White, 1994). A pesar de que su procedencia es muy variable, los productos comercializados como dammar presentan una composición básica común: triterpenos tetracíclicos de la serie de los dammaranos (dammaradienol, dammaradienona, ácido dammarenólico), y una cantidad menor de triterpenos pentacíclicos derivados del oleanano (ácido leanónico) y del ursano, como el ácido ursónico y su correspondiente aldehído, el ursonaldehído (Masschelein-Kleiner 1992, Mills and White, 1994).

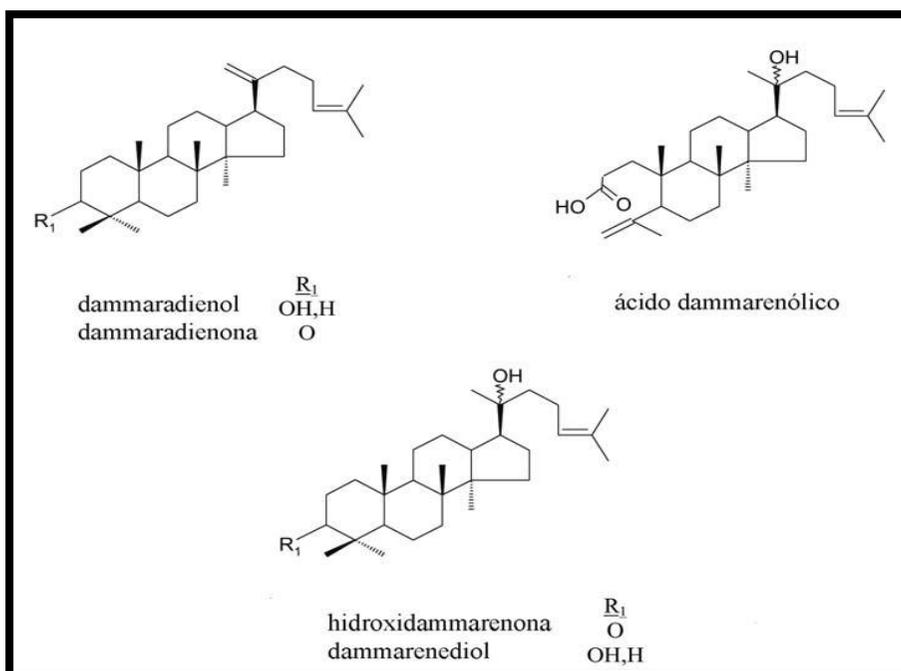


Fig. 6. Principales triterpenos presentes en la resina de dammar.

Presenta también una pequeña cantidad de sesquiterpenos y una fracción apolar, no soluble en alcohol, constituida por un polímero hidrocarbonado denominado β -resene (Mills and White, 1994). Su estructura química ha sido identificada como policadieno (Van Aarsen et al., 1990).

En cuanto a los posibles procesos de deterioro que pueden experimentar las resinas triterpénicas, se pueden citar el envejecimiento, que ocurre desde fuera hacia dentro de la capa de barniz, pudiendo originar cambios sustanciales tanto en su composición como en sus propiedades. Las principales alteraciones físicas afectan al color (amarilleo) y originan un incremento en la fragilidad y opacidad (“pasmados” del barniz).

La composición hidrocarbonada y la presencia de dobles enlaces hacen a estas sustancias susceptibles de sufrir procesos de oxidación, iniciados generalmente con la absorción de luz ultravioleta o energía térmica, o por la presencia de oxidantes ambientales (ozono). Como consecuencia, forman dos tipos de productos: terpenos oxidados y compuestos Polimerizados (De la Rie 1998; Van der Doelen 1998a, 1998b; Van der Doelen and Boon, 2000). La formación de sustancias oxidadas incrementa la polaridad de los barnices requiriendo el empleo de disolventes cada vez más polares para su eliminación, que pueden afectar a la capa pictórica. También tiene efectos sobre el comportamiento mecánico del barniz, puesto que la interacción entre moléculas polares es mayor por formación de puentes de hidrógeno, fenómeno que puede verse interrumpido en presencia de humedad y producir cambios físicos como craquelados o pasmados (Van der Doelen, 1998a).

Con el paso del tiempo, la cantidad total de triterpenos disminuye, mientras que aumenta el contenido en productos de alto peso molecular (De la Rie, 1998; Van der Doelen, 1999; Van der Doelen and Boon, 2000) originados mediante procesos oxidativos sobre los dobles enlaces que llevan a la formación de radicales peróxido muy inestables, los cuales evolucionan a radicales alquílicos altamente reactivos capaces de interaccionar entre sí a través de enlaces cruzados de carácter covalente con la consiguiente polimerización y generación de productos de alto peso molecular. El amarilleo del dammar prodría deberse a este proceso de polimerización (Van der Doelen, 1998a).

Finalmente, comentar que esta resina parece ser bastante susceptible al biodeterioro (Koestler and Santoro, 1988).

La goma laca, también conocida como shellac es una **cereoresina** procede de India e Indonesia, la cual se obtiene a partir de la secreción de un insecto de la familia de las cochinillas (*Coccus laca*) cuya hembra la segrega durante el periodo de gestación sobre una planta llamada *Butea frondosa*. Se trata, por tanto, de una resina de origen animal.

Actualmente se utiliza en restauración para recubrir estucados de yeso y cola antes de realizar un retoque con acuarela o temple, como barniz final para muebles y objetos de madera y como protector para el oro en hojas. La goma laca es de color naranja, de modo que al aplicarla sobre una superficie, puede modificar el color original de la misma.

Esta resina es soluble en alcohol, álcalis, ácidos y parcialmente soluble en acetona, mientras que es insoluble en agua. El empleo de la goma laca origina películas duras, elásticas y brillantes que tienden a oscurecerse con el envejecimiento y a volverse insoluble. La goma laca es un polímero natural pero químicamente similar a los polímeros sintéticos, por lo que podría considerarse como un plástico natural. Contiene cera en una cantidad aproximada del 5%. Está constituida por una mezcla de hidroxiácidos alifáticos y alicíclicos y sus polímeros, los cuales varían en composición dependiendo del origen y de la estación de recogida de la goma laca. El principal compuesto alifático es el ácido aleurítico (ácido 9RS, 10SR -9, 10, 16- trihidroxi hexadecanoico), llegando a representar el 35% del peso de la resina, mientras que el principal componente alicíclico es el ácido shellólico.

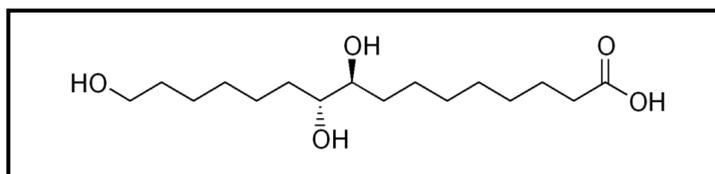


Fig. 7. Acido aleurítico. Fórmula molecular: $C_{16}H_{32}O_5$.

Esta resina parece ser relativamente resistente biodeterioro (Koestler and Santoro, 1988).

Las **resinas sintéticas** han sido empleadas en obras de arte como barnices y aglutinantes para pigmentos. También en tratamientos de conservación como consolidantes y protectores (Cappitelli et al., 2004). Aunque los polímeros que se emplean normalmente como barnices pertenecen a otros grupos químicos, comparten ciertas características. Se trata de polímeros lineales, de cadena larga, formados por unidades repetidas conocidas como monómeros, que se unen mediante diversos tipos de enlaces químicos para formar cadenas.

En general, tiende a pensarse que las resinas sintéticas son menos susceptibles de sufrir deterioro químico, físico o biológico que los productos naturales; sin embargo, puesto que sus enlaces químicos son los mismos, no resulta descabellado considerar que puedan ser hidrolizados y asimilados por los microorganismos (Capitelli et al., 2005). De hecho, podemos encontrar numerosas referencias bibliográficas que lo constatan (Seal, 1998; Sorlini, 1988; Albertsson and Karlsson, 1993; Kay et al., 1993; Nakajima-Kambe et al., 1999). Así, la degradación de los polímeros sintéticos puede deberse a factores químicos, físicos o biológicos. Los efectos que la degradación origina en estos polímeros incluyen cambios en su estructura química, reducción de su peso molecular consecuencia de la hidrólisis de cadenas o incremento del mismo debido a fenómenos de polimerización, y cambios en sus propiedades tanto físicas y químicas como ópticas (Capitelli et al., 2005).

Un factor importante a tener en cuenta cuando se evalúa la biodegradabilidad de estas resinas es el estado físico en el que se encuentran, en solución o estado sólido (Cappitelli et al., 2006), siendo menos susceptibles al ataque por microorganismos en ésta última forma. Existe un mayor interés en conocer la susceptibilidad al biodeterioro cuando se encuentran en estado sólido, pues es así como permanecerá la resina sobre el lienzo tras el tratamiento de restauración, una vez que se evapore el disolvente empleado (Cappitelli et al., 2004). Esto hace que la colonización microbiana sea más fácil durante el proceso de elaboración de las mismas, periodo en el que se encuentran en forma de emulsión (Gillat, 1990).

Microorganismos de distintos grupos pueden estar implicados en el deterioro de las resinas sintéticas. Sin embargo, los hongos son el grupo que desempeña el papel más importante gracias a su adaptabilidad a distintas condiciones ambientales como pueden ser baja humedad relativa, cambios bruscos de temperatura o escasa disponibilidad de nutrientes (Cappitelli et al., 2004).

Existen distintos tipos de resinas sintéticas, entre las que se encuentran las **acrílicas**. Han sido empleadas como barnices para obras pictóricas o en tratamientos de conservación, como consolidantes. La nitidez que poseen, sus buenas propiedades adhesivas, su reversibilidad y su excelente modo de envejecimiento han conseguido que ganen popularidad, empleándose en los actuales tratamientos de conservación.

Los monómeros de las resinas acrílicas se generan mediante esterificación de un ácido acrílico con varios alcoholes. Su fórmula general es: $\text{CH}_2\text{CR}_1\text{COOR}_2$.

Son resistentes a los ácidos y relativamente susceptibles a los álcalis. También son susceptibles de disolverse en muchos disolventes orgánicos. Muchas resinas de este tipo son bastante resistentes al ataque microbiano, posiblemente debido a sus características hidrófobas que reducen la actividad enzimática. Parece ser que los copolímeros son, generalmente, más resistentes al ataque microbiológico y no van a ser empleados como fuente de nutrientes por los mismos (Pankhurst et al., 1972; Nugari and Priori, 1985).

El deterioro biológico se relaciona en gran medida con el químico. Distintos microorganismos son capaces de producir una gran variedad de ácidos y enzimas que pueden alterar la estructura química de estos polímeros. Muchos de ellos son productos de su metabolismo mientras que otros se originan de forma específica frente a un determinado polímero. En cualquier caso, se han encontrado bacteria y hongos capaces de degradar algunos de estos polímeros. Como consecuencia de este deterioro, pueden generarse manchas sobre el polímero, pérdida de opacidad, cambios en su peso y flexibilidad, así como otros cambios que pueden afectar en mayor o menor medida a los usos o aplicaciones del polímero (Klausmeier and Andrews, 1981).

El crecimiento microbiano sobre este tipo de resinas es debido, en ocasiones, a la presencia en la formulación de las mismas, de aditivos tales como plastificantes, lubricantes o estabilizantes, que serán los que realmente sirvan de nutrientes a los microorganismos (Pankhurst et al., 1972; Strzelczyk, 1981). Entre los distintos tipos de aditivos los más susceptibles son los plastificantes; se trata de materiales que se añaden para aumentar la flexibilidad o extensibilidad de la resina. Entre los principales materiales que se emplean como plastificantes encontramos ácidos grasos o aceites que contienen ácidos grasos como el aceite de linaza. La mayoría son ésteres y, por tanto, susceptibles de ser hidrolizados por esterasas extracelulares producidas por gran cantidad de microorganismos, permitiéndoles así emplear la parte correspondiente al ácido del compuesto. Normalmente, las esterasas son específicas de un determinado sustrato, por lo que el hecho de que un microorganismo sea capaz de producir un tipo de esterasa, no implica que sea capaz de degradar el plastificante.

Una resina acrílica que suele emplearse como barniz, consolidante de la película pictórica y para la forración de pinturas sobre lienzo es el Plexisol P550. Se trata de una resina acrílica a base de butil-metacrilato (metacrilato de butilo) en solución al 40% en bencina. Plexisol P550 es soluble en ésteres, cetonas, hidrocarburos aromáticos, alifáticos y clorurados; se puede diluir limitadamente con alcohol. Permite crear una película transparente de dureza media, insoluble en agua y resistente a muchos ácidos, al envejecimiento y a la intemperie.

Las resinas basadas en el metacrilato, son polímeros de adición formados a partir del ácido metacrílico y sus ésteres (Mills and White 1987). Esta resina es un poli(n-butil metacrilato) (PBMA), cuya fórmula molecular es $C_8H_{14}O_2$.

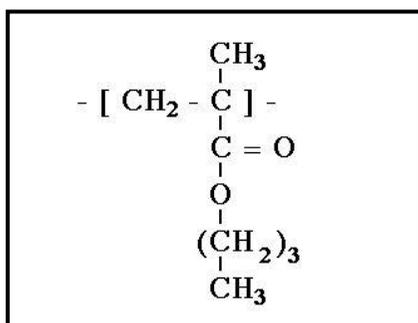


Fig. 8. Fórmula del butil matacrilato.

Como se ha comentado, la resina Plexisol P550 puede utilizarse como barniz (Lascaux Restauro, 1989) aunque es susceptible de sufrir procesos de polimerización que aceleran el envejecimiento de la capa protectora. Durante el envejecimiento también pueden tener lugar oxidaciones e hidrólisis de la cadena que suelen ocurrir en la parte superior de la capa, por lo que tiene poco efecto en su solubilidad (Lomax and Fisher, 1990). A pesar de ello, los procesos de polimerización pueden continuar hasta que se vuelve completamente insoluble (Carlyle and Bourdeau, 1994).

4. METODOS PARA LA DETECCION Y ANALISIS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS PRESENTES EN OBRAS DE ARTE.

A la hora de estudiar las comunidades microbianas presentes en una obra de arte, resulta imprescindible manejar el objeto con mucho cuidado, tratando de evitar que se produzca cualquier alteración en el mismo. Por ello, uno de los primeros problemas con los que nos encontramos cuando se pretenden estudiar los microorganismos implicados en su biodeterioro es la elección del método de muestreo. Es necesario que el procedimiento de toma de muestras se diseñe de forma específica, adecuándose a las características del objeto estudiado, así como a las condiciones o situaciones que rodean al mismo con el fin, no sólo de evitar que el objeto pueda sufrir cualquier tipo de daño sino, además, con la intención de conseguir la mayor cantidad de muestra posible (Michaelsen et al., 2009).

El uso de técnicas microbiológicas convencionales, basadas en el cultivo previo de los microorganismos, combinado con métodos moleculares independientes de cultivo, debería convertirse en la estrategia de elección a la hora de estudiar la diversidad microbiana implicada en el deterioro de obras de arte (Laiz et al., 2003b; Palla et al., 2003; Piñar and Lubitz, 2004; Michaelsen et al., 2009).

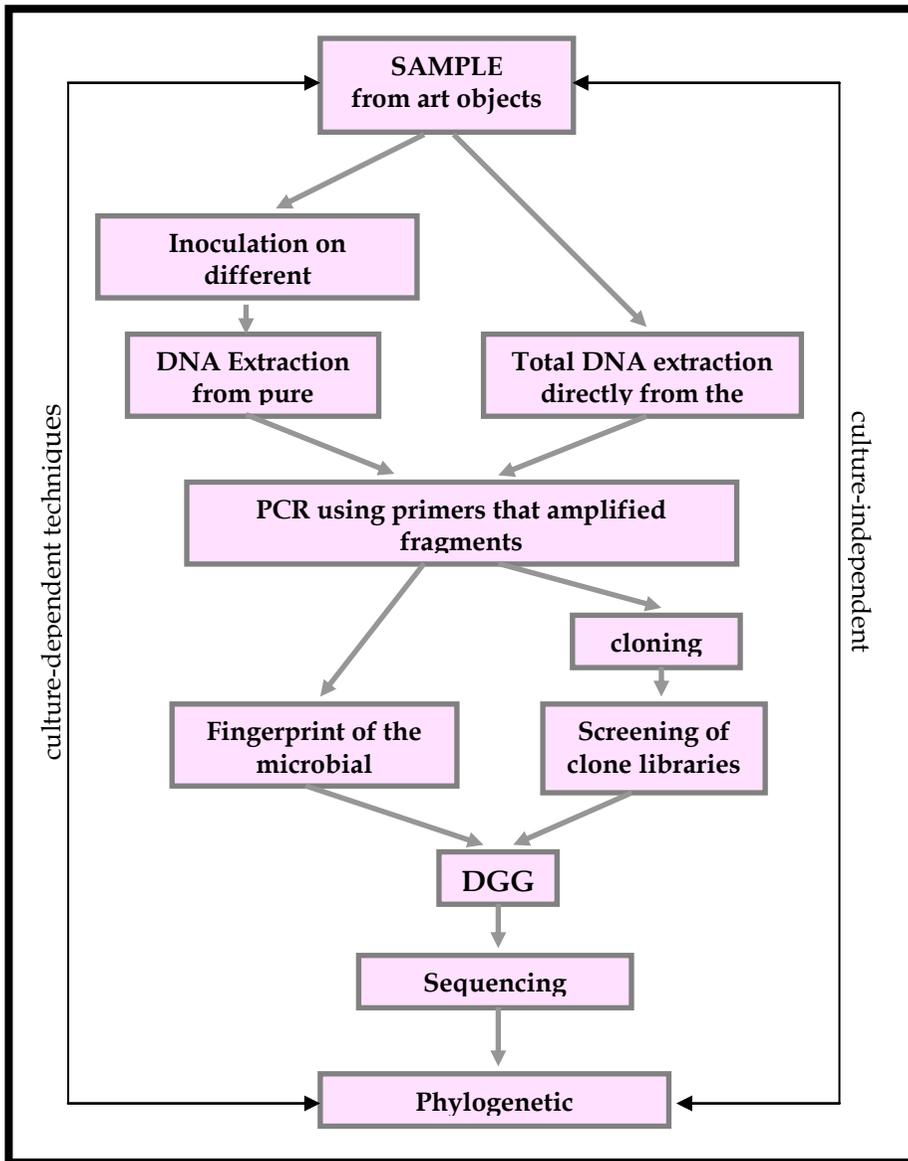


Fig. 9. Diagrama que recoge las etapas del estudio de comunidades microbianas mediante la combinación de técnicas dependientes e independientes de cultivo.

4.1. Técnicas dependientes de cultivo.

La mayoría de los estudios realizados en el pasado con el objeto de determinar las poblaciones microbianas relacionadas con el deterioro de diversos objetos del patrimonio cultural, se han basado en métodos dependientes del cultivo previo de los microorganismos presentes en la obra.

El desarrollo de la biología molecular ha permitido sustituir o completar las técnicas de microbiología clásica, que incluyen el aislamiento de microorganismos en medios de cultivo y su identificación mediante pruebas bioquímicas, por otras más rápidas basadas en el estudio del ADN en lugar de hacerlo en los caracteres fenotípicos determinados por los genes. Entre estas técnicas moleculares se encuentra la amplificación al azar de fragmentos de ADN Polimórfico (RAPD-Randomly Amplified Polymorphic DNA), que proporciona información sobre las relaciones filogenéticas de los distintos miembros de la comunidad microbiana, y la amplificación y posterior secuenciación de regiones conservadas del ADN, tales como el ADNr 16S ('the rRNA approach'; Olsen et al., 1986; Amann et al., 1995) en el caso de bacterias o las ITS de hongos, que permitirán la identificación de los integrantes de la comunidad.

Una de las ventajas del RAPD es que no requiere conocimiento previo de la secuencia de del ADN a amplificar y, por tanto, tampoco es necesario un amplio conocimiento de la bioquímica y biología molecular de las especies objeto de estudio. En la reacción de amplificación, suele emplearse un cebador, normalmente de secuencia arbitraria y longitud corta, que hibrida en loci repartidos aleatoriamente por todo el genoma, así como condiciones de amplificación poco restrictivas (baja temperatura de anillamiento) (Williams et al., 1990). Los productos obtenidos se separan mediante electroforesis en gel de agarosa, originando de esta forma un patrón de bandas característico de cada individuo/cepa. El fundamento de esta técnica, puede resumirse de la siguiente forma: a una temperatura suficientemente baja, es de esperar que el cebador se una a distintas regiones del ADN en ambas hebras, aunque el emparejamiento no sea perfecto. Esto permitirá la amplificación de distintos fragmentos de algunos cientos de pares de bases correspondientes a aquellas regiones del ADN situadas entre dos cebadores que anillen en hebras distintas.

Cada cebador origina un patrón de bandas distinto para la misma cepa estudiada, presentando cada uno de estos cebadores el potencial de detectar polimorfismos entre distintas cepas, por lo que con el patrón de bandas generado podemos llegar a distinguir incluso cepas dentro de una misma especie. Tanto en el número y la intensidad como en la reproducibilidad de las bandas obtenidas, intervienen numerosos parámetros, entre los que podemos citar la concentración de sales, la temperatura de anillamiento del cebador o cebadores empleados, la concentración del ADN molde, la longitud y secuencia del primer escogido.

En cuanto a la amplificación y posterior secuenciación de regiones conservadas del genoma, se emplean para la identificación de microorganismos los ARN ribosómicos de la subunidad pequeña (SSU ARNr, 16S en caso de bacterias y 18S en caso de hongos). Usando cebadores específicos, pueden amplificarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) regiones del ADNr, que posteriormente serán secuenciadas y comparadas con otras secuencias de los ADNr depositadas en bases de datos. El motivo de su uso generalizado es el siguiente: puesto que el ribosoma desempeña la misma función en todos los microorganismos siendo esencial para la supervivencia, los genes que lo codifican no pueden sufrir grandes mutaciones sino que cambian muy lentamente con el tiempo. Esto hace posible la comparación de secuencias estables entre los microorganismos aislados. Además, los SSU ARN poseen secuencias variables que permiten diferenciar microorganismos del mismo género, e incluso dentro de la misma especie (Willey et al., 2008). El uso de secuencias del ADNr 18S para la identificación de hongos no está tan extendido como el uso del ADNr 16S para la identificación de bacterias (Kowalchuk et al., 1997; Kowalchuk, 1999) a causa de la menor variabilidad en la secuencia del ADNr 18S. Por ello, la identificación de bacterias basada en comparación de secuencias del ADNr 16S aún en la actualidad continúa usándose. Por el contrario, el uso de secuencias del ADNr 18S para la identificación de hongos ha sido sustituido por el de secuencias correspondientes a las regiones espaciadoras intergénicas (ITS).

El cluster del ADN ribosómico de eucariotas consiste en una repetición en tándem de tres regiones codificantes (18S, 5,8S y 28S) y dos regiones no codificantes que actúan a modo de espaciadores (Internal Transcribed Sequences-ITS e Intergenic Sequences-IGS).

Debido al gran número de copias y puesto que estas regiones presentan una mayor tasa de evolución (tasa mutacional) que los genes ribosomales, lo que origina mayor variabilidad en las secuencias entre especies filogenéticamente cercanas, permiten una identificación más exacta a nivel de género, incluso de especie (Anderson et al., 2003; Lord et al., 2002). En este caso, las secuencias estables de los genes ribosomales serán útiles para el diseño de cebadores que permitan amplificar la secuencia de las ITS.

La primera pareja de cebadores en ganar aceptación en el trabajo relacionado con las regiones espaciadoras intergénicas del operón ribosomal de los hongos, fue la pareja ITS1/ITS4 (White et al., 1990), que permite la amplificación de las regiones de alta variabilidad ITS1 e ITS4 junto con la secuencia que codifica para la subunidad ribosómica 5,8S a la que flanquean, situada entre la secuencia codificante de la subunidad grande y de la subunidad pequeña del operón ribosomal (Lott et al., 1993).

Las técnicas dependientes de cultivo resultan de gran utilidad a la hora de evaluar el biodeterioro asociado a una obra de arte, para lo cual es indispensable la identificación y, a ser posible, la cuantificación de los microorganismos responsables del mismo. Otra ventaja consiste en que, al disponer de cultivos puros de los distintos microorganismos aislados, podemos obtener mayor información en relación a la fisiología del aislado en cuestión, mediante la realización de distintos estudios tanto fisiológicos como metabólicos.

El problema de estos métodos radica principalmente en que, en la mayoría de los casos, los microorganismos presentes en obras de arte forman parte de complejas comunidades microbianas; además, su crecimiento podría depender de la presencia en el medio de nutrientes específicos (Schabereiter-Gurtner et al., 2001). Por ello, entre los microorganismos aislados sólo vamos a encontrar aquellos que son cultivables bajo condiciones de laboratorio, aceptándose de modo general que las técnicas dependientes de cultivo tan sólo permiten recuperar aproximadamente un 1% del total de las bacterias presentes en la muestra (Ward et al., 1990; Giovannoni et al., 1990; Amann et al., 1995). Como consecuencia, no van a proporcionar información completa y fidedigna a cerca de los miembros que integran la comunidad microbiana (Schabereiter-Gurtner et al., 2001a), ni permitirán determinar la relevancia que los miembros cultivables poseen en dicha comunidad.

La mayoría de microorganismos no cultivables pueden incluirse dentro de alguno de los siguientes grupos (Piñar and Lubitz, 2004):

- a) Microorganismos simbioses obligados o parásitos que requieren para su supervivencia unas condiciones específicas que les aporta el hospedador.
- b) Microorganismos en situación de estrés o dañados, capaces de ser cultivados en laboratorio pero tan sólo bajo unas condiciones muy particulares.
- c) Microorganismos que, ante situaciones de estrés ambiental, pueden entrar en una fase viable pero no cultivable (VBNC; viable but noncultivable), en la que, a pesar de no poder ser recuperados empleando los medios de cultivo habituales, conservan distintas actividades metabólicas. La inducción de este estado VBNC, que se acompaña de cambios morfológicos, ha sido propuesta como un probable mecanismo de supervivencia.

Otros inconvenientes de las técnicas dependientes de cultivo son el requerir cantidades de muestra superiores a las que normalmente es posible obtener a partir de obras de arte (Schabereiter-Gurtner et al., 2001a) y tiempos de incubación de varias semanas (Piñar and Sterflinger, 2009).

A pesar de estos inconvenientes, son muy útiles para el estudio de hongos relacionados con el biodeterioro de objetos artísticos puesto que permiten recuperar más del 70% de los existentes realmente en la comunidad, a diferencia de las bacterias, que solo sólo se recupera el 1%. Por ello, estas técnicas resultan tremendamente útiles para el estudio de comunidades fúngicas (Sterflinger, 2010).

La identificación de hongos filamentosos en cultivo puro, suele realizarse mediante examen microscópico de las características morfológicas de determinadas estructuras tras su crecimiento en los medios de cultivo apropiados. Sin embargo, esta forma de identificación puede resultar tremendamente complicada, sobre todo en el caso de que las estructuras que permiten la identificación aparezcan colapsadas, incompletas o simplemente, no aparezcan en la preparación. Entonces hay que recurrir a técnicas moleculares de identificación (Michaelsen et al., 2009).

4.2. Técnicas independientes de cultivo.

Desde hace bastantes años, la identificación de microorganismos basada en métodos moleculares, especialmente aquellos que incluyen la secuenciación de fragmentos de los genes que codifican los ARNr de bacterias o de las regiones ITS de hongos, se han convertido en una herramienta muy útil a la hora de estudiar la estructura de la comunidad microbiana presente en muestras ambientales prescindiendo del cultivo previo de los microorganismos (Giovannoni et al., 1990; Ward et al., 1990; Muyzer et al., 1993; Ludwig and Schleifer, 1994; Amann et al., 1995; Head et al., 1998).

Este tipo de técnicas ampliamente empleadas en genómica ambiental, han conseguido aumentar la lista de microorganismos aislados a partir de diferentes muestras gracias a su capacidad de revelar la presencia de especies que se encuentran en la comunidad en concentraciones demasiado bajas como para ser cultivadas, así como aquellas incapaces de crecer bajo condiciones de laboratorio (Ciferri, 1999). La aplicación de estos métodos en muestras procedentes de obras de arte ha permitido la identificación de microorganismos nunca antes observados en este tipo de ambientes (Röllerke et al., 1996, 1998, 1999; Gurtner et al., 2000).

Otra ventaja de estos métodos frente a los dependientes de cultivo radica en el hecho de que requieren pequeñas cantidades de muestra (1-2 mg) (Schabereiter-Gurtner et al., 2001).

Sin embargo, estas técnicas poseen el inconveniente de que no nos permiten determinar si el ADN analizado procede de microorganismos vivos, muertos, o de estructuras de resistencia como las esporas y, por tanto, tampoco podremos saber si los microorganismos identificados son responsables o no del deterioro de la obra objeto de estudio (Ciferri, 1999).

La **extracción de ADN** de calidad constituye el primer paso en cualquier estudio de comunidades microbianas. Como se ha explicado anteriormente, uno de los desafíos con el que nos encontramos a la hora de extraer el ADN total de muestras tomadas de obras de arte es la pequeña cantidad de muestra de la que se puede disponer sin dañar el objeto. Otro desafío radica en la necesidad de que el método elegido permita la extracción del ADN no sólo de células vegetativas (bacterianas o fúngicas), sino también a partir de estructuras de resistencia como las esporas (tanto esporas de hongos como endosporas bacterianas).

El último reto al que enfrentarse consiste en que el ADN extraído a partir de este tipo de muestras suele contener inhibidores de la PCR como sales, pigmentos, exopolisacáridos, ácidos húmicos así como otras sustancias (Wilson, 1997).

Un método que suele dar buenos resultados cuando se trabaja con este tipo de muestras, permitiendo la extracción de ADN amplificable es el diseñado por Schabereiter-Gurtner et al. (2001a). A pesar de ello, resulta necesario adaptarlo al tipo de muestra del que se dispone en cada caso.

Los productos obtenidos tras la amplificación mediante PCR del ADN de los genes que codifican el ARNr o las secuencias ITS, a partir del ADN procedente de los microorganismos presentes en el ADN total extraído de la muestra, originarán un patrón de bandas correspondiente a las poblaciones microbianas existentes en dicha muestra. Esto es lo que se conoce como “**fingerprinting**” de una comunidad microbiana. Este fingerprinting o patrón de bandas, puede obtenerse mediante gran variedad de técnicas tales como la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; DGGE), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (terminal-restriction fragment length polymorphisms; t-RFLP), o polimorfismo de conformación de cadena sencilla de ADN (single strand conformational polymorphisms; SSCP). La técnica de fingerprinting ideal debe ser capaz de diferenciar entre fragmentos de ADN de secuencia parecida, incluso en el caso de que las diferencias sean mínimas.

Empleando la técnica DGGE (Fischer and Lerman, 1983), es posible distinguir secuencias que difieran en una sola base. Permite determinar la diversidad genética de las distintas bacterias y hongos aislados de una muestra. Se basa en que ADNs con la misma longitud pero con secuencias distintas (distinto contenido de G+C) se van a desnaturizar en distintos momentos al ser sometidos a un gradiente creciente de productos químicos, normalmente urea y formamida, de modo que cuando un fragmento se desnaturaliza, deja de migrar a través de la matriz del gel. Las dos cadenas de ADN se disocian al aumentar la concentración del agente desnaturizante, comenzando por las regiones más débilmente unidas; como la unión entre el par AT es más débil que la del par GC, las regiones ricas en AT tienden a separarse antes bajo estas condiciones. En el punto en el que las cadenas comiencen a separarse, la velocidad de migración se reduce bruscamente debido a la configuración más relajada del dúplex.

Es necesario incorporar una cola de GC de 40 nucleótidos al extremo 5' del forward primer para evitar que ambas hebras de ADN se separen completamente, lo que alteraría el patrón de bandas. Además, la adición de esta cola, permite detectar aproximadamente el 100% de las variaciones existentes entre las secuencias (Myers et al., 1985; Sheffield et al., 1989).

El procedimiento consiste en realizar la electroforesis del producto de amplificación correspondiente al ADNr 16S (caso de bacterias) o a secuencias ITS (caso de hongos) en geles de poliacrilamida. Como consecuencia se genera un patrón de bandas que proporciona el perfil de las poblaciones microbianas presentes en la muestra en el cual, la intensidad relativa de cada banda así como su posición en el gel representan, con elevada probabilidad, la abundancia relativa de una especie concreta en la población puesto que, en principio, cada banda debería corresponder a un sólo taxón. Esto nos proporciona una visión general de los integrantes de la comunidad de forma cualitativa y semicuantitativa. Patrones complejos, con gran cantidad de bandas corresponden a una comunidad microbiana diversa, mientras que patrones con pocas bandas, representan comunidades microbianas poco diversas. La comparación del patrón de bandas generado mediante DGGE procedente de distintas muestras permite estudiar las similitudes y diferencias en la estructura de las comunidades microbianas.

Aquellas bandas con idéntica posición en el gel, no tienen por qué corresponder a la misma especie; puede tratarse de un solapamiento de bandas. Este problema se resuelve estableciendo un gradiente desnaturalizante más estrecho para aumentar la resolución de determinadas partes del perfil de bandas original.

Esta técnica fue descrita por primera vez aplicada al análisis de comunidades microbianas por Muyzer et al., (1993), mejorando su comprensión al demostrar que son mucho más diversas de lo que aparentan ser al emplear técnicas dependientes de cultivo. Resulta muy útil para estudiar la diversidad de las comunidades microbianas capaces de colonizar diferentes obras de arte, por lo que es una de las técnicas de elección en numerosos estudios (Röller et al. 1996, 1998, 1999; Gurtner et al., 2000; Piñar et al. 2001a, 2001b, 2001c, 2009, 2010; Schabereiter-Gurtner et al. 2001a, 2001c, Gonzalez and Saiz-Jimenez, 2004; Cappitelli et al. 2007; Miller et al. 2008; Portillo et al. 2008; Ettenauer et al. 2010; Michaelsen et al., 2009, 2010).

A pesar de las múltiples ventajas que ofrece el DGGE, también plantea determinados problemas. Uno de ellos aparece a la hora de cortar bandas individuales a partir del gel, extraer y reamplificar el ADN puesto que, a menudo el proceso resulta complicado por la necesidad de reamplificar el ADN y separarlo varias veces mediante DGGE antes de poder secuenciarlo. Además, en los patrones correspondientes a comunidades complejas, con gran cantidad de bandas, resulta difícil separar una sola banda del gel de forma manual. Otro problema radica en que una elevada exposición del ADN contenido en el gel a luz UV durante la extracción o reamplificación, daña el ADN originando secuencias ambiguas, como pudieron observar Schabereiter-Gurtner et al. (2001a). Además, puede haber solapamiento de bandas debido a que diferentes secuencias del ADNr 16S pueden tener el mismo comportamiento frente a la desnaturalización y, por tanto, la misma posición en el gel. El problema del solapamiento genera una mezcla de secuencias imposible de secuenciar de forma directa (Felske et al., 1998; Rölleke et al., 1996). Por último mencionar que la información obtenida procede de fragmentos de unos 200 pb, lo que no siempre permite la identificación filogenética fiable dada la escasa longitud de la secuencia.

Mediante **t-RFLP** (Liu et al., 1997) podemos analizar polimorfismos de los genes variables, como los que codifican para el ARNr 16S. En este caso se amplifica el gen diana de la comunidad con cebadores marcados en 5' con una sustancia fluorescente. Posteriormente, los productos de amplificación se digieren con endonucleasas de restricción y se separan mediante electroforesis capilar, gracias a la cual se detectan los extremos marcados. Dependiendo de la composición en especies, se obtienen diferentes perfiles. Esta técnica presenta ciertas limitaciones en lo que se refiere a demostrar la presencia en la comunidad microbiana de determinados grupos, además de ser un método que requiere dedicarle gran cantidad de tiempo (Piñar and Lubitz, 2004).

También se puede obtener la huella genética de una población mediante **SSCP**. Esta técnica (Schwieger y Tebbe, 1998) se basa en la amplificación parcial del gen del ARNr 16S y posterior separación electroforética de los fragmentos generados. Bajo condiciones no desnaturalizantes, el ADN de cadena sencilla se pliega en una estructura secundaria que dependerá de su secuencia nucleotídica. La movilidad electroforética del ADN en un gel no sólo depende de su longitud y masa molecular, sino también de su forma. En función de estas diferencias en la movilidad a lo largo de un gel de poliacrilamida se obtiene el fingerprinting de la comunidad microbiana.

Como se explicó anteriormente la técnica DGGE se basa en que el ADN con secuencias distintas se va a desnaturalizar en distintos momentos. Cuando partimos de un extracto del ADN total presente en una muestra, a medida que la electroforesis evoluciona, lo que parecía ser un único fragmento de ADN (una sola banda) en un gel de agarosa sin gradiente, se resolverá en fragmentos separados (múltiples bandas). Estos fragmentos individuales se pueden cortar del gel, purificar y clonar para secuenciar el ADN, lo que proporciona información de la secuencia nucleotídica de un solo miembro de la comunidad microbiana objeto de estudio.

Sin embargo, la comigración de varios amplicones con el mismo comportamiento de desnaturalización y, por tanto, la misma posición en el gel, podría conducir a una superposición de bandas, impidiendo la secuenciación de forma directa (Felske et al., 1998), lo que haría que el análisis filogenético no fuese fiable.

Una alternativa que permite superar estas deficiencias es la **construcción de genotecas de clones** que contengan fragmentos del ADNr 16S o las regiones ITS y su rastreo mediante DGGE. El clonaje de estos fragmentos de ADN y su posterior secuenciación, completan la información obtenida previamente mediante DGGE. Esta estrategia combina las ventajas del clonaje (Giovannoni *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1990.) con las ventajas de la DGGE, lo que permite tanto el rastreo de los clones que sean diferentes como el análisis de la estructura de la comunidad microbiana en un solo gel.

La construcción de una genoteca de clones requiere de las siguientes etapas:

- **Amplificación del ADN total extraído de la muestra.** Este ADN total se usa como molde para amplificar fragmentos del ADNr 16S en caso de bacterias, o para amplificar las regiones ITS, en el caso de hongos.
- **Clonación.** Los productos de PCR obtenidos serán clonados en un vector; el resultado es una genoteca de clones en la que los insertos serán fragmentos del ADNr 16S o regiones ITS. La clonación de DNA es una técnica usada para producir grandes cantidades de un segmento de DNA específico. El segmento de DNA que se va a clonar se une primero con un vector, el cual es un vehículo que permite transportar tal segmento de interés a una célula huésped adecuada, como *E. coli*, una de las bacterias más empleadas gracias al vasto conocimiento que se tiene acerca de su genética, bioquímica y biología molecular (Gerald, K., 2005). Para ser útil, un vector deb tener el tamaño adecuado que permita la incorporación del inserto y su entrada en la célula y genes de resistencia a antibióticos para seleccionar posteriormente las bacterias que captaron el plásmido.

- Ligación.** Consiste en la combinación de cada fragmento de DNA previamente amplificado con un vector que permitirá su entrada en la célula hospedadora. Las moléculas resultantes de esta unión se denominan ADN recombinante. El vector de clonación usado, pGEM-T Vector System (Promega), tiene un tamaño aproximado de 3kb, está linealizado y su diseño previene su recirculación. En sus extremos 3' posee una cola de timinas, lo que facilita la ligación de productos de PCR generados por ciertas polimerasas termoestables. Se trata de un vector de alto número de copias que contiene los promotores de la ARN polimerasa T7 y SP6 flanqueando un sitio de clonación múltiple situado dentro del α -péptido de la región codificante de la enzima β -galactosidasa (enzima que corta el disacárido lactosa para dar lugar a galactosa y glucosa). Cuando se consigue clonar con éxito un inserto en este vector, se interrumpe la secuencia codificante de la β -galactosidasa, lo que permite la identificación de los recombinantes por el color blanco o azul de las colonias resultantes al sembrar el producto de transformación en placas con medio selectivo.

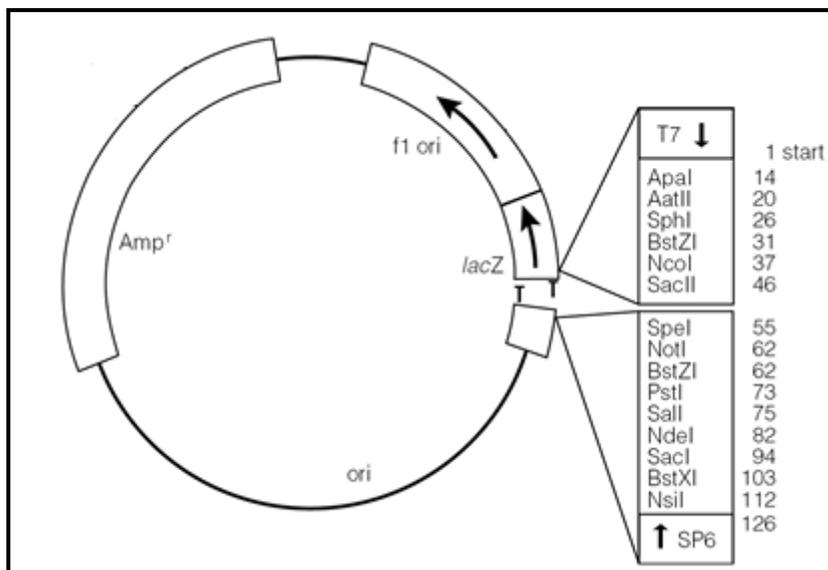


Fig. 10. Mapa del vector pGEM-T System (Promega).

Este plásmido está específicamente diseñado para la clonación de productos de PCR mediante el procedimiento conocido como “TA cloning” (Zhou and Gomez-Sanchez, 2000). Este método es uno de los más eficientes a la hora de clonar productos de PCR. Este procedimiento aprovecha la actividad transferasa terminal de ciertas ADN polimerasas termoestables, como es el caso de la polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa) que no necesita molde para añadir en los extremos 3' del ADN de cadena doble que está siendo amplificado una cola de adeninas de cadena sencilla, dando lugar a una especie de saliente (Clark, 1988; Hu, 1993). El uso de un “T-vector” linearizado (Holton and Graham, 1991; Marchuk et al, 1991; Mead et al., 1991), que posee una cola de timinas en cada uno de sus extremos 3', facilita la clonación gracias a la complementariedad de la cola de timina con la cola de adenina que portan los productos de PCR (Mezei and Storts, 1994; Guo and Bi, 2002). En estos casos, la incubación con la ADN ligasa T4 incrementa el rendimiento del proceso de clonación.

- **Transformación.** Como demostraron Avery, Macleod y McCarty por primera vez, las células bacterianas pueden captar ADN procedente del medio. Este fenómeno establece la base de la clonación. La transformación, definida como un mecanismo de transferencia genética en procariontes donde un fragmento de ADN libre es captado por una célula e integrado en su genoma (Willey et al., 2008), es utilizada para introducir el ADN recombinante en las células huésped.

Muchas especies no son competentes (células capaces de captar ADN y ser transformadas) de forma natural. Afortunadamente, estas bacterias pueden hacerse competentes de forma artificial usando tratamientos como choque eléctrico o exposición a cloruro cálcico. Ambos tratamientos consiguen que la membrana celular se haga más permeable al ADN, por lo que se usan para obtener células competentes de *E. coli*. (Willey et al., 2008).

Unas de las células huésped existentes en el mercado son One Shot® TOP10 Competent Cells (Invitrogen), que permiten la identificación de los recombinantes (colonias blancas) al sembrarlas en medio LB que contenga ampicilina, estreptomycin y X-Gal. Para conseguir que estas células sean competentes, se emplea una técnica química. Algunas de las características más destacables del genotipo de estas células son las siguientes.

- **endA** → Mutación en una endonucleasa no específica, la Endonucleasa I. Esto elimina la actividad endonucleasa no específica, favoreciendo así la tasa de transformación.
- **lacZΔM15** → Elemento necesario para la complementación de la β-galactosidasa cuando las células se siembran en medio con X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido).

- **rpsL (Str^R)** → Confiere resistencia a estreptomycin.
- **mcrA, mcrBC, mrr** → Mutaciones que permiten que el ADN metilado no sea reconocido como extraño. Este genotipo es necesario si se trata de clonar ADN genómico
- **Identificación de recombinantes.** La identificación de los recombinantes se lleva a cabo en medio LB al que resulta necesario adicionar X-gal, Ampicilina y Estreptomycin. Para la identificación de los recombinantes se requiere el compuesto orgánico X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido o también BCIG), formado estructuralmente por un grupo indol enlazado covalentemente a un galactósido. Este compuesto, es hidrolizado por la β -galactosidasa a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol. Este último es oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble. Para el caso de One Shot[®] TOP10cells no es necesaria la adición de IPTG (Isopropyl-beta-thio galactopyranoside; análogo sintético de la lactosa) para inducir la expresión de la β -galactosidasa.

Puesto que las células competentes empleadas son resistentes a estreptomycin, al sembrarlas en medio que contenga dicho antibiótico podrán crecer, lo que evita la contaminación de las placas por otras bacterias. Por otro lado, aquellas células que hayan adquirido el vector, con o sin inserto, son seleccionadas por su resistencia a ampicilina (Amp^R). Entre estas últimas, aquellas colonias que hayan incorporado el plásmido sin inserto, aparecerán de color azul, puesto que en ausencia de inserto que interrumpa al gen lacZ, la bacteria en medio con el sustrato X-gal, produce β -galactosidasa, que hidroliza el X-gal generando un compuesto de color azul, por lo que las colonias aparecen de este color. Si hay un inserto interrumpiendo el gen lacZ, la bacteria no produce β -galactosidasa, por lo que no se degrada el X-gal y en consecuencia, las colonias aparecen blancas.
- **Rastreo de la genoteca mediante DGGE.** La técnica DGGE nos permite rastrear la genoteca en busca de aquellos clones que poseen distintos insertos y que, por tanto, ocuparán distinta posición en el gel (Schabereiter-Gurtner et al. 2001a).
- **Identificación de los miembros de la comunidad microbiana.**

El último paso consiste en secuenciar los insertos contenidos en los clones seleccionados. La información genética que contiene el fragmento de ADNr 16S o la región ITS amplificada nos permitirán la identificación de los microorganismos integrantes de la comunidad, al menos a nivel de género. Una vez que disponemos de la secuencia, se compara con otras secuencias previamente depositadas en bases de datos usando la herramienta BLAST (Altschul et al., 1997).

4.3. Métodos dependientes de cultivo Versus Métodos independientes de cultivo.

A pesar de la gran variedad metodológica existente, hoy día no existe una única técnica que por sí sola permita conocer la diversidad microbiana completa de un ecosistema. Por ello se hace necesario combinar varias metodologías incluyendo las tradicionales técnicas dependientes de cultivo con las independientes para conseguir una imagen más real del número, actividades y función de los distintos microorganismos relacionados, en el caso que nos ocupa, con el patrimonio cultural y su conservación (González et al., 2003). Esto es lo que actualmente conocemos como taxonomía polifásica, que engloba información fenotípica, genotípica y filogenética.

Normalmente, encontramos ciertas discrepancias entre los resultados obtenidos mediante las técnicas dependientes e independientes de cultivo (Laiz et al. 2003a). Es debido probablemente a las diferencias existentes entre ambas metodologías:

- a) La cantidad de muestra requerida para el estudio de comunidades microbianas en obras de arte mediante técnicas independientes de cultivo es menor que la demandada por aquellas técnicas que parten del cultivo de los microorganismos. El requerimiento de menor cantidad de muestra constituye, en este caso una gran ventaja.
- b) Las técnicas dependientes de cultivo previo tan solo permiten la identificación de los microorganismos capaces de crecer en aquellos medios seleccionados para el estudio (Roszak and Colwell, 1987), mientras que las independientes de cultivo, en teoría deberían permitir la identificación de microorganismos cultivables y no cultivables. Como consecuencia, los métodos dependientes de cultivo no proporcionan información del total de microorganismos que integran la comunidad. Además, se ha demostrado que los microorganismos cultivados representan una minoría del total de integrantes de la comunidad (Piñar and Lubitz, 2004). Por otro lado, los resultados obtenidos a partir de las técnicas independientes de cultivo pueden aportar información para emplear o diseñar nuevos medios de cultivo que permitan el crecimiento de todos los integrantes de la comunidad (Piñar et al., 2001c).

- c) Una ventaja de las técnicas dependientes de cultivo se basa en que permiten diferenciar entre microorganismos vivos o muertos, ya que estos últimos son incapaces de crecer, mientras que las independientes no proporcionan información acerca del estado fisiológico de los microorganismos encontrados por lo que podrían ser viables y estar creciendo activamente, estar en estado de quiescencia o incluso muertos. En este último caso, lo que se detectaría mediante estas técnicas sería el ADN del microorganismo que queda presente en la muestra.
- d) Mediante ninguno de los dos métodos mencionados resulta posible determinar exactamente el origen del daño biológico observado en la obra de arte estudiada (Ausubel et al., 1994; Heyrman et al., 2004).

Como hemos podido comprobar, existen importantes diferencias entre las técnicas dependientes e independientes de cultivo. Las ventajas e inconvenientes de cada una de ellas han de tenerse en cuenta a la hora de elegir el método a seguir en el estudio de las poblaciones microbianas existentes en obras de arte. Lo más adecuado sería el empleo de ambas metodologías de forma conjunta puesto que no son ni contradictorias ni excluyentes, sino complementarias.

5. METODOS EMPLEADOS EN ESTUDIOS EXPERIMENTALES DE BIODETERIORO

ESTRATIGRAFIA

Las distintas capas de las obras pictóricas suelen poseer gran heterogeneidad al estar compuestas de mezclas complejas de materiales tanto orgánicos como inorgánicos que pueden ser aplicadas sobre distintos soportes tales como lienzo, tabla de madera o papel. La identificación de los distintos constituyentes empleados en la obra es una de las primeras tareas a realizar antes de escoger los métodos de restauración y conservación más adecuados (Navas, 2008).

La **estratigrafía** es un paso crítico a la hora de comprender la naturaleza de la obra, determinar su estado de degradación o conocer la existencia de procesos de restauración previos (Franquelo et al., 2009). La caracterización de los distintos materiales empleados debe realizarse partiendo de muestras que conserven todas las capas, desde el barniz empleado como protector hasta el soporte. De este modo, la estratigrafía nos proporcionará información a cerca de la composición de la obra.

El estudio de la estratigrafía suele comenzar con la observación microscópica de la muestra, lo que proporciona información sobre la morfología de los granos de los pigmentos empleados como tamaño y forma, su estado de agregación y sus características ópticas (Gomez, 1988; Gayo, 1996). A continuación, la muestra se analiza empleando técnicas espectroscópicas como micro-FTIR o micro-Raman y microanálisis mediante energía dispersiva de rayos X aclopada a microscopía electrónica (SEM-EDX). Este tipo de análisis nos permitirá identificar los pigmentos, aglutinantes, etc.

ESPECTROSCOPIA RAMAN.

La espectroscopía Raman se ha utilizado ampliamente en arte y conservación al ofrecer la posibilidad de solucionar muchos problemas relacionados con la caracterización de los materiales constitutivos de las obras de arte (Doménech-Carbó, 2008). La identificación de pigmentos, aglutinantes y otros materiales, proporciona una información fundamental a la hora de realizar trabajos de restauración puesto que si se emplean materiales incorrectos, por ejemplo pigmentos, pueden tener lugar reacciones químicas entre moléculas incompatibles (Burgio et al., 1997).

El conocimiento exacto de la composición química de los distintos componentes de una obra de arte así como de los productos de su degradación, son críticos a la hora de decidir el método más adecuado de conservación (Burgio and Clark, 2001). Se trata de un tema que va más allá del campo del Arte y que está captando la atención de historiadores, restauradores, conservadores y científicos (Feller, 1986; Roy, 1994).

Los estudios en los que se emplea esta técnica han aumentado considerablemente en las últimas décadas gracias a que posee una serie de ventajas que la hacen más útil que otras cuando la muestra a analizar es de esta naturaleza (Edwards and Chalmers, 2005; Vandenabeele et al., 2007):

- Es una técnica fiable y sensible.
- Se necesita muy poca cantidad de muestra para llevar a cabo los análisis. Incluso se puede evitar la toma de muestras ya que la técnica puede usarse in situ.
- Es no destructiva, puesto que el objeto estudiado no sufre daño alguno.
- No requiere preparación previa de la muestra mediante tratamientos mecánicos o químicos.
- Capaz de analizar compuestos orgánicos e inorgánicos, permitiendo detectar ambos cuando aparecen mezclados formando parte de los materiales constitutivos de la obra de arte. Con ello es posible determinar si existen interacciones entre ellos y su estabilidad frente a la acción de agentes químicos, biológicos o ambientales (Edwards, 2009).

Por todo lo anterior, la espectroscopía Raman ha sido propuesta en numerosas ocasiones como la técnica ideal para el estudio de los materiales utilizados en las obras de arte (Guineau, 1984; Guineau, 1989; Gardiner et al., 1993; Davey et al., 1994a; Davey et al., 1994b; Clark, 1995; Best et al., 1995; Coupry et al., 1997; Clark et al., 1997; Clark and Gibbs, 1997; Clark and Gibbs, 1998; Burgio and Clark, 2001).

Se ha empleado para identificar pigmentos inorgánicos en pinturas al óleo, frescos, pinturas murales o manuscritos (Bell et al., 1997; Clark et al., 1995; Edwards, et al., 1998; Vandenabeele et al., 1999; Clark, 1995; Burgio and Clark, 2001; Anglos, 2006; Smith and Clark, 2002) y pigmentos orgánicos (Clark and Cooksey, 1997). Edwards et al. la emplearon para identificar otros materiales orgánicos, entre ellos, fibras vegetales (Edwards et al., 1997a), marfil (Edwards et al., 1997b; Edwards and Farwell, 1995), resinas de diferente origen (Edwards and Falk, 1997) y aglutinantes como clara y yema de huevo, caseína o colas animales en obras pictóricas (Vandenabeele et al., 2000; Burgio and Clark, 2001; Burrafato et al., 2004; Nevin et al., 2007). Investigaciones recientes demuestran que la espectroscopía Raman es la técnica más indicada la hora de estudiar los productos de degradación de distintas resinas empleadas en arte debido a la acción de agentes biológicos (Cappitelli et al., 2004).

Los materiales de naturaleza proteínica encontrados en pinturas están formados, por lo general, por mezclas de diferentes proteínas y ésteres de ácidos grasos pudiendo incorporar también impurezas lo que puede generar problemas de fluorescencia que enmascaran el espectro Raman del material (Nevin et al., 2006). En los últimos años, se han conseguido una serie de mejoras relacionadas con la instrumentación que pueden ayudar a evitar estos problemas (O'Grady et al., 2001; Osticioli et al., 2006).

Una vez que se dispone del espectro Raman de una muestra procedente de una obra pictórica, la asignación del estado vibracional que corresponde a cada compuesto puede resultar difícil, sobre todo en el caso de macromoléculas orgánicas como los aglutinantes proteicos. Como consecuencia, para la interpretación de estos espectros, resulta útil disponer de datos previos obtenidos a partir de muestras similares en cuanto a composición se refiere para poder compararlos (Susi and Byler, 1988; Li-Chan, 1996). Esta labor se ve facilitada por la gran cantidad de bibliografía que existe sobre el tema, incluyendo numerosas librerías de espectros (Bell et al., 1997; Burgio and Clark, 2001; Bouchard and Smith, 2003) (<http://minerals.gps.caltech.edu/files/raman/>; <http://rruff.geo.arizona.edu/rruff/>; <http://www.irug.org/>; http://www.aist.go.jp/RIOB/rasmin/E_index.htm).

Entre los materiales analizados en estudios previos, encontramos el espectro del blanco de España (Burgio and Clark, 2001), cola de conejo, aceite de linaza o de la resina natural dammar (Vandenabeele et al., 2000).

La espectroscopía Raman proporciona evidencia cualitativa sobre las vibraciones de los átomos de los materiales estudiados. El patrón de frecuencias de desplazamiento generado viene determinado por estados vibracionales y rotacionales típicos de la muestra. De este modo, en caso de que los microorganismos sean capaces de degradar una resina o cualquier otro material integrante de la obra, se observarán cambios entre los espectros obtenidos antes y después de su actuación como consecuencia de la hidrólisis de las moléculas de la resina, lo que dará lugar a la disminución en la intensidad de determinados picos, llegando incluso a su desaparición (Rangel-Vázquez et al., 2009). De igual manera pueden aparecer nuevos picos debido a la generación de compuestos procedentes de la hidrólisis de la resina. Algunos autores consideran que esta técnica puede proporcionar además, información cuantitativa estudiando la pérdida en peso de la resina mediante el cálculo del área del pico (Rangel-Vázquez et al., 2009).

OBJETIVOS

Es conocido que los microorganismos causan el deterioro de las obras de arte; en la bibliografía podemos encontrar numerosos artículos relacionados con el biodeterioro de materiales orgánicos o inorgánicos que forman parte de ellas. Tal es el caso del lino, papel, piel, vidrio, mármol y piedra (Krumbein and Petersen, 1990; Drewello and Weissmann, 1997; Cifferi, 1999).

En el caso de óleos sobre lienzo, los microorganismos generan distintos tipos de alteraciones como decoloraciones, aparición de manchas o pérdida de material; esta última puede derivar en daños estructurales muy importantes. Estas alteraciones pueden producirse principalmente, por dos motivos: debido a la acción de productos agresivos procedentes del metabolismo microbiano, como ácidos orgánicos o inorgánicos, o como consecuencia del empleo como fuente de nutrientes de los distintos materiales que constituyen la obra, ya que los microorganismos producen y excretan gran variedad de enzimas con actividades muy diversas, con capacidad para hidrolizar la práctica totalidad de los materiales presentes en ellas.

A la hora de enfrentarnos a los problemas ocasionados por el biodeterioro nos encontramos con que, en la mayoría de los casos, los conservadores y encargados del mantenimiento de las obras de arte no son conscientes del gran potencial de los microorganismos como agentes de biodeterioro. Es por ello de gran interés sumar los conocimientos de otros profesionales para llevar a cabo la identificación de las comunidades microbianas presentes en las obras y conseguir el correcto mantenimiento y conservación de las mismas.

Antes de comenzar cualquier tratamiento de restauración, resulta imprescindible determinar los microorganismos presentes en las muestras así como su potencial destructor. De este modo se podrá garantizar la idoneidad de los métodos elegidos. Incluso una vez terminado el proceso de restauración, puede resultar útil llevar a cabo un seguimiento de la comunidad microbiana puesto que el cambio generado por el uso de determinados biocidas puede favorecer el desarrollo posterior de otros microorganismos con mayor potencial degradativo (Bianchi et al., 1980).

Se han propuesto distintos métodos de identificación empleando técnicas dependientes e independientes de cultivo. Las primeras nos permiten la caracterización fenotípica de los miembros de la comunidad; las segundas, aportan una perspectiva general de las poblaciones microbianas de la obra de arte, incluyendo aquellos microorganismos incapaces de ser cultivados. La desigualdad en los resultados obtenidos mediante ambos tipos de técnicas se ha puesto de manifiesto en distintos estudios (Amann et al., 1995; DeLong, 2005; DeLong and Karl, 2005; Head et al., 1998; Rozak and Colwell, 1987; Ward et al., 1990), llegándose a la conclusión de que se complementan (Piñar and Lubitz, 2004).

Durante las dos últimas décadas, la mayoría de estudios relacionados con la caracterización de las comunidades microbianas asociadas a procesos de biodeterioro, se han centrado en obras de arte tales como monumentos realizados en piedra (de los Ríos et al., 2004; Suihko et al., 2007; Piñar et al., 2009; Scheerer et al., 2009), pinturas murales (Nugari et al., 1993; Guglielminetti et al., 1994; Rölleke et al., 1996; Gurtner et al., 2000; Gorbushina et al., 2004) o frescos (Radaelli et al., 2003; Milanesi et al., 2006; Pangallo et al., 2009b), siendo muy escasos los relativos a pinturas sobre lienzo o sobre tabla (Santos et al., 2009; Capodicasa et al. 2010; Vukojević and Ljaljević Grbić, 2010; Inoue and Koyano 1991), a pesar de que ambos proporcionan una amplia variedad de nutrientes para distintos grupos de microorganismos, constituyendo hábitats adecuados para su desarrollo.

Otro aspecto interesante del biodeterioro consistiría en determinar si los microorganismos presentes en las obras de arte intervienen o han intervenido activamente en la alteración de las mismas o simplemente se encuentran en la obra porque son transportados con el aire, sin causar daño alguno (Griffin et al., 1991; Bock and Sand, 1993; Cifferri, 1999).

Cuando se tenga la certeza de que los daños observados en una obra de arte no son consecuencia de un ataque microbiológico, no es necesario realizar este tipo de estudios.

Por todo lo mencionado previamente, se hace necesaria una estrecha colaboración entre microbiólogos y restauradores a la hora de asegurar el correcto tratamiento de una obra de arte con signos de biodeterioro.

Los objetivos perseguidos en este trabajo han sido los siguientes:

1. Estudiar la biodiversidad de las comunidades microbianas, hongos y bacterias, presentes en óleos sobre lienzo mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo.
2. Caracterizar fenotípicamente los microorganismos aislados con el fin de determinar su potencial como agentes de biodeterioro.
3. Realizar un estudio experimental de biodeterioro, reproduciendo en el laboratorio la estructura de un óleo sobre lienzo que será sometido a la acción de bacterias y hongos aislados de obra real.

CAPITULO II

**Identificación de comunidades
microbianas. Biodiversidad.**

MATERIAL Y METODOS

1. OBRAS SELECCIONADAS PARA EL ESTUDIO.

Para el estudio de la diversidad microbiana se seleccionaron dos obras realizadas mediante la técnica de óleo sobre lienzo, de autor y época desconocidos, que presentaban signos visibles de deterioro, localizadas en el Convento de San Antón, Granada (España). Las obras seleccionadas son: Virgen de Guadalupe y Cristo de la Paciencia.



Fig. 1. Anverso y reverso de la obra Virgen de Guadalupe (VG).

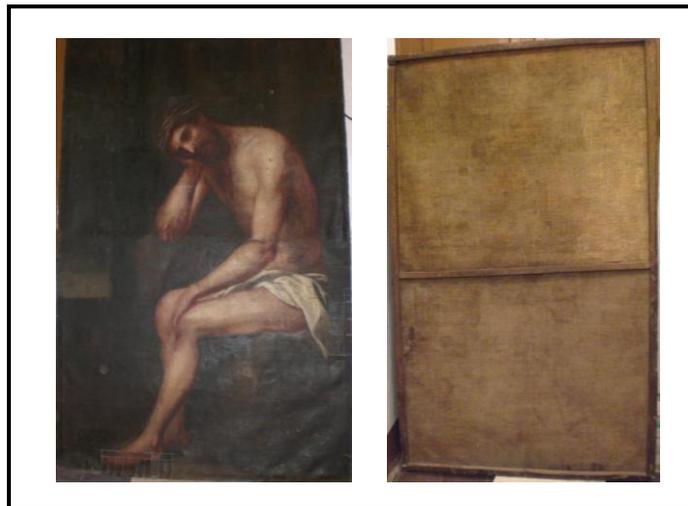


Fig. 2. Anverso y reverso de la obra Cristo de la Paciencia (PC).

2. TOMA DE MUESTRAS.

Se tomaron muestras del anverso y del reverso en ambas obras, en zonas en las que signos de deterioro tales como cambios de color y presencia de manchas o modificaciones estructurales de la capa pictórica podían observarse a simple vista. Adicionalmente, se tomaron muestras procedentes de áreas sin dichos signos.

Se tomaron dos tipos de muestras:

- **Hisopos.** Se empleó un hisopo estéril para frotar la superficie de la obra, considerada como una técnica de toma de muestras no-invasiva (Michaelsen et al., 2009). Las muestras VG5 a VG8 y CP3 a CP7, correspondientes a los cuadros Virgen de Guadalupe y Cristo de la Paciencia respectivamente.
- **Raspados del lienzo.** Se obtuvieron raspando con un escalpelo estéril la superficie del cuadro. Las muestras VG1 a VG4 se tomaron del cuadro Virgen de Guadalupe y las muestras CP1 y CP2, del lienzo Cristo de la Paciencia.



Fig. 3. Zonas de muestreo y muestras correspondientes al anverso de la obra Virgen de Guadalupe.



Fig. 4. Zonas de muestreo y muestras correspondientes al reverso de la obra Virgen de Guadalupe.

Las zonas de muestreo así como la modalidad y número de muestras tomadas se muestran en la **Tabla. 1**.

Obra VIRGEN DE GUADALUPE		TIPO DE MUESTRA	
		Raspado	Hisopo
ANVERSO	Zona con signos visibles de deterioro	VG1, VG2, VG3 y VG4	VG6 y VG7
	Zona, aparentemente, sin signos visibles de deterioro	---	VG9
REVERSO	Zona con signos visibles de deterioro		VG5
	Zona, aparentemente, sin signos visibles de deterioro	---	VG8

Tabla. 1. Tipo y procedencia de muestras tomadas de la obra Virgen de Guadalupe.

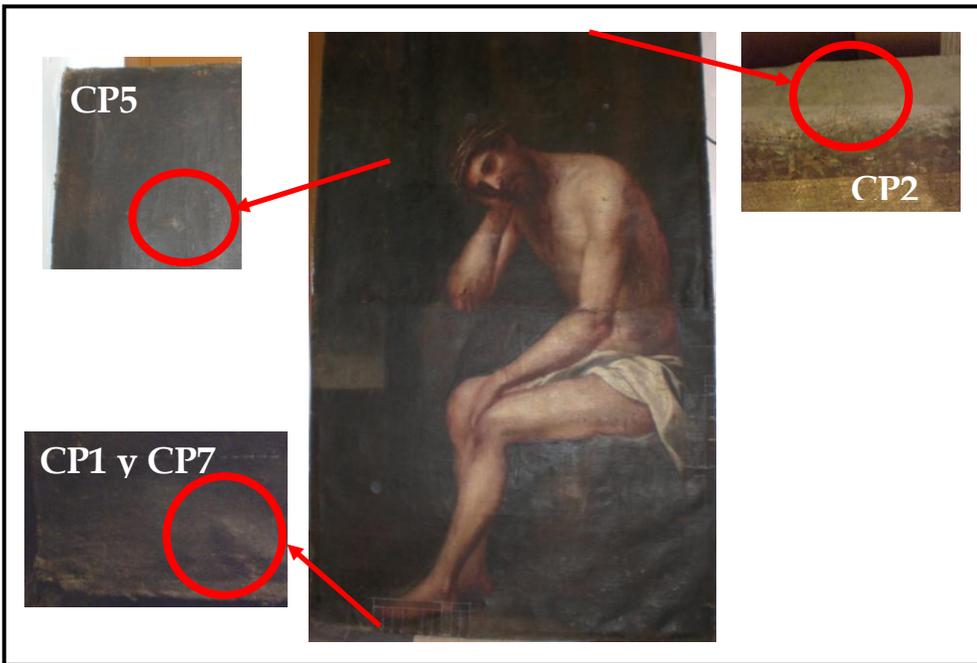


Fig. 5. Zonas de muestreo y muestras correspondientes al anverso de la obra Cristo de la Paciencia

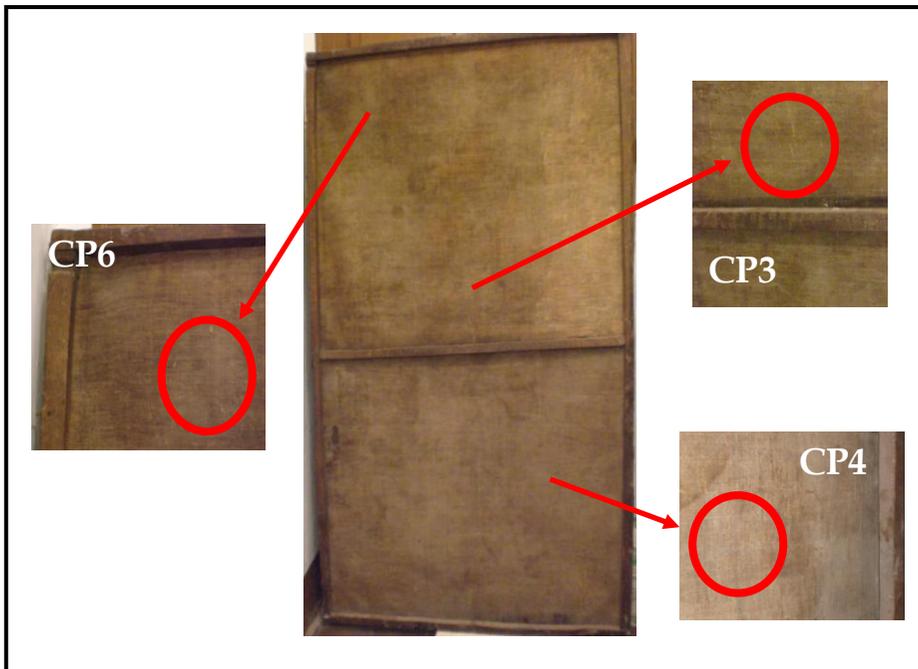


Fig. 6. Zonas de muestreo y muestras correspondientes al reverso de la obra Cristo de la Paciencia.

Obra CRISTO DE LA PACIENCIA		TIPO DE MUESTRAS	
		Raspado	Hisopo
ANVERSO	Zona con signos visibles de deterioro	CP1 y CP2	CP7
	Zona, aparentemente, sin signos visibles de deterioro	---	CP5
REVERSO	Zona con signos visibles de deterioro	---	CP6
	Zona, aparentemente, sin signos visibles de deterioro	---	CP3 y CP4

Tabla. 2. Tipo y procedencia de muestras obtenidas de la obra Cristo de la Paciencia.

3. TECNICAS DE ANALISIS ESTRATIGRAFICO.

Se realizó con el fin de conocer la composición química de la obra. Se tomaron tres micromuestras a partir de zonas que mostraban diferentes colores.

Muestra N°	Localización
SA-1 A	Anaranjado
SA-1B	Verde
SA-1C	Amarillo

Tabla. 3. Muestras tomadas del lienzo Virgen de Guadalupe para el análisis estratigráfico.

Para este estudio se emplearon las técnicas habituales de análisis de pintura artística que se enumeran a continuación.

3.1. Microscopía óptica por reflexión y por transmisión, con luz polarizada.

Esta es una técnica básica que permite el estudio de la superposición de capas pictóricas, así como el análisis preliminar de pigmentos, aglutinantes y barnices, empleando ensayos microquímicos y de coloración selectiva de capas de temple y óleo. Las microfotografías obtenidas se realizaron con luz reflejada a 300 X y con nícoles cruzados, a no ser que se especifiquen otras condiciones.

3.2. Espectroscopía IR por transformada de Fourier.

Se emplea en el análisis de las preparaciones y los componentes de recubrimientos o barnices. Los análisis se llevan a cabo entre 4400 cm⁻¹ y 370 cm⁻¹, en pastillas de KBr o mediante análisis superficial usando la técnica UATR (Universal Attenuated Total Reflectance).

3.3. Microscopía electrónica ambiental/análisis elemental por energía dispersiva de rayos X (ESEM/EDX).

Se utiliza para el análisis elemental de granos de pigmentos, con el fin de determinar la naturaleza de los mismos.

3.4. Cromatografía en fase gaseosa.

Se emplea para la determinación de sustancias lipófilas, como aceites secantes, resinas y ceras; y de sustancias hidrófilas, como la goma arábica y productos afines. Las muestras se tratan con el reactivo de metilación Meth-prep II en el caso de sustancias de tipo cera u oleo-resinosas. Para los hidratos de carbono se lleva a cabo una hidrólisis y una derivatización de los monosacáridos a acetatos de alditol. Los aminoácidos, junto también a los ácidos grasos, se analizaron mediante cromatografía de gases mediante derivatización con TBDMSTFA (terc-butil-dimetilsililtrifluoroacetamida) en piridina.

4. TECNICAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS.

4.1. Aislamiento de microorganismos.

Los hisopos se utilizaron para inocular, por el método de siembra en estrías, placas de Petri que contenían medio TSA (agar de tripticaseína y soja) y agar Sabouraud cloranfenicol. Se incubaron a 28°C durante una semana. Las placas se observaron diariamente para vigilar la aparición de colonias y llevar a cabo su reaislamiento con objeto de disponer de cultivos puros de bacterias y hongos.

Para el reaislamiento mencionado, entre todas las colonias bacterianas que mostraron la misma apariencia y morfología, se seleccionó una de ellas para ser transferida a una placa de TSA. El mismo criterio se siguió para los hongos, pero éstos se resembraron en pacas de PDA (potato dextrose agar). Una vez crecidos, los microorganismos se conservaron en glicerol al 70% y a -80°C.

4.2. Métodos de extracción de ADN.

4.2.1. Extracción de ADN a partir de cultivos puros.

a) Bacterias.

Se siguió un protocolo basado en el descrito por Ausubel et al. (1991), en el que la incubación con una proteasa va seguida de la adición de CTAB (hexadecyltrimethyl ammonium bromide), el cual forma complejos con polisacáridos y proteínas residuales originando su precipitación. Estos contaminantes son fácilmente eliminados usando fenol/cloroformo/alcohol isoamílico.

El procedimiento se resume a continuación:

- Las distintas bacterias aisladas se hicieron en crecer 5 ml de medio líquido TSB (caldo de tripticaseína y soja). El tiempo de incubación dependió de cada aislado bacteriano.
- A partir del cultivo anterior se tomaron 3 ml que se centrifugaron 5 min a 13000 xg. El sobrenadante se desechó, conservando el pellet, correspondiente a las células.
- Las células bacterianas se resuspendieron en 540 µl de TE mediante pipeteo, se añadieron 50 µl de Lisozima (Stock: 50 mg/ml) y se incubaron durante 20 min a 37°C.
- A continuación, se añadieron 11.5 µl de SDS al 25% (concentración final 0,5%) y 6 µl de Proteínasa K (Stock: 20 mg/ml; concentración 200 µg/ml) y se incubó durante 1 hora a 37°C.
- Seguidamente, se adicionaron 100 µl de NaCl 5M y 80µl de solución CTAB/NaCl (10% CTAB, 0,7M NaCl) y se incubó durante 10 minutos a 65°C. La solución CTAB/NaCl permite la precipitación de restos de pared celular, polisacáridos y proteínas.
- Posteriormente se añadió un volumen equivalente al que queda en el tubo de microcentrífuga (aproximadamente 0.8 ml) de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vortex y se centrifugó 4-5 minutos, lo que conduce a la formación de una interfase blanca. Este paso nos permite eliminar los complejos CTAB/Proteína/Polisacáridos formados en el paso anterior.
- Tras la centrifugación, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, dejando atrás la interfase, y se adicionó fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Se agitó en vortex y se centrifugó durante 4-5 minutos, lo que conduce también en este caso a la formación de una interfase blanca.
- A continuación, se añadieron 0,6 vol (aproximadamente 300µl) de etanol 96% al sobrenadante acuoso recogido en otro tubo de y se incubó entre 2 horas/una noche. Esto nos permite concentrar el ADN extraído de las células.

- Por último, se centrifugó, se desechó el sobrenadante, y el precipitado recogido se dejó secar a 65°C para finalmente resuspenderse en 100 µl de agua ultrapura.

b) Hongos.

Se siguió el protocolo descrito por Sert and Sterflinger (2009), que combina la lisis enzimática de las células con la lisis mecánica de las mismas.

El procedimiento se resume a continuación:

- Los hongos aislados se inocularon en medio líquido (medio malta). El tiempo de incubación dependió de cada aislado fúngico.
- Primero, se tomaron tubos de microcentrifuga de 2ml en los que se introdujeron 200 µl de perlas de vidrio de 0,1-0,5 mm de diámetro (Merck), de modo que ocuparan un volumen de unos 200 µl.
- A continuación, se añadieron 500 µl del búfer de extracción pH 8.0.
- El paso siguiente consistió en transferir una porción del micelio (100 g aproximadamente) desde el tubo con medio líquido en el que se encontraba creciendo hasta el tubo de 2ml en el que previamente se habían introducido las perlas de vidrio y el búfer de extracción.
- Seguidamente, las muestras se agitaron en un disruptor de células (Thermo Savant FastPrep Ribolyser, FP120; Holbrook, USA) durante 40 segundos a una velocidad igual a 6.0 hasta conseguir la lisis mecánica de las células.
- Tras esto, se incubó una hora a 65°C con agitación (800 r.p.m.)
- De nuevo, las muestras se procesaron en el equipo Fast Prep FP120 Ribolyser durante 40 segundos a una velocidad igual a 6.0 hasta conseguir la lisis mecánica de las células.
- A continuación, se centrifugó durante 10 min a 10.000g. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de microcentrifuga.
- Posteriormente se añadió un volumen equivalente al que queda en el tubo de microcentrifuga de cloroformo/isoamylalcohol (24:1), se agitó en vortex y se centrifugó 4-5 minutos, lo que conduce a la formación de una interfase blanca. Este paso nos permite eliminar los complejos CTAB/Proteína/Polisacáridos).
- Tras la centrifugación, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de microcentrifuga y se adicionó fenol/cloroformo/isoamylalcohol (25:24:1). Se agitó en vortex y se centrifugó durante 4-5 minutos, lo que conduce también en este caso a la formación de una interfase blanca.
- A continuación, se añadieron 0,6 vol (aproximadamente 300µl) de etanol 96% al sobrenadante recogido en otro tubo de

microcentrífuga y se incubó entre 2 horas/una noche. Esto nos permite concentrar el ADN extraído de las células.

- Por último, se centrifugó, se desechó el sobrenadante, y el precipitado recogido se dejó secar a 65°C para finalmente resuspenderse en 100µl de agua ultrapura.

4.2.2. Extracción de ADN total.

Se siguió el protocolo diseñado por Schabereiter-Gurtner et al. (2001a) para hacer frente a los problemas derivados de la presencia de inhibidores de PCR y de la pequeña cantidad de muestra disponible.

El procedimiento se resume a continuación:

- A la muestra se le adicionan 200 µl de búffer 1 y 90 µl de Lisozima (Stock: 50 mg/ml) (Tsai and Olson, 1991).
- Se incubó durante 30 min a 37°C con agitación.
- A continuación, se añadieron 6 µl de SDS al 25% (concentración final 0,5%) y 6 µl de Proteínasa K (Stock: 20 mg/ml; concentración 200 µg/ml) y se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación.
- Seguidamente, se adicionaron 100 µl de búffer 2 y 18 µl de SDS al 25%. La solución CTAB/NaCl permite la precipitación de restos de pared celular, polisacáridos y proteínas.
- Se incubó a 65°C durante una hora con agitación.
- Tres ciclos de congelación (-80°C) y descongelación (65°C). Tras cada uno de estos ciclos, agitar con vórtex.
- Centrifugar a 14000xg durante 5 min y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga.
- Posteriormente se añadió un volumen equivalente al que queda en el tubo de microcentrífuga (aproximadamente 0.2 ml) de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1, vol:vol), se agitó en vortex y se centrifugó 4-5 minutos, lo que conduce a la formación de una interfase blanca. Este paso nos permite eliminar los complejos CTAB/Proteína/Polisacáridos.
- Tras centrifugar a 14000xg durante 5min, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga.
- A continuación, el ADN presente en el sobrenadante se purifica usando el kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Finalmente, el ADN se eluye tres veces en agua ultrapura. Resulta necesario determinar si el ADN recuperado puede amplificarse o si por el contrario la concentración de ADN es tan baja o la de inhibidores tan alta que no es posible la amplificación.

4.3. DGGE.

Consiste en realizar una electroforesis del producto de amplificación correspondiente a fragmentos de ADNr 16S de bacterias, o a la región ITS1 de hongos, en geles de poliacrilamida que presenten un gradiente creciente de productos que desnaturalizan el ADN. De este modo, es posible separar electroforéticamente fragmentos de ADN que posean la misma longitud pero diferente secuencia nucleotídica.

4.3.1. Amplificación mediante PCR.

Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler, para las cuales se usó PCR Master Mix (Promega, Mannheim, Germany), diluyéndola según las instrucciones del fabricante.

a) Bacterias.

El ADN bacteriano procedente de cultivos puros, e amplificó un fragmento de 200 pares de bases correspondiente al ADNr 16S empleando la pareja de cebadores 341-GC/518r. El cebador específico del ADNr 16S de eubacterias 341f se empleó con una cola de GC de 40 bases en el extremo 5' añadida con objeto de estabilizar el comportamiento de desnaturalización de los fragmentos de ADN, impidiendo que ambas hebras lleguen a separarse completamente durante el transcurso de la electroforesis.

- 341f: 5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3' (Muyzer et al., 1993).
- Cola de GC: 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3' (Muyzer et al., 1993).
- 518r: 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3' (Muyzer et al., 1993).

Condiciones de amplificación (Ettenauer et al., 2010):

C₀) Desnaturalización inicial: 95°C, 5min.

C₁) Desnaturalización: 95°C, 1min.

C₂) Hibridación: 55°C, 1min.

C₃) Extensión: 72°C, 1min.

El número de ciclos fue de 30 (incluidos C₁ a C₃).

C₄) Terminación: 72°C, 5min.

Composición general de la mezcla de amplificación:

COMPUESTO	CONCENTRACION
ADN molde	2,5 μ l
Cebador	0,5 pmol/ μ l
dNTPs	100 μ M
Cloruro magnésico	0,75 mM
Taq polimerasa	0,3 U/ μ l
Volumen final	25 μ l

Para la amplificación del ADN total de las muestras se necesitaron dos rondas consecutivas, la primera empleando la pareja de cebadores 341f/985r. Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Ettenauer et al. (2010) y la misma composición en la mezcla de amplificación del apartado anterior.

El producto resultante de esta PCR se usó como molde para una segunda PCR (PCR anidada) con objeto de amplificar un fragmento de unas 200 pb correspondiente al ADNr 16S empleando la pareja de cebadores 341f-GC/518r. Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Ettenauer et al. (2010) y la composición de la mezcla de amplificación utilizada fue la misma que en la PCR anterior pero esta vez, el volumen total fue de 50 μ l.

Partiendo de 100 μ l del producto de PCR, éste se concentra durante una noche en 1ml de etanol 96%. Tras centrifugar y desechar el sobrenadante, el pellet se seca en termoblock a 65°C, se resuspende en 20 μ l de agua ultrapura, a lo que se añaden 5 μ l de solución de carga, y finalmente este producto se carga en el gel de poliacrilamida.

b) Hongos.

La amplificación del ADN procedente de cultivos puros se llevó a cabo en dos rondas sucesivas, la primera de ellas empleando la pareja de cebadores ITS1/ITS4, que permite amplificar un fragmento de entre 450-600 pb que incluye las regiones ITS1 e ITS2, así como el gen del ARNr 5,8S situado entre ambas regiones:

- ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' (White et al., 1990).
- ITS4: 5'-TCCICCGCTTATTGATATGC-3' (White et al., 1990).

Condiciones de Amplificación:

C₀) Desnaturalización inicial: 95°C, 5min.

C₁) Desnaturalización: 95°C, 1min.

C₂) Hibridación: 55°C, 1min.

C₃) Extensión: 72°C, 1min.

El número de ciclos fue de 35 (incluidos C₁ a C₃).

C₄) Terminación: 72°C, 5min.

Composición general de la mezcla de amplificación:

COMPUESTO	CONCENTRACION
ADN molde	2,5 μ l
Cebador	0,5 pmol/ μ l
dNTPs	100 μ M
BSA	0,4 mg/ml
Cloruro magnésico	0,75 mM
Taq polimerasa	0,3 U/ μ l
Volumen final	25 μ l

Para la amplificación del ADN fúngico se empleó BSA (Bovine Serum Albumin) que permite incrementar el rendimiento de aquellas PCRs en las que el ADN molde no posee mucha pureza. Esto se debe a que el BSA se une a distintas sustancias, incluyendo los grupos fenólicos de las melaninas que puedan estar presentes en la pared celular de los hongos, impidiendo que entren en contacto e inhiban la actividad de la Taq polimerasa (Kreader, 1996). Además, el uso de BSA es especialmente adecuado en aquellas reacciones enzimáticas en las que la ausencia de nucleasas es esencial.

El producto resultante de esta PCR se usó como molde para una segunda PCR (PCR anidada) con objeto de amplificar un fragmento de aproximadamente unas 300 pb correspondiente a la región ITS1, para su análisis posterior mediante DGGE.

- ITS1-GC: Se usó el primer ITS1 con una cola GC de 37 bases en el extremo 5' (Muyzer et al., 1993).
- ITS2: 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3' (Michaelsen et al., 2006).

Condiciones de amplificación (Michaelsen et al., 2006):

C₀) Desnaturalización inicial: 94°C, 5min.

C₁) Desnaturalización: 94°C, 1min.

C₂) Hibridación: 58°C, 1min.

C₃) Extensión: 72°C, 1min.

El número de ciclos fue de 35 (incluidos C₁ a C₃).

C₄) Terminación: 72°C, 5min.

Composición general de la mezcla de amplificación:

COMPUESTO	CONCENTRACION
ADN molde	2,5 μ l
Cebador	0,5 pmol/ μ l
dNTPs	100 μ M
BSA	0,4 mg/ml
Cloruro magnésico	0,75 mM
Taq polimerasa	0,3 U/ μ l
Volumen final	25 μ l

En el caso del ADN total, se llevaron a cabo dos rondas consecutivas de amplificación. En la primera ronda, se empleó la pareja de cebadores ITS1/ITS2, con objeto de amplificar un fragmento de unas 300 pb correspondiente a la región ITS1. Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Ettenauer et al. (2010). Se empleó la misma composición de la mezcla de amplificación utilizada en el apartado anterior.

El producto resultante de esta PCR se usó como molde para una segunda PCR (PCR anidada) con la pareja de cebadores ITS1-GC/ITS2. Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Michaelsen et al., (2006) y la composición en la mezcla de amplificación fue la misma del apartado anterior, modificando el volumen total a 50 μ l.

Partiendo de 100 μ l del producto de PCR, éste se concentra durante una noche en 1 ml de etanol 96%. Tras centrifugar y desechar el sobrenadante, el pellet se seca en un termoblock a 65°C, se resuspende en 20 μ l de agua ultrapura, a lo que se añaden 5 μ l de solución de carga, y finalmente este producto se carga en el gel de poliacrilamida.

4.3.2. Preparación de geles de poliacrilamida y electroforesis.

En general, la técnica consiste en una electroforesis sumergida vertical en geles de poliacrilamida en los que se establece un gradiente de productos químicos desnaturalizantes: urea y formamida. El tampón de la electroforesis fue TAE 0,5X (20mM Tris, 10mM acetate, 0.5mM Na₂EDTA; pH 7.8).

La electroforesis se llevó a cabo en un D GENE system (Bio-Rad). Para las técnicas dependientes de cultivo, se partió de 25 μ l del producto de PCR obtenido y mezclado con 4 μ l de solución de carga (Fermentas) que fueron depositados en los pocillos del gel.

Para las técnicas independientes, la electroforesis se llevó a cabo a partir de 20 μ l del producto de PCR obtenido previamente. 100 μ l de los productos de PCR se precipitaron manteniéndolos durante una noche en etanol 96% a -20°C. Tras esto, el producto de PCR se

resuspendió en 20 µl de agua ultrapura y se cargó en el gel de acrilamida para su separación electroforética.

Para las bacterias, el gradiente se estableció entre 30% y 55% mientras que para los hongos, el gradiente se estableció entre 20% y 55% (100% de los desnaturizantes contiene 7M urea y 40% v/v formamida).

La electroforesis se desarrolló durante 3 horas en el caso de bacterias y 6 horas en el de hongos, a voltaje constante de 200V y a una temperatura de 60°C. Una vez terminada la electroforesis, el gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio (1 mg/ml; stock 10 mg/ml) (Sigma-Aldrich) durante 30-40 minutos. El ADN se visualizó por exposición a luz ultravioleta utilizando un UVP documentation system (BioRad Transilluminator, Universal Hood; Mitsubishi P93D-printer).

4.4. RAPD.

La técnica RAPD-PCR o AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) descrita por primera vez por Welsh and McClelland (1990) consiste en la generación, de forma sencilla y fácilmente reproducible, de “huellas genéticas” específicas de cada microorganismo que permiten la identificación y tipificación de los microorganismos aislados sin el conocimiento previo de la secuencia del DNA que se va a amplificar.

4.4.1. Amplificación mediante PCR.

a) Bacterias.

Para generar el patrón de bandas característico de cada cepa bacteriana, se usó el cebador descrito por Ripka et al. (2006), D11344 (5'- AGTGAATTCGCGGTGAGATGCCA- 3' / 52% G+C).

Condiciones de amplificación (Welsh and McClelland, 1990):

- Cuatro ciclos de: desnaturización 94°C 5min, hibridación 40°C 5min y extensión 72°C 5min (condiciones de amplificación poco restrictivas).
- Treinta ciclos de: desnaturización 94°C 1min, hibridación 55°C 1min y extensión 72°C 2min (condiciones de amplificación restrictivas).
- Elongación final: 72°C 10min.

Composición general de la mezcla de amplificación:

COMPUESTO	CONCENTRACION
ADN molde	2,5 μ l
Cebador	0,5 pmol/ μ l
dNTPs	100 μ M
BSA	0,4 mg/ml
Cloruro magnésico	0,75 mM
Taq polimerasa	0,3 U/ μ l
Volumen final	25 μ l

b) Hongos.

Se emplearon dos cebadores diferentes:

- PELF: 5'-ATA-TCA-TCG-AAG-CCG-C-3' (Hong et al., 2005).
- URP1F: 5'-ATC-CAA-GGT-CCG-AGA-CAA-CC-3' (Kang et al., 2002).

Condiciones de amplificación (Welsh and McClelland, 1990):

- Cuatro ciclos de: desnaturalización 94°C 5min, hibridación 40°C 5min y extensión 72°C 5min.
- Treinta ciclos de: desnaturalización 94°C 1min, hibridación 55°C 1min y extensión 72°C 10min.
- Terminación: 72°C 10min.

Composición general de la mezcla de amplificación:

COMPUESTO	CONCENTRACION
ADN molde	2,5 μ l
Cebador	0,5 pmol/ μ l
dNTPs	100 μ M
BSA	0,4 mg/ml
Cloruro magnésico	0,75 mM
Taq polimerasa	0,3 U/ μ l
Volumen final	25 μ l

4.4.2. Electroforesis en gel de agarosa.

La separación y visualización de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis sumergida horizontal en gel de agarosa de baja electroendósmosis a una concentración del 2%, usando como tampón TAE 0,5X.

La totalidad de las muestras (25 μ l) fueron mezcladas con 4 μ l de solución de carga (Fermentas) y se depositaron en los pocillos del gel. La electroforesis se desarrolló durante 3 horas a voltaje constante de 70V hasta que el indicador de frente llegó al borde del gel.

Una vez terminada la electroforesis, el gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio (1 mg/ml; stock 10 mg/ml) (Sigma-Aldrich) durante 30-40 minutos. El ADN se visualizó por exposición a luz ultravioleta utilizando un UVP documentation system (BioRad Transilluminator, Universal Hood; Mitsubishi P93D-printer). El marcador utilizado fue GeneRuler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas).

4.5. Construcción y rastreo de genotecas.

Se llevó a cabo la construcción de librerías de clones de fragmentos de ADNr 16S de bacterias o de la región ITS1 de hongos y su rastreo mediante DGGE.

4.5.1. Construcción de genotecas de clones.

Se siguió el protocolo descrito por Schabereiter-Gurtner et al. (2001a) introduciendo ciertas modificaciones.

4.5.1.1. Amplificación.

- **Bacterias.**

El extracto de ADN total obtenido de cada muestra fue amplificado usando la pareja de cebadores 341f/985r con objeto de amplificar el posible ADN bacteriano presente en la misma. Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Ettenauer et al. (2010).

Composición de la mezcla de amplificación:

COMPUESTO	CONCENTRACION
ADN molde	3,5 µl
Cebador	0,5 pmol/µl
dNTPs	100 µM
Cloruro magnésico	0,75 mM
Taq polimerasa	0,3 U/µl
Volumen final	50 µl

El producto resultante de esta PCR, se usó como molde para una segunda PCR realizada en las mismas condiciones que la anterior, con objeto de conseguir una mayor cantidad de amplicones.

- **Hongos.**

El extracto de ADN obtenido de cada muestra fue amplificado usando la pareja de cebadores ITS1/ITS2, con el objeto de amplificar un fragmento de unas 300 pb correspondiente a la región ITS1.

Condiciones de Amplificación:

C₀) Desnaturalización inicial: 95°C, 5min.

C₁) Desnaturalización: 95°C, 1min.

C₂) Hibridación: 55°C, 1min.

C₃) Extensión: 72°C, 1min.

El número de ciclos fue de 30 (incluidos C₁ a C₃).

C₄) Terminación: 72°C, 5min.

Composición de la mezcla de amplificación:

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN
ADN molde	3,5 µl
Cebador	0,5 pmol/µl
dNTPs	100 µM
BSA	0,4 mg/ml
Cloruro magnésico	0,75 mM
Taq polimerasa	0,3 U/µl
Volumen final	50 µl

El producto resultante de esta PCR se usó como molde para una segunda PCR realizada en las mismas condiciones que la anterior, con objeto de conseguir una mayor cantidad de amplicones.

4.5.1.6. Purificación de los productos de PCR.

100 µl de los productos de PCR obtenidos en el apartado anterior, se purificaron usando el PCR purification kit (QUIAGENE), siguiendo para ello, las instrucciones del fabricante. El producto resultante de la purificación se resuspendió en 30 µl de agua ultrapura.

4.5.1.7. Ligación.

Este procedimiento tiene por objeto lograr moléculas recombinantes de DNA. Para ello se utilizó el vector de clonación pGEM-T Vector System (Promega).

El proceso de ligación se llevó a cabo usando el kit PGEM system (Promega). El protocolo llevado a cabo para conseguir la ligación del producto de PCR con el vector, consiste en mezclar una serie de reactivos e incubar dicha mezcla a 4°C durante una noche.

REACTIVOS	VOLUMEN
2X Rapid Ligation Buffer	7,5 µl
pGEM®-T Vector (50ng)	1 µl
ADN Ligasa del fago T4 (3 unidades/µl)	1 µl
Producto de PCR	5,5 µl

4.5.1.8. Transformación.

Consiste en introducir la mezcla de ligación en las células huésped elegidas, en este caso One Shot® TOP10 Competent Cells. El procedimiento de transformación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.5.1.9. Identificación de los recombinantes.

Las células transformadas se sembraron en medio LB al que se adicionaron ampicilina (100 mg/ml), estreptomycin (25 mg/ml) y X-Gal (5 bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside; 0.1 mM) (Sambrook et al. 1989). Este tipo de células competentes no requieren la adición de IPTG al medio de cultivo para inducir la expresión del operón lac.

4.5.2. Rastreo de librerías mediante DGGE.

El rastreo de las librerías de clones se realizó mediante la técnica DGGE. Se trata de comparar la migración de los distintos insertos correspondientes a fragmentos del ADNr 16S de bacterias o de la región ITS1 de los hongos. Aquellos insertos que muestren distinta movilidad electroforética, poseerán distinta secuencia y, por tanto, podrán corresponder a distintas especies bacterianas o fúngicas. Para ello, se siguió el protocolo diseñado por Schabereiter-Gurtner et al. (2001a), introduciendo algunas modificaciones.

Para confirmar la presencia del inserto deseado, se picaron 80 colonias blancas procedentes de cada muestra, se resuspendieron en 40 µl de búfer TE y se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación con el fin de romper las células y liberar el ADN.

A continuación, 3 microlitros del lisado se utilizaron como molde en una primera ronda de PCR en la que los cebadores fueron los específicos del vector usado en la clonación:

- SP6: 5'- ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT AC -3' (Manufacturer's protocol) (Promega).
- T7: 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3' (Manufacturer's protocol) (Promega).

El uso de estos cebadores responde al hecho de que son secuencias que no están presentes en el ADN bacteriano, por lo que al emplearlos se evita amplificar el ADN de las células empleadas en la transformación. Puesto que estos cebadores forman parte del vector de clonación, entre ambos debería colocarse el inserto, en aquellas células que lo hayan captado y, por consiguiente, se hayan transformado.

a) Bacterias.

Las condiciones de amplificación de la PCR con los cebadores SP6/T7 fueron las siguientes:

C₀) Desnaturalización inicial: 95°C, 5min.

C₁) Desnaturalización: 95°C, 1min.

C₂) Hibridación: 46°C, 1min.

C₃) Extensión: 72°C, 1min.

El número de ciclos fue de 35 (incluidos C₁ a C₃).

C₄) Terminación: 72°C, 5min.

Composición de la mezcla de amplificación:

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN
ADN molde	2,5 µl
Cebador	0,5 pmol/µl
dNTPs	100 µM
Cloruro magnésico	0,75 mM
Taq polimerasa	0,3 U/µl
Volumen final	25 µl

El producto resultante de esta PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (w/v). En el caso de bacterias, aquellos clones que incluyeron el vector con el inserto, originan un producto de PCR de aproximadamente 760 pares de bases puesto que contiene, además de las dos regiones que flanquean el plásmido, cada una con 80 pares de bases, el fragmento de ADN_r 16S obtenido mediante amplificación con los cebadores 341f/985r, que posee unos 650 pares de bases. Por otro lado, los clones sin el inserto, originan un producto de PCR de tan sólo 160 pares de bases correspondientes a las dos regiones que flanquean el plásmido.

Con objeto de encontrar clones portadores de insertos correspondientes a fragmentos de ADN_r 16S con diferente secuencia presentes en la comunidad bacteriana de la muestra, se seleccionaron aquellos clones cuyo producto de amplificación con los cebadores SP6/T7 origina una banda de unos 760 pares de bases tras la electroforesis, y se analizaron mediante DGGE. Para ello, el producto de esta PCR se usó como molde para una segunda PCR (PCR anidada) con el objeto de amplificar un fragmento correspondiente al ADN_r 16S. Como forward primer, se usó el primer 341f con una cola GC de 40 bases en el extremo 5' y como reverse primer, se usó el primer universal 518r. Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Ettenauer et al. (2010) y la composición de la mezcla de amplificación utilizada fue la misma que en la PCR anterior.

En cuanto a la preparación de geles de poliacrilamida y desarrollo de la electroforesis, se realizaron según la metodología expuesta en el apartado 4.3.2. de Materiales y Métodos.

b) Hongos.

Las condiciones de amplificación de la PCR con los cebadores SP6/T7 fueron las mismas que las empleadas en bacterias.

La composición de la mezcla de amplificación:

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN
ADN molde	2,5 µl
Cebador	0,5 pmol/µl
dNTPs	100 µM
BSA	0,4 mg/ml
Cloruro magnésico	0,75 mM
Taq polimerasa	0,3 U/µl
Volumen final	25 µl

El producto resultante de esta PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (w/v) para confirmar la presencia del inserto, como se explicó anteriormente. En el caso de hongos, aquellos clones que incluyeron el vector con el inserto, originan un producto de PCR de aproximadamente 500 pares de bases puesto que contiene, además de las dos regiones que flanquean el plásmido cada una con 80 pares de bases, un fragmento de unos 300 pares de bases correspondiente a la región ITS1 obtenido mediante amplificación con los cebadores ITS1/ITS2. Por otro lado, los clones sin el inserto, originan un producto de PCR de tan sólo 160 pares de bases correspondientes a las dos regiones que flanquean el plásmido.

Con objeto de encontrar clones portadores de insertos correspondientes a fragmentos de la región ITS1 con diferente secuencia presentes en la muestra, se seleccionaron aquellos clones cuyo producto de amplificación con los cebadores SP6/T7 origina una banda de unos 500 pares de bases tras la electroforesis, y se analizaron mediante DGGE. Para ello, el producto de esta PCR se usó como molde para una segunda PCR (PCR anidada) con la pareja de cebadores ITS1-GC/ ITS2. Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Michaelsen et al, (2006). Se empleó la misma composición de la mezcla de amplificación de la PCR previa.

En cuanto a la preparación de los geles de poliacrilamida y desarrollo de la electroforesis, éstas se llevaron a cabo de la forma explicada en el apartado 4.3.2. de Materiales y Métodos.

4.6. Identificación de los microorganismos integrantes de la comunidad microbiana presente en los lienzos.

4.6.1. Bacterias y hongos aislados.

4.6.1.1. Amplificación mediante PCR y secuenciación.

a) Bacterias.

La identificación de las bacterias aisladas se realizó secuenciando un fragmento de ADNr 16S de unos 650 pb obtenido mediante amplificación utilizando la pareja de cebadores 341f/985r.

- 985r: 5'-GTAAGGTTCTTCGCGTT-3' (Heuer et al., 1999).

Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Ettenauer et al. (2010) y se empleó la misma composición en la mezcla de amplificación utilizada en el apartado 4.3.1. a).

Tras la amplificación, los productos de PCR resultantes se purificaron mediante el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante y se enviaron a secuenciar.

b) Hongos.

La identificación de los hongos aislados se realizó mediante la secuenciación de un fragmento de ADN, de unos 450-600 pares de bases que incluye las regiones ITS1 e ITS2, así como el gen del ARNr 5,8S situado entre ambas regiones, obtenido mediante amplificación con la pareja de cebadores ITS1/ITS4, previamente descritos.

Se empleó la composición de la mezcla de amplificación utilizada en el apartado 4.3.1.b) y las siguientes condiciones de amplificación:

C₀) Desnaturalización inicial: 95°C, 5min.

C₁) Desnaturalización: 95°C, 1min.

C₂) Hibridación: 55°C, 1min.

C₃) Extensión: 72°C, 1min.

El número de ciclos fue de 30 (incluidos C₁ a C₃).

C₄) Terminación: 72°C, 5min.

4.6.1.2. Análisis de las secuencias.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante comparación con secuencias depositadas en la base de datos del NCBI o EMBL utilizando la herramienta BLAST o FASTA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ; <http://www.ebi.ac.uk>) (Altschul et al., 1997) cuyos resultados de similitud entre secuencias se basan en los alineamientos locales de las mismas.

4.6.2. Secuencias correspondientes a los insertos de los clones.

Aquellos insertos que originaron productos de PCR con distinta posición en el gel de poliacrilamida, independientemente de que su posición coincidiera o no con la de alguna banda perteneciente al patrón de DGGE originado a partir de la muestra de ADN total del lienzo, fueron seleccionados para ser secuenciados.

Dicha secuenciación se llevó a cabo partiendo de 100 µl del producto de PCR generado mediante amplificación con el par de cebadores SP6 y T7. Este producto se purificó usando el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

Las secuencias obtenidas fueron analizadas de la forma explicada en el apartado 4.6.1.2. de Material y Métodos.

5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS EMPLEADOS.

5.1. Medios de cultivo.

5.1.1. Medios de crecimiento.

a) Bacterias.

- **Medio de tripticaseína y soja (TSB, Scharlau).**

Peptona de caseína.....	17 g
Peptona de soja.....	3 g
NaCl.....	5 g
Fosfato dipotásico.....	2,5 g
Dextrosa.....	2,5 g
Agar (1,5% p/v).....	15 g
Agua destilada.....	1000 ml

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

b) Hongos.

- **Medio Sabouraud- cloranfenicol agar.**

Peptona de caseína.....	5 g
Peptona de carne.....	5 g
D(+) glucosa.....	5 g
Cloranfenicol.....	0,5 g
Agar (1,5% p/v).....	15 g
Agua destilada.....	1000 ml

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

- **Caldo de patata dextrosado.**

Peptona de patata.....	4g/1
Glucosa.....	20g/1

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

5.1.2. Medio de cultivo para identificación de recombinantes.

- **Medio LB.**

Tripton- peptona.....	10 g
Extracto de levadura.....	5 g
NaCl.....	5 g
Agar (1,5% p/v).....	15 g
Agua destilada.....	1000 ml

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El medio se dejó enfriar. A continuación se añadió ampicilina, estreptomycinina y X-Gal en las siguientes concentraciones:

Antibiótico	Concentración final	Concentración del stock
Ampicilina	300 µg/ml	200 mg/ml
Estreptomycinina	10 µg/ml	10mg/ml
X-Gal	0,1 mM	50 mM

5.2. Reactivos.

- **TE.**
10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0.
- **CTAB/NaCl (CTAB al 2% en 0.7 M NaCl).**
Disolver 4.1g de NaCl en 80 ml de agua destilada y a continuación, añadir lentamente 10 g de CTAB mientras se mantiene en agitación y a temperatura de hasta 65°C, si fuese necesario para disolverlo. Ajustar el volumen final a 100 ml.
- **Búffer 1 (empleado en extracción de ADN total).**
150 mM Na₂EDTA; 225 mM NaCl; pH 8.5.
- **Búffer 2 (empleado en extracción de ADN total).**
100 mM Na₂EDTA.
400 mM Tris-HCl.
400 mM Na₂ tampón fosfato pH 8.0.
5.55 M NaCl.
4% CTAB.
pH 8.0.

RESULTADOS

1. OBRA VIRGEN DE GUADALUPE.

1.1. TECNICAS DEPENDIENTES DE CULTIVO.

Empleando técnicas dependientes de cultivo se analizó la comunidad microbiana de las muestras VG5, VG6, VG7, VG8 y VG9.

1.1.1. Microorganismos aislados.

Para el estudio realizado mediante técnicas dependientes, se emplearon las muestras VG5, VG6, VG7, VG8 y VG9, tomadas con hisopo tal y como se describe en el apartado 2. de Material y Métodos. El aislamiento de los microorganismos se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.1. de la misma sección.

Para asignar un nombre a los microorganismos aislados, se empleó el siguiente sistema:

a) Bacterias.

VG + primer número + B + segundo número

VG = bacteria aislada a partir de la obra Virgen de Guadalupe.

Primer número = indica el número de muestra del que procede la bacteria.

B = indica que se trata de un aislado bacteriano.

Segundo número = números consecutivos con los que se designan a las bacterias con diferente apariencia aisladas de la misma muestra.

b) Hongos.

VG + primer número + H + segundo número

VG = hongo aislada a partir de la obra Virgen de Guadalupe.

Primer número = indica el número de muestra del que procede el hongo.

H = indica que se trata de un aislado fúngico.

Segundo número = números consecutivos con los que se designan a los hongos con diferente apariencia aisladas de la misma muestra.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla siguiente:

MICROORGANISMOS	MUESTRAS				
	VG5	VG6	VG7	VG8	VG9
BACTERIAS	VGB51	VG6B1	VG7B1	---	---
		VG6B2	VG7B2		
		VG6B3	VG7B3		
		VG6B4	VG7B4		
			VG7B5		
			VG7B6		
HONGOS	VG5H1	VG6H1	VG7H1	---	---
		VG6H2	VG7H2		
			VG7H3		
			VG7H4		
			VG7H5		

Tabla. 4. Microorganismos aislados a partir de las muestras VG5, 6, 7, 8 y 9 procedentes del lienzo Virgen de Guadalupe.

1.1.2. Diversidad genética de los microorganismos aislados.

El estudio de la diversidad genética de las bacterias y hongos aislados, se llevó a cabo empleando la técnica RAPD. A partir de cada aislado se obtuvo un patrón de bandas característico. Los patrones individuales se compararon visualmente con objeto de agrupar todos aquellos aislados con idéntico patrón en un mismo grupo o cluster.

a) Bacterias.

Los resultados revelan que las bacterias aisladas pueden agruparse, de acuerdo con su patrón de bandas, en 10 grupos o clusters: grupo 1 (VG5B1), grupo 2 (VG6B1), grupo 3 (VG6B2, VG6B3), grupo 4 (VG6B4), grupo 5 (VG7B1), grupo 6 (VG7B2), grupo 7 (VG7B3), grupo 8 (VG7B4), grupo 9 (VG7B5), grupo 10 (VG7B6). Cada grupo está representado por una sola bacteria excepto el grupo 3, lo que lleva a pensar que, en principio existen nueve bacterias diferentes (Fig.7).

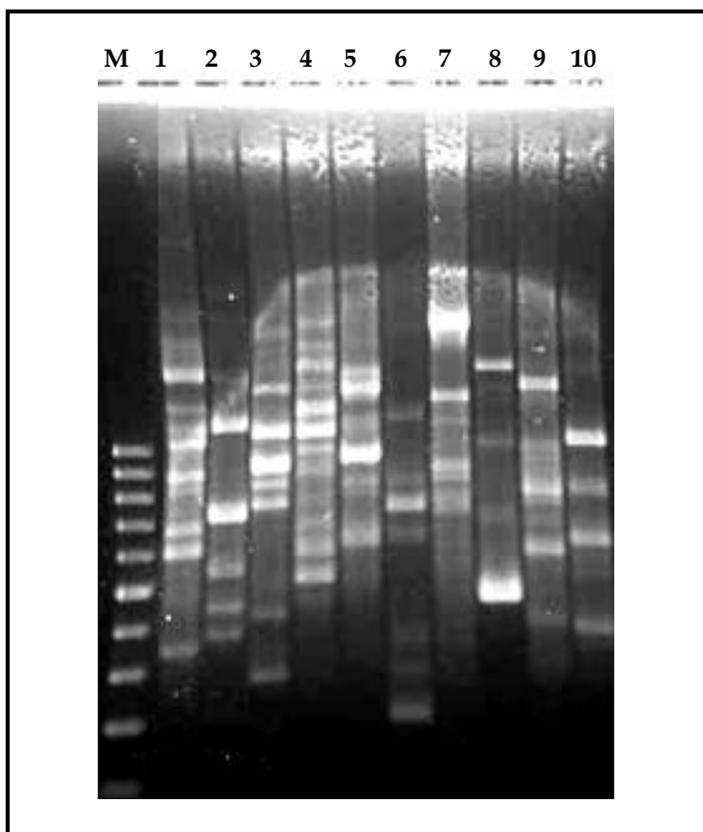


Fig. 7. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos mediante la amplificación con el primer D11344 del ADN de una cepa bacteriana representativa de cada grupo procedentes de la obra Virgen de Guadalupe. Calle M: patrón de pesos moleculares 100pb. Calle 1: VG5B1. Calle 2: VG6B1. Calle 3: VG6B2. Calle 4: VG6B4. Calle 5: VG7B1. Calle 6: VG7B2. Calle 7: VG7B3. Calle 8: VG7B4. Calle 9: VG7B5 Calle 10: VG7B6.

b) Hongos.

El patrón de bandas obtenido al emplear el cebador PELF proporciona más información, al generar mayor número de bandas en el patrón de cada hongo, que el obtenido usando URP1F. Además, con URP1F no es posible amplificar el ADN de todos los aislados. Por ello, se eligió el cebador PELF para la comparación de patrones y agrupación de los aislados en clusters.

Los hongos aislados pueden agruparse, de acuerdo con el patrón de bandas generado empleando el cebador PELF, en 7 grupos o clusters: grupo 1 (VG5H1, VG7H3), grupo 2 (VG6H1), grupo 3 (VG6H2), grupo 4 (VG7H1), grupo 5 (VG7H2), grupo 6 (VG7H4), grupo 7 (VG7H5). Cada grupo está representado por un solo microorganismos, lo que lleva a pensar que habría 7 hongos diferentes (**Fig. 8 y Fig. 9**).

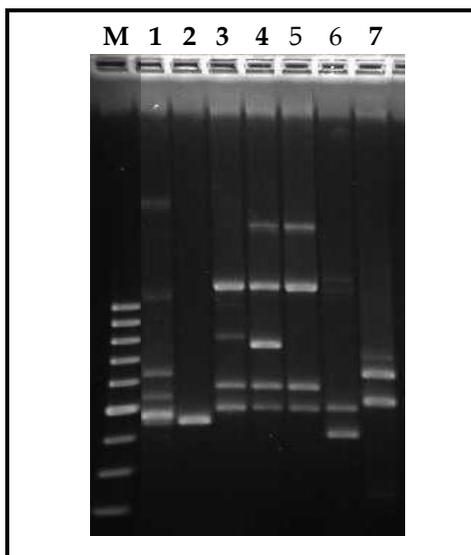


Fig. 8. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones obtenidos mediante amplificación con el primer PELF, del ADN de una cepa fúngica representativa de cada grupo procedente de la obra Virgen de Guadalupe. Calle M: patrón de pesos moleculares 100pb. Calle 1: VG6H1. Calle 2: VG6H2. Calle 3: VG7H1. Calle 4: VG7H2. Calle 5: VG7H3. Calle 6: VG7H4. Calle 7: VG7H5.

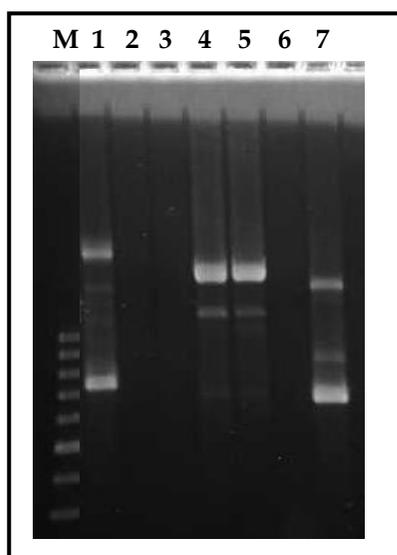


Fig. 9. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones obtenidos mediante amplificación con el cebador URP1F del ADN de los hongos aislados de la obra Virgen de Guadalupe. Calle M: patrón de pesos moleculares 100pb. Calle1: VG6H1. Calle 2: VG6H2. Calle 3: VG7H1. Calle 4: VG7H2. Calle 5: VG7H3. Calle 6: VG7H4. Calle 7: VG7H5.

1.1.3. Identificación de los microorganismos aislados.

Para secuenciar, se eligió una cepa representativa de cada grupo obtenido a partir de los distintos patrones de bandas generados mediante RAPD. Los resultados de la identificación se muestran en las **tablas 5 y 6**.

Cepa representativa de cada grupo obtenido mediante RAPD	Grupos obtenidos mediante RAPD	Cepas en el mismo grupo obtenido mediante RAPD	Filo	Identificación filogenética basada en la secuencia del gen codificante del ARNr 16S	Similitud (%)
VG5B1	1		Actinobacteria	<i>Brevibacterium</i> sp. [DQ361016.1; DQ347560.1; AB449757.1; AM421807.1].	99%
VG6B1	2		Firmicutes	<i>Bacillus</i> sp. ITP23, strain ITP23 [FR667180.1]	99%
VG6B2	3	VG6B3	Firmicutes	<i>Bacillus</i> sp. 19495 and 19493 [AJ315063.1; AJ315061.1] isolated from biodeteriorated mural paintings in the Servilia tomb (Necropolis of carmona, Seville, Spain).	99%
VG6B4	4		Firmicutes	<i>Bacillus</i> sp. [FN870069.1; HM037905.1; HM027879.1; AB360809.1; AB298784.1; GU323365.1; GQ472195.1;].	99%
VG7B1	5		Firmicutes	<i>Bacillus</i> sp. [GU586306.1; EU977747.1].	100%
VG7B2	6		Firmicutes	<i>Virgibacillus</i> sp. NS3012 [GQ889491.1].	99%
VG7B3	7		Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i> sp. [GU574116.1; AJ315071.1; GU323375.1].	100%
VG7B4	8		Firmicutes	<i>Paucisalibacillus globulus</i> , type strain B22T [AM114102.1].	99%
VG7B5	9		Actinobacteria	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: BS021 [AB240230.1]. <i>Arthrobacter</i> sp. [GQ406812.1; FN377736.1; EU851058.1].	100% 99%
VG7B6	10		Firmicutes	<i>Sporosarcina</i> sp. [FN397659.1; EF154512.1].	99%

Tabla. 5. Identificación de las bacterias aisladas del óleo sobre lienzo Virgen de Guadalupe.

Cepa representativa de cada grupo obtenido mediante RAPD	Grupos obtenidos mediante RAPD	Cepas dentro del mismo grupo obtenido mediante RAPD	Filo	Identificación filogenética basada en ITS1, secuencia parcial; gen codificante de la subunidad 5.8S; ITS 2, secuencia completa y gen codificante de la subunidad 28S, secuencia parcial	Similitud (%)
VG7H3	1	VG5H1	Ascomycota	<i>Penicillium</i> sp. isolate Y2-13 [GU134897.1].	96%
VG6H1	2		Ascomycota	<i>Emericella</i> sp. NRRL 212 [EF652435.1].	100%
VG6H2	3		Zygomycota	<i>Mucor racemosus</i> [AY213659.1; DQ118996.1]	100%
VG7H1	4		Ascomycota	<i>Penicillium</i> sp. [GQ121159.1].	100%
VG7H2	5		Ascomycota	<i>Penicillium</i> sp. [GQ121159.1].	99%
VG7H4	6		Ascomycota	<i>Ulocladium septosporum</i> [FJ266489.1].	99%
VG7H5	7		Ascomycota	<i>Eurotium</i> sp. [HM116370.1; EF652084.1; EF652078.1; EF652072.1; EF652070.1].	100%

Tabla. 6. Identificación de los hongos aislados del óleo sobre lienzo Virgen de Guadalupe.

1.2. TECNICAS INDEPENDIENTES DE CULTIVO.

Empleando técnicas independientes de cultivo, se analizó la comunidad microbiana de las muestras VG1, VG2, VG3 y VG4.

1.2.1. Diversidad genética de los microorganismos.

Tras la extracción del ADN total de las muestras, se empleó la técnica DGGE para determinar diversidad microbiana presente en las mismas. Esta técnica permite además, conocer la complejidad de las poblaciones microbianas residentes en el lienzo en función del número, intensidad y posición de las distintas bandas que componen su perfil de DGGE.

a) Bacterias.

Los perfiles de DGGE generados a partir de las muestras VG1, 2, 3, y 4 se muestran en la **Fig. 10** Como puede observarse, el patrón de DGGE que muestra mayor número de bandas corresponde a la muestra VG4 y en él, podemos distinguir 10 bandas dominantes junto a otras de intensidad más débil.

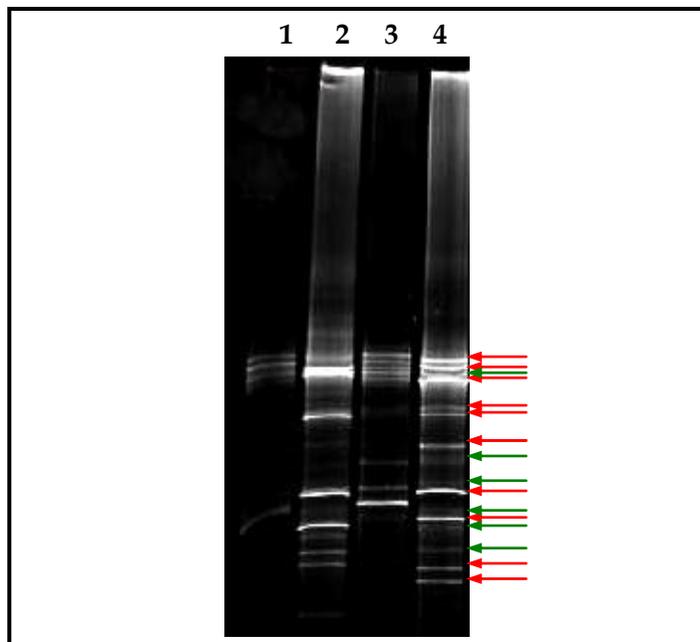


Fig.10. Perfiles de DGGE correspondientes a los productos de PCR obtenidos mediante amplificación de fragmentos del ADNr 16S a partir de extractos de ADN total procedente de las muestras VG1, 2, 3 y 4. Calle1:VG1. Calle 2: VG2. Calle 3: VG3. Calle 4: VG4. **Flecha roja:** bandas intensas. **Flecha verde:** banda débil.

b) Hongos.

Los perfiles de DGGE generados a partir de las muestras VG1, 2, 3, y 4 se muestran en la **Fig. 11** Como puede observarse, el patrón de DGGE que muestra mayor número de bandas, además de ser el patrón en el que las distintas bandas se diferencian con más claridad sin solaparse unas con otras, corresponde a la muestra VG4 y en él, podemos distinguir 5 bandas dominantes junto a otras de intensidad más débil.

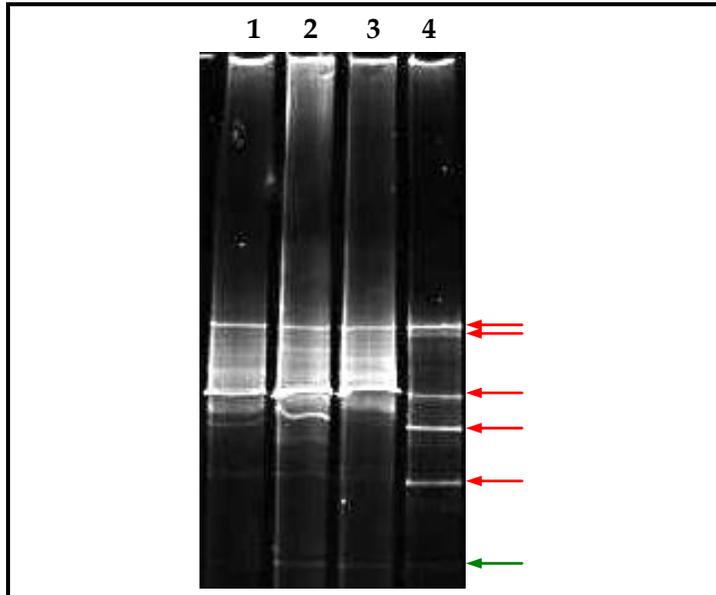


Fig. 11. Perfiles de DGGE correspondientes a los productos de PCR obtenidos mediante amplificación de las regiones ITS a partir de extractos de ADN total procedentes de las muestras VG1, 2, 3 y 4. Calle 1: VG1. Calle 2: VG2. Calle 3: VG3. Calle 4: VG4. **Flecha roja:** bandas intensas. **Flecha verde:** bandas débiles.

1.2.2. Construcción y rastreo de genotecas.

En base a los resultados obtenidos en el apartado anterior, se eligió la muestra VG4 para elaborar dos genotecas de clones: una que contuviera fragmentos del ADN_r 16S de las bacterias presentes y otra de clones que contuviera las regiones ITS de los hongos presentes en la muestra.

Posteriormente, estas genotecas fueron rastreadas en busca de los clones que contuvieran distintos insertos y, por tanto, que aportaran información a cerca de los miembros de la comunidad.

Los clones se nombraron de la siguiente forma:
C + VG + primer número + B o H + segundo número

C = indica que se trata de un clon.

VG = obtenido a partir de la obra Virgen de Guadalupe.

Primer número = indica el número de muestra del que procede.

B o H = indica que el clon procede de bacteria o de hongo respectivamente.

Segundo número = números consecutivos con los que se designa a cada clon con distinto inserto.

a) Bacterias.

En la **Fig. 12** aparecen aquellos clones que presentaron diferente movilidad electroforética. El inserto incorporado por cada uno de estos diez clones se secuenció para su identificación.

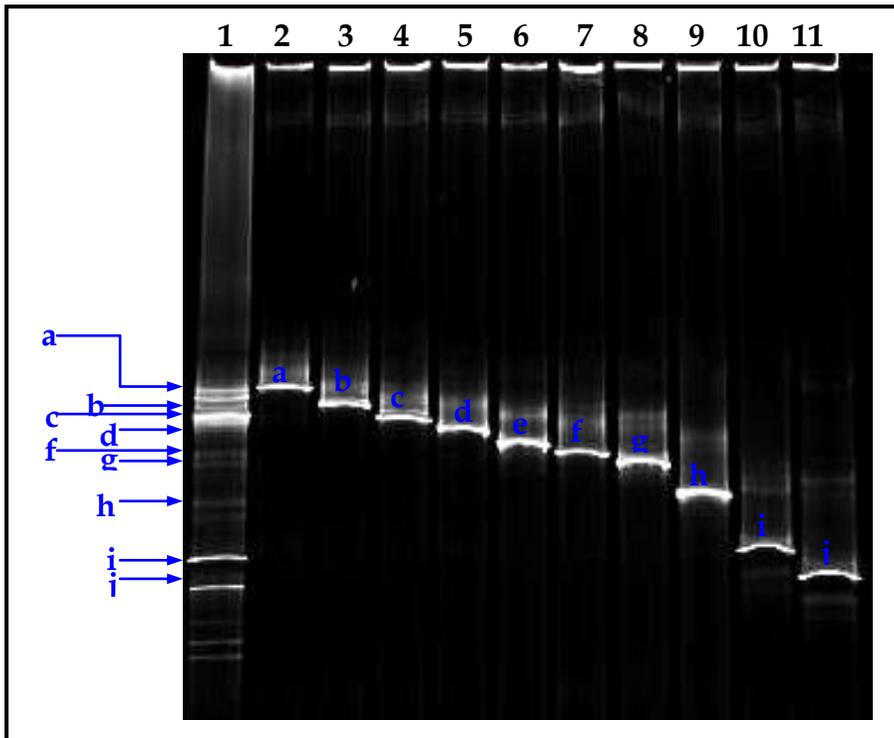


Fig. 12. Perfil de DGGE correspondiente a la comunidad bacteriana presente en la muestra VG4 tras la amplificación con cebadores específicos del ADNr 16S (calle 1) y perfiles de DGGE correspondientes a los clones que muestran distinta movilidad electroforética obtenidos a partir de la muestra VG4. Calle1: ADN total VG4. Calle 2: CVGB34. Calle 3: CVGB40. Calle 4: CVGB38. Calle 5: CVGB44. Calle 6: CVGB27. Calle7: CVGB26. Calle8: CVGB1. Calle9: CVGB2. Calle10: CVGB33. Calle11: CVGB18.

b) Hongos.

En la **Fig. 13** aparecen aquellos clones que mostraron diferente movilidad electroforética. El inserto incorporado por cada uno de estos tres clones se secuenció para su identificación.

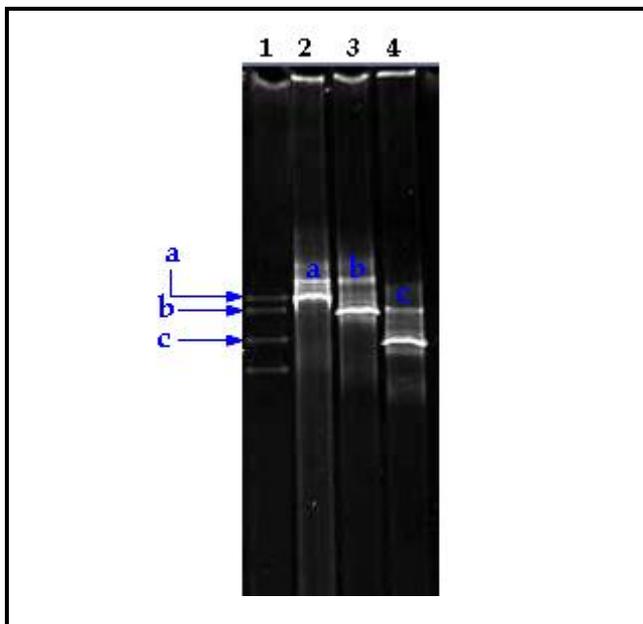


Fig. 13. Perfil de DGGE correspondiente a la comunidad fúngica presente en la muestra VG4 tras la amplificación de la región ITS1 con cebadores específicos (calle 1) y perfiles de DGGE correspondientes a los clones que muestran distinta movilidad electroforética obtenidos a partir de la muestra VG4. Calle1: extracto de ADN total VG4. Calle 2: CVGH78. Calle 3: CVGH68. Calle 4: CVGH67.

1.2.3. Identificación de miembros de la comunidad microbiana.

Tras la secuenciación de los insertos incorporados por los clones, se identificaron los miembros de la comunidad microbiana de la muestra VG4.

a) Bacterias.

Los resultados de la identificación de las bacterias integrantes, de la comunidad se muestra en la **Tabla 7**.

b) Hongos.

Los resultados de la identificación de los hongos integrantes de la comunidad se muestra en la **Tabla. 8**.

Clon	Filo	Tamaño del inserto	Identificación filogenética [EMBL accession numbers]	Similitud (%)
CVGB1	Proteobacteria	564 bp	Gammaproteobacteria [GU991854.1; FJ976542.1].	92 %
CVGB2	Proteobacteria	610 bp	<i>Aeromonas</i> sp. [GQ401237.1; GQ205109.1; GQ161962.1; FJ544391.1; EU082831.1].	99 %
CVG18	Actinobacteria	560 bp	<i>Microbacterium</i> sp. [GQ505273.1; FJ805433.1; FJ405359.1; EF612295.1; EF204432.1; DQ227343.1; AF306542.1; AJ391205.1].	99 %
CVGB26	Proteobacteria	610 bp	Gammaproteobacteria [GU929212.1; GQ451698.1; EF446895.1].	99 %
CVGB27	Proteobacteria	611 bp	<i>Stenotrophomonas</i> sp. [GQ416214.1; FJ772079.1].	99 %
CVGB33	Actinobacteria	592 bp	<i>Arthrobacter</i> sp. [FJ773996.1; FJ378036.1; EU862291.1; EF612321.1; DQ310475.1].	99 %
CVGB34	Firmicutes	611 bp	Uncultured bacterium (order Lactobacillales) [AJ576421.1; AJ576347.1].	99 %
CVGB38	Proteobacteria	609 bp	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. [FJ662875.1; GQ885144.1; AB257325.2; FJ595988.1; EU239912.1; AB362304.1; NR_025139.1].	99 %
CVGB40	Firmicutes	579 bp	Firmicutes [HM217969.1; HM111665.1; GQ249580.1].	98 %
CVGB44	Proteobacteria	610 bp	Uncultured Betaproteobacteria [EU193046.1; EU790456.1; AY322153.1]. <i>Curvibacter</i> sp. [NR_024702.1; EU341253.1].	99% 98%

Tabla 7. Identificación de los miembros de la comunidad bacteriana detectada mediante técnicas independientes de cultivo.

Clon	Filo	Tamaño del inserto	Identificación filogenética [EMBL accession numbers]	Similitud (%)
CVGH67	Ascomycota	125 bp	<i>Candida cellae</i> strain UAF-93 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence [GQ149495.1].	98%
CVGH68	Ascomycota	123 bp	<i>Pichia pastoris</i> GS115 rDNA sequence, whole genome shotgun sequence [FN392325.1].	100%
CVGH78	Ascomycota	205 bp	<i>Alternaria sp.</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence [FJ766500.1; FJ717737.1].	100%

Tabla. 8. Identificación de los miembros de la comunidad fúngica detectada mediante técnicas independientes de cultivo.

1.3. COMPARACION ENTRE TECNICAS DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DE CULTIVO.

Los filios a los que pertenecen las bacterias detectadas mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo (muestras VG7 y VG4, respectivamente) se reflejan en la **tabla 9**. Como puede observarse los porcentajes obtenidos mediante ambas modalidades fueron diferentes, como también lo fueron los géneros identificados (**Fig 14**).

Filo	Técnicas dependientes de cultivo	Técnicas independientes de cultivo
Firmicutes	70 %	20%
Actinobacteria	30 %	20%
Proteobacteria	0 %	60%

Tabla. 9. Comparación de los porcentajes correspondientes a los distintos filios bacterianos detectados mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo.

En la muestra VG7 se identificaron cepas de los géneros *Bacillus*, *Virgibacillus*, *Paucisalibacillus* y *Sporosarcina*, pertenecientes al filo Firmicutes y una Actinobacteria del género *Arthrobacter*. En la muestra VG4, tomada de la misma zona que la anterior, pero analizada, como hemos comentado, mediante técnicas independientes de cultivo, las cepas identificadas correspondieron a los géneros *Aeromonas*, *Pseudoalteromonas* y *Stenotrophomonas* (Filo Proteobacteria) junto a una beta y una gamma proteobacterias no identificadas, un miembro de Bacilli del filo Firmicutes y las actinobacterias *Microbacterium* y *Arthrobacter*.

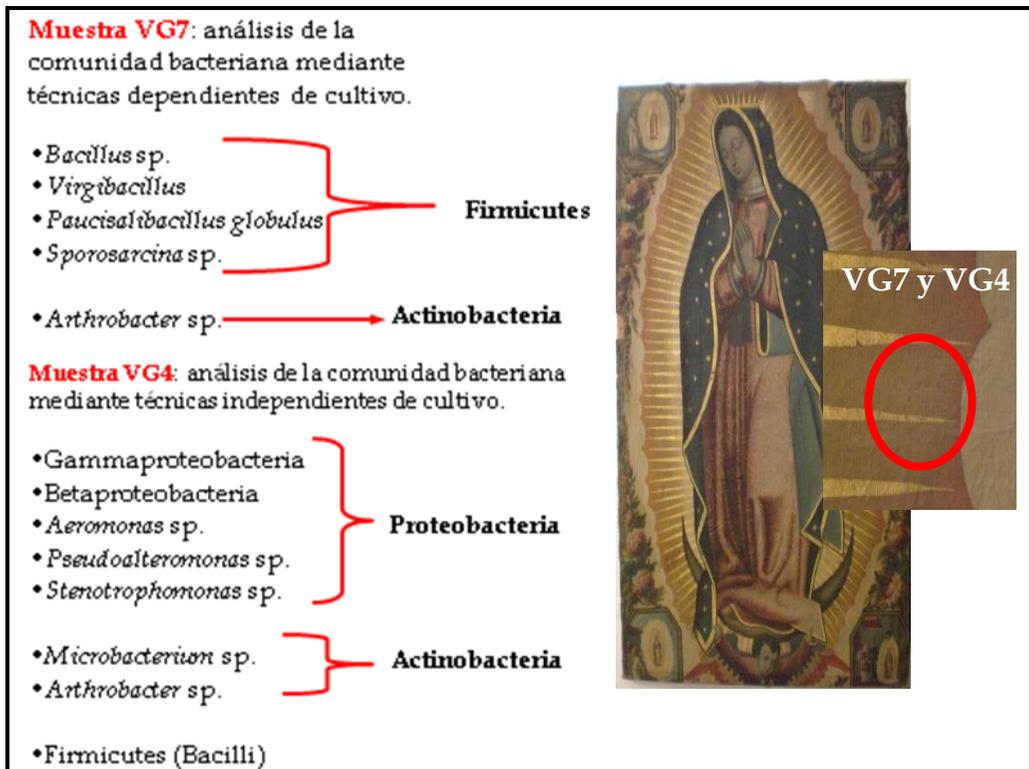


Fig. 14. Géneros detectados en las muestras VG4 y VG7 mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo respectivamente.

Analizando la siguiente figura (Fig. 15), en la que se compara el patrón de DGGE generado a partir del ADN total de la muestra VG4 con los perfiles correspondientes a los aislados bacterianos cuyo ADN generó bandas con distinta movilidad electroforética, podemos determinar los miembros de la comunidad bacteriana de la obra que pueden detectarse mediante ambas metodologías. La cepa de *Arthrobacter* sp. aislada, también puede detectarse mediante métodos independientes. Lo mismo ocurre con dos cepas del filo Firmicutes identificadas como *Paucisalibacillus globulus* y *Sporosarcina*.

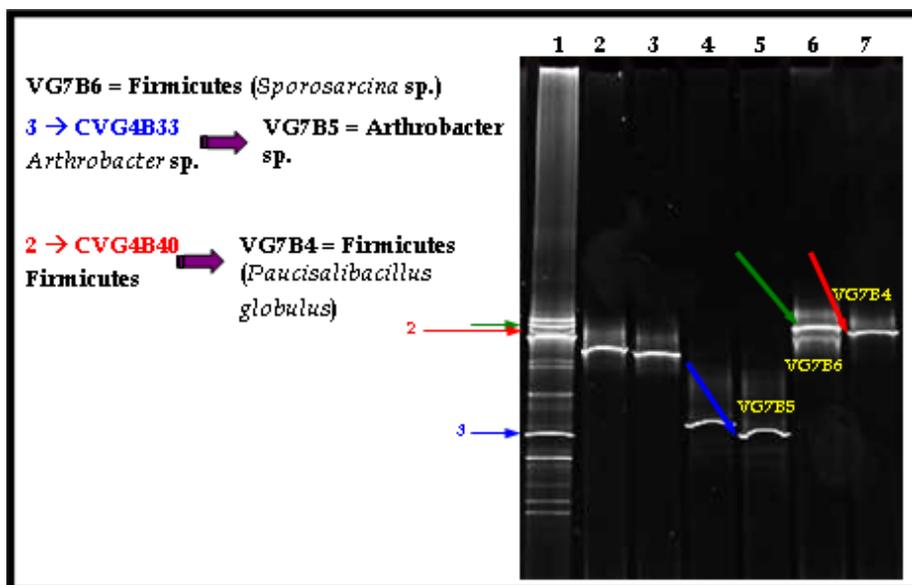


Fig. 15. Perfil de DGGE correspondiente a la comunidad bacteriana presente en la muestra VG4 tras amplificación con cebadores específicos del ADNr 16S (calle1) y perfiles de DGGE procedentes de una cepa bacteriana representativa de cada grupo correspondientes a los productos de PCR obtenidos mediante la amplificación de fragmentos del ADNr 16S empleando como molde ADN de las bacterias aisladas a partir de la muestra VG7. Calle1: ADN total VG4. Calle 2: VG7B1. Calle 3: VG7B2. Calle 4: VG7B3. Calle 5: VG7B5. Calle 6: VG7B6. Calle 7: VG7B4.

Los fillos a los que pertenecen los hongos detectados mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo (muestras VG7 y VG4, respectivamente) se reflejan en la **tabla 10**. Como puede observarse los porcentajes obtenidos mediante ambas modalidades fueron diferentes, como también lo fueron los géneros identificados: *Candida*, *Pichia* y *Alternaria* mediante técnicas independientes y *Penicillium*, *Emericella*, *Mucor*, *Ulocladium* y *Eurotium* mediante cultivo previo.

Filo	Técnicas dependientes de cultivo	Técnicas independientes de cultivo
Ascomycota	84 %	100 %
Zygomycota	16 %	0 %

Tabla. 10. Comparación de los porcentajes correspondientes a los distintos fillos fúngicos detectados mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo.

2. OBRA CRISTO DE LA PACIENCIA.

2.1. TECNICAS DEPENDIENTES DE CULTIVO.

Empleando técnicas dependientes de cultivo se analizó la comunidad microbiana de las muestras CP3, CP4, CP5, CP6 y CP7.

2.1.1. Microorganismos aislados.

Para el estudio realizado mediante técnicas dependientes, se emplearon las muestras CP3, CP4, CP5, CP6 y CP7, tomadas con hisopo tal y como se describe en el apartado 2. de Material y Métodos. El aislamiento de los microorganismos se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.1. de la misma sección.

La nomenclatura empleada es la misma que en el la obra anterior:

a) Bacterias.

CP + primer número + B + segundo número

CP = bacteria aislada a partir de la obra Cristo de la Paciencia.

Primer número = indica el número de muestra del que procede la bacteria.

B = indica que se trata de un aislado bacteriano.

Segundo número = números consecutivos con los que se designan a las bacterias con diferente apariencia aisladas de la misma muestra.

b) Hongos.

CP + primer número + H + segundo número

CP = bacteria aislada a partir de la obra Cristo de la Paciencia.

Primer número = indica el número de muestra del que procede la bacteria.

H = indica que se trata de un aislado fúngico.

Segundo número = números consecutivos con los que se designan a las bacterias con diferente apariencia aisladas de la misma muestra.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

MICROORGANISMOS	MUESTRAS				
	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7
BACTERIAS	---	---	CP5B1	CP6B1	CP7B1
			CP6B2	CP7B2	
			CP6B3	CP7B3	
			CP6B4	CP7B4	
			CP7B5		
			CP7B6		
			CP7B7		
			CP7B8		
			CP7B9		
			CP7B10		
			CP7B11		
HONGOS	---	---	---	---	CP7H1
					CP7H2
					CP7H3
					CP7H4

Tabla. 11. Microorganismos aislados a partir de las muestras CP3, 4, 5, 6 y 7 procedentes del lienzo Cristo de la Paciencia.

2.1.2. Diversidad genética de los microorganismos aislados.

El estudio de la diversidad genética de las bacterias y hongos aislados, se llevó a cabo empleando la técnica RAPD. A partir de cada aislado se obtuvo un patrón de bandas característico. Los patrones individuales se compararon visualmente con objeto de agrupar todos aquellos aislados con idéntico patrón en un mismo grupo o cluster.

a) Bacterias.

Los resultados muestran que los aislados bacterianos se pueden agrupar, de acuerdo con su patrón de bandas, en 15 grupos o clusters: grupo 1 (CP5B1), grupo 2 (CP6B1), grupo 3 (CP6B2), grupo 4 (CP6B3), grupo 5 (CP6B4), grupo 6 (CP7B1), grupo 7 (CP7B2), grupo 8 (CP7B3, CP7B5), grupo 9 (CP7B4), grupo 10 (CP7B6), grupo 11 (CP7B7), grupo 12 (CP7B8), grupo 13 (CP7B9), grupo 14 (CP7B10), grupo 15 (CP7B11). Cada grupo está representado por una sola bacteria excepto el grupo 8, lo que lleva a pensar que, en principio existen 15 bacterias diferentes.

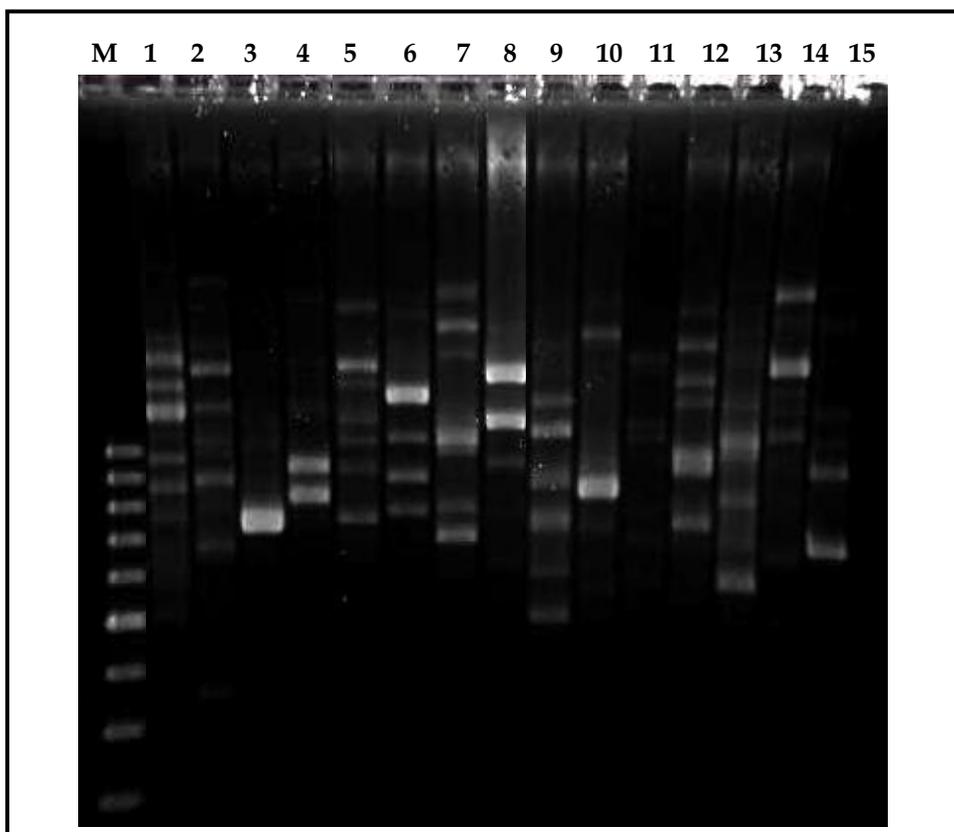


Fig. 16. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos mediante la amplificación con el primer D11344 del ADN de una cepa bacteriana representativa de cada grupo de RAPD procedentes del cuadro Cristo de la Paciencia. Calle M: patrón de pesos moleculares 100pb. Calle 1: CP6B1. Calle 2: CP6B2. Calle 3: CP6B3. Calle 4: CP6B4. Calle 5: CP7B1. Calle 6: CP7B2. Calle 7: CP7B3. Calle 8: CP7B4. Calle 9: CP7B6. Calle 10: CP7B7. Calle 11: CP7B8. Calle 12: CP7B9. Calle 13: CP7B10. Calle 14: CP7B11. Calle 15: CP5B1.

b) Hongos.

Por las razones mencionadas anteriormente en el apartado 1.1.2 de este mismo capítulo se eligió el cebador PELF para la obtención del patrón de bandas de los hongos aislados y su posterior comparación y agrupación en clusters. **Fig. 17 y 18.**

Todos los hongos aislados muestran patrones de bandas muy similares utilizando el primer PELF, pudiendo agruparse en 3 grupos: grupo 1 (CP7H1, CP7H2), grupo 2 (CP7H3), grupo 3 (CP7H4). Cada grupo está representado por un solo microorganismos, excepto el grupo 1 que está formado por dos. Esto lleva a pensar que habría 3 hongos diferentes.

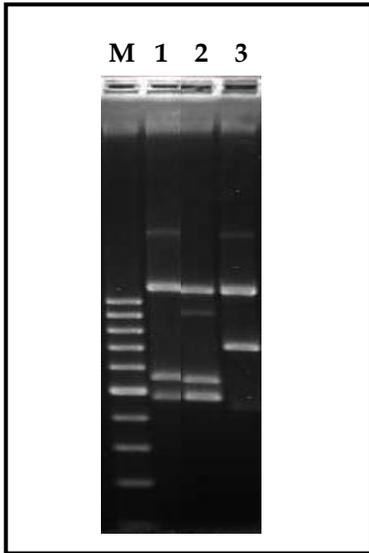


Fig. 17. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos mediante amplificación, con el primer PELF, del ADN de una cepa fúngica representativa de cada grupo procedente de la obra Cristo de la Paciencia. Calle M: patrón de pesos moleculares 100pb. Calle1: CP7H1. Calle 2: CP7H3. Calle 3: CP7H4.

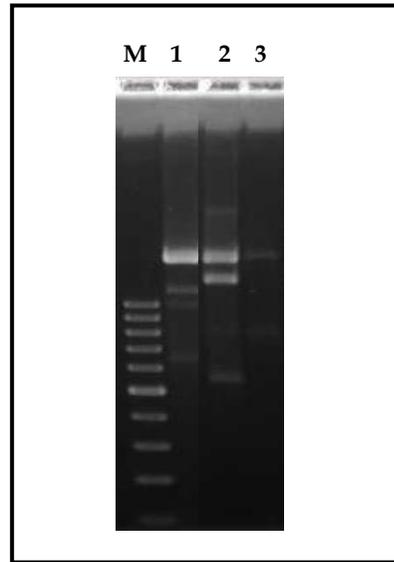


Fig. 18. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos mediante la amplificación del ADN de los hongos aislados de la obra Cristo de la Paciencia usando el primer URP1F. Calle M: patrón de pesos moleculares 100pb. Calle1: CP7H1. Calle 2: CP7H3. Calle 3: CP7H4.

2.1.3. Identificación de los microorganismos aislados.

Para secuenciar, se eligió una cepa representativa de cada grupo obtenido a partir de los patrones de bandas generados mediante RAPD.

La identificación de los aislados bacterianos aparece en la **tabla 12**, mientras que la de los aislados fúngicos se muestra en la **tabla 13**.

Cepa representativa de cada grupo obtenido mediante RAPD	Grupos obtenidos mediante RAPD	Cepas en el mismo grupo obtenido mediante RAPD	Filo	Identificación filogenética basada en la secuencia del gen codificante del ARNr 16S	Similitud (%)
CP5B1	1		Actinobacteria	<i>Microbacterium sp.</i> [DQ658916.1; FJ169470.1; FJ715739.1; FJ588231.1].	100%
CP6B1	2		Firmicutes	<i>Bacillus sp.</i> [FN870069.1; HM037905.1; HM027879.1; AB360809.1; AB298784.1; GU191902.1; GQ472195.1; GQ203617.1;]	99%
CP6B2	3		Firmicutes	<i>Sporosarcina sp.</i> [FN397659.1; EF154512.1].	99%
CP6B3	4		Firmicutes	<i>Bacillus psychrodurans</i> strain TSC11 [EU249566.1], isolated from the Etruscan tomb of Mercareccia (Tarquinia, Italy).	99%
CP6B4	5		Firmicutes	<i>Bacillus sp.</i> MI-58a and MI-33a1 [DQ223135.1; DQ223131.1] from a limestone cave (Kartchner Caverns).	99%
CP7B1	6		Firmicutes	<i>Bacillus sp.</i> [HM171927.1; HM100241.1; AY043084.1].	100%
CP7B2	7		Firmicutes	<i>Bacillus herbersteinensis</i> strain CCGE2319 [EU867376.1; AJ781029].	100%
CP7B3	8	CP7B5	Firmicutes	<i>Virgibacillus sp.</i> NS3012 [GQ889491.1].	99%
CP7B4	9		Firmicutes	<i>Paucisalibacillus globulus</i> , type strain B22T [AM114102.1].	99%
CP7B6	10		Firmicutes	<i>Bacillus sp.</i> [HQ141670.1; GU188931.1; HQ256540.1; GU586306.1].	99%
CP7B7	11		Firmicutes	<i>Bacillus sp.</i> 19496 [AJ315064.1], isolated from biodeteriorated mural paintings in the Servilia tomb (Necropolis of carmona, Seville, Spain).	100%
CP7B8	12		Actinobacteria	<i>Arthrobacter agilis</i> strain 234 [EU730943.1]	100%
CP7B9	13		Firmicutes	<i>Sporosarcina sp.</i> [FN397659.1; EU267324.1].	100%
CP7B10	14		Firmicutes	Uncultured <i>Sporosarcina sp.</i> clone [EF074398.1].	99%
CP7B11	15		Firmicutes	<i>Paucisalibacillus globulus</i> , type strain B22T [AM114102.1].	99%

Tabla. 12. Identificación de las bacterias aisladas del lienzo Cristo de la Paciencia.

Cepa representativa de cada grupo obtenido mediante RAPD	Grupos obtenidos mediante RAPD	Cepas dentro del mismo grupo obtenido mediante RAPD	Filo	Identificación filogenética basada en ITS1, secuencia parcial; gen codificante de la subunidad 5.8S; ITS 2, secuencia completa y gen codificante de la subunidad 28S, secuencia parcial	Similitud (%)
CP7H1	1	CP7H2	Ascomycota	<i>Penicillium</i> sp. isolate Y2-13 [GU134897.1].	96%
CP7H3	2		Ascomycota	<i>Penicillium</i> sp. [EU833227.1; EU833224.1; AY371616.1; AJ004896.1].	100%
CP7H4	3		Ascomycota	<i>Penicillium</i> sp. [HM366606.1; GU733711.1; GQ305305.1; FJ791137.1; AJ608949.1].	97%

Tabla. 13. Identificación de los hongos aislados del óleo sobre lienzo Cristo de la Paciencia.

2.2. TECNICAS INDEPENDIENTES DE CULTIVO.

Empleando técnicas independientes de cultivo, se analizó la comunidad microbiana presente en las muestras CP1 y CP2.

2.2.1. Diversidad genética de los microorganismos.

Tras la extracción del ADN total de las muestras, se empleó la técnica DGGE para determinar la diversidad microbiana presente en las mismas, al igual que en la obra anterior, Virgen de Guadalupe.

a) Bacterias.

Los perfiles de DGGE generados a partir de las muestras CP1 y 2 se muestran en la **Fig. 19** Como puede observarse, el patrón de DGGE que muestra mayor número de bandas corresponde a la muestra CP1 y en él podemos distinguir 4 bandas dominantes junto a otras de intensidad más débil.

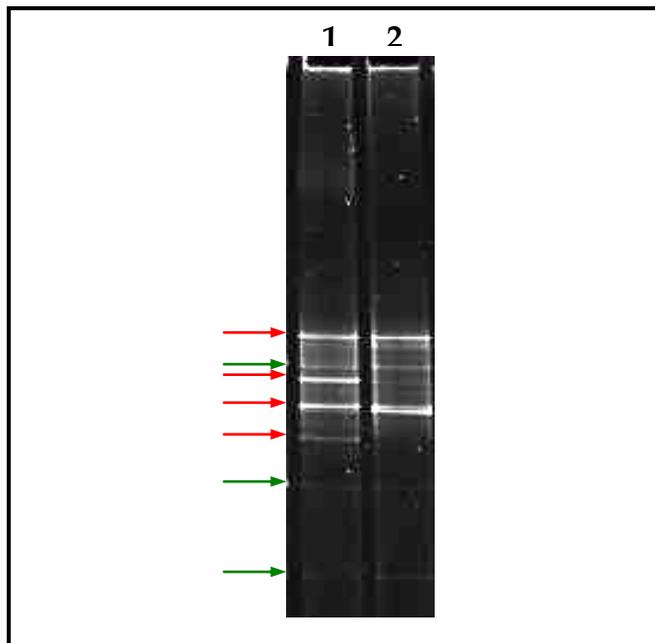


Fig. 19. Perfiles de DGGE correspondientes a los productos de PCR obtenidos mediante amplificación de fragmentos del ADNr 16S a partir de extractos de ADN total procedentes de las muestras CP1 y CP2. Calle1: CP1. Calle 2: CP2. **Flecha roja:** bandas intensas. **Flecha verde:** bandas débiles.

b) Hongos.

Para llevar a cabo el análisis de la comunidad fúngica mediante DGGE sin cultivo previo, el primer paso consiste en la amplificación de la región ITS1 del ADNr de los hongos empleando como molde el ADN total extraído de cada muestra. Lamentablemente, no se consiguió amplificación alguna empleando la pareja de cebadores ITS1/ITS2, con lo cual no resultó posible el estudio de la población fúngica mediante técnicas independientes de cultivo.

2.2.2. Construcción y rastreo de genotecas.

En base a los resultados obtenidos en el apartado anterior (2.2.1.a de Resultados), se eligió la muestra CP1 para elaborar una genoteca de clones que contuviera fragmentos del ADNr 16S de las bacterias presentes en la muestra.

Posteriormente, esta genoteca se rastreó en busca de aquellos clones que contuvieran distintos insertos y por tanto, aportaran información a cerca de los miembros de la comunidad bacteriana.

La designación de los clones es la misma que en el caso de la obra VG.

C + CP + primer número + B + segundo número

C = indica que se trata de un clon.

CP = obtenido a partir de la obra Cristo de la Paciencia.

Primer número = indica el número de muestra del que procede.

B = indica que el clon procede de una bacteria.

Segundo número = números consecutivos con los que se designa a cada clon con distinto inserto.

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 20, en la que aparecen aquellos clones que presentaron diferente movilidad electroforética.

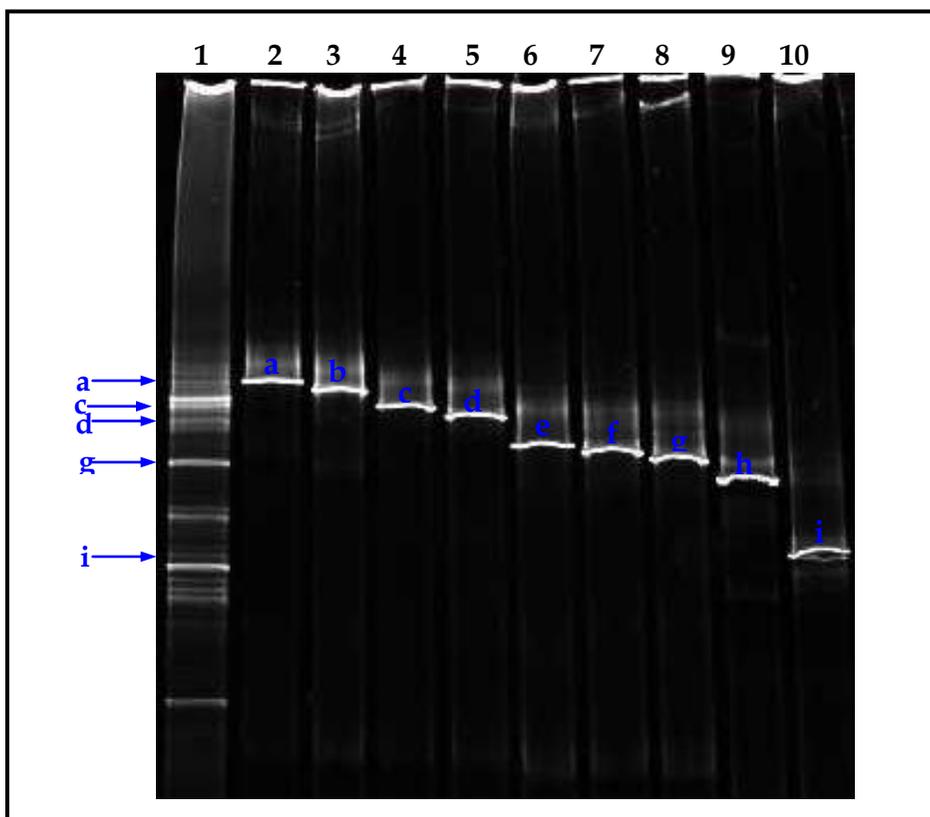


Fig. 20. Perfil de DGGE correspondiente a la comunidad bacteriana presente en la muestra CP1 tras la amplificación con cebadores específicos del ADNr 16S (calle 1) y perfiles de DGGE correspondientes a clones que muestran distinta movilidad electroforética obtenidos a partir de la muestra CP1. Calle1: ADN total CP1. Calle 2: CCPB11. Calle 3: CCPB31. Calle 4: CCPB2. Calle 5: CCPB25. Calle 6: CCPB18. Calle7: CCPB14. Calle8: CCPB23. Calle9: CCPB28. Calle10: CCPB17.

2.2.3. Identificación de los miembros de la comunidad microbiana.

La identificación de las bacterias integrantes de la comunidad bacteriana de la muestra CP1, se muestra en la **Tabla. 14**.

Clon	Filo	Tamaño del inserto	Identificación filogenética [EMBL accession numbers]	Similitud (%)
CCPB2	Proteobacteria	609 bp	Uncultured <i>Aquabacterium</i> sp. clone 16S ribosomal RNA gene, partial sequence [FJ890906.1; AY569280.1].	96%
CCPB11	Proteobacteria	611 bp	<i>Citrobacter</i> sp. 16S ribosomal RNA gene, partial sequence [AB548828.1; AF025367.1; DQ223882.1].	96%
CCPB14	Proteobacteria	609 bp	<i>Stenotrophomonas</i> sp. 16S ribosomal RNA gene, partial sequence [FJ638292.1; GU254017.1; GQ417327.1; FM213389.1; EU564819.1; EU340025.1].	99%
CCPB17	Actinobacteria	583 bp	<i>Arthrobacter</i> sp. 16S ribosomal RNA gene, partial sequence [FJ378036.1; EU862291.1; EF110913.1; DQ310475.1].	99%
CCPB18	Proteobacteria	610 bp	<i>Providencia</i> sp. 16S ribosomal RNA gene, partial sequence [EU660370.1; GU193984.1; GQ417505.1].	99%
CCPB23	Proteobacteria	611 bp	<i>Stenotrophomonas</i> sp. 16S ribosomal RNA gene, partial sequence [FJ638292.1; GU254017.1; GQ417327.1; FM213389.1; EU564819.1; EU340025.1].	99%
CCPB25	Proteobacteria	609 bp	<i>Delftia</i> sp. 16S ribosomal RNA gene, partial sequence [FJ594443.1; EU707799.1; CP000884.1; AM180725.1; AY367028.1; AF538930.1].	100%
CCPB28	Actinobacteria	594 bp	Uncultured <i>Arthrobacter</i> sp. clone P4s-190 16S ribosomal RNA gene, partial sequence [GQ329251.1].	99%
CCPB31	Proteobacteria	448 bp	<i>Acinetobacter</i> sp., 16S ribosomal RNA gene, partial sequence [GU566343.1; GQ390224.1].	98%

Tabla. 14. Identificación de los miembros de la comunidad bacteriana detectada mediante técnicas independientes de cultivo.

2.3. COMPARACION DE TECNICAS DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DE CULTIVO.

Los filios a los que pertenecen las bacterias aisladas mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo (muestras CP7 y CP1, respectivamente) se reflejan en la tabla 15. Como puede observarse los porcentajes obtenidos mediante ambas modalidades fueron diferentes, como también lo fueron los géneros identificados (Fig 21). En la muestra CP7 se identificaron cepas de los géneros *Microbacterium* y *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Virgibacillus*, *Paucisalibacillus* y *Sporosarcina*. En la muestra CP1 tomada de la misma zona que la anterior, pero analizada mediante técnicas independientes de cultivo, las cepas identificadas correspondieron a los géneros *Aquabacterium*, *Citrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Providencia*, *Delftia*, *Acinetobacter* y *Arthrobacter*.

Filo	Técnicas dependientes de cultivo previo	Técnicas independientes de cultivo previo
Firmicutes	85,7%	0 %
Actinobacteria	14,3%	22,2%
Proteobacteria	0 %	77,8%

Tabla. 15. Comparación de los porcentajes correspondientes a los distintos filios bacterianos detectados mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo.

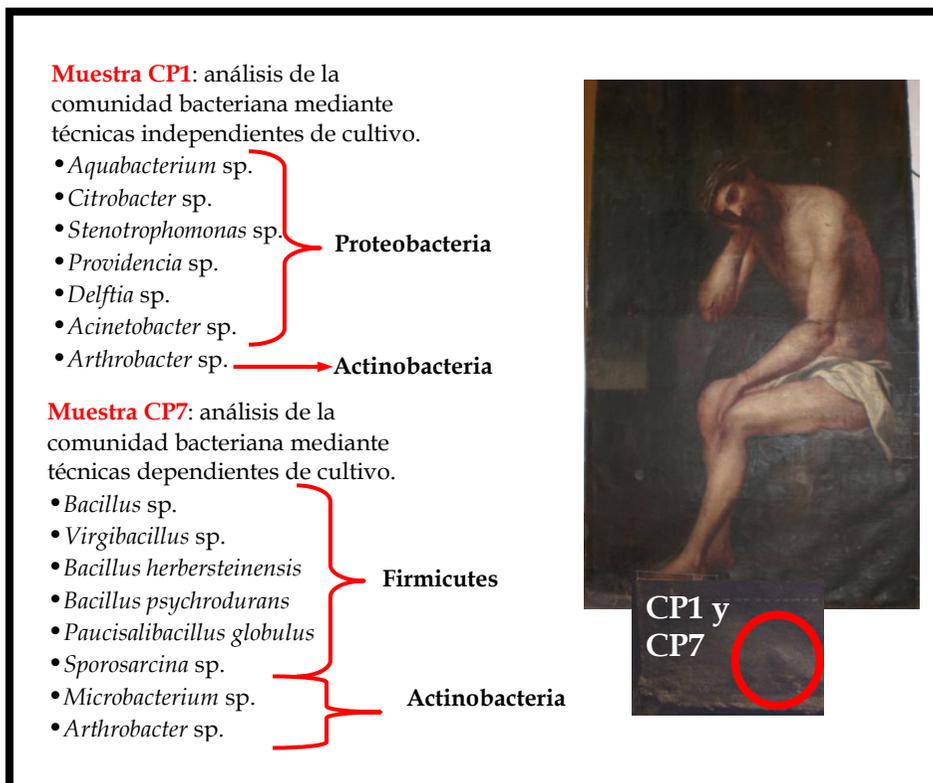


Fig. 21. Esquema en el que se muestran los diferentes géneros que resulta posible aislar a partir de las muestras CP1 y CP7, ambas tomadas en la misma zona del anverso del lienzo Cristo de la Paciencia mediante técnicas independientes y dependientes de cultivo respectivamente.

DISCUSSION

Hemos planteado esta discusión tratando, en primer lugar, los resultados obtenidos mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo, realizando finalmente una comparación entre ambas.

1. OBRA VIRGEN DE GUADALUPE.

1.1. TECNICAS DEPENDIENTES DE CULTIVO.

Los aislados bacterianos y fúngicos obtenidos a partir de las muestras tomadas empleando hisopos e inoculadas en los diferentes medios escogidos, se agruparon inicialmente en función de la morfología y apariencia mostrada por las colonias crecidas en TSA y medio agar Sabouraud-cloranfenicol respectivamente. De este modo, obtuvimos un total de 11 bacterias y 8 hongos.

A partir de las muestras tomadas en zonas con signos visibles de deterioro (VG5, VG6 y VG7) se aislaron tanto bacterias como hongos. Por el contrario, a partir de las muestras tomadas de zonas sin dichos signos (VG8 y VG9), no se consiguió el aislamiento ni de bacterias ni de hongos, lo cual lleva a pensar que dichos microorganismos podrían estar implicados en el biodeterioro de este lienzo (Capodicasa et al., 2010).

Las bacterias aisladas de la obra muestran unos valores de similitud con las depositadas en la base de datos del EMBL que varían entre un 99% y un 100%. En la mayoría de los casos coinciden con bacterias previamente cultivadas excepto una, correspondiente al aislado VG7B5 que ofrece dos posibilidades: bacteria no cultivable o *Arthrobacter* sp.

Los resultados obtenidos tras el análisis de las secuencias demuestran que, de los 11 aislados iniciales, VG6B2 y VG6B3, corresponden a la misma cepa, por lo que el número real de bacterias diferentes identificadas se reduce a 10. Pertenecen a especies de seis géneros distintos incluidos en dos filos:

- Filo **Firmicutes**. Los representantes de este filo constituyen el 70% del total de aislados identificados. Encontramos cuatro géneros, todos ellos pertenecientes al orden Bacillales: *Bacillus*, que representan el 57,1% del total de bacterias de este filo, *Sporosarcina* (14,3%), *Paucisalibacillus* (14,3%) y *Virgibacillus* (14,3%).
- Filo **Actinobacteria**. El número total de aislados pertenecientes a este filo fueron tres, lo que representa el 30% del total de bacterias. Encontramos dos géneros, ambos pertenecientes al orden Actinomycetales: *Brevibacterium* (33,5% del total de aislados de este filo) y *Arthrobacter* (66,5%).

La secuencia de los aislados VG6B2 y VG6B3, correspondientes a la cepa *Bacillus* sp. [AJ315063.1; AJ315061.1], y *Arthrobacter* sp. (VG7B3) [AJ315071.1] fueron totalmente coincidentes con las de bacterias aisladas de pinturas murales con signos de biodeterioro localizadas en la tumba de Servilia (Heyrman et al., 2001). La secuencia de *Arthrobacter* sp. (VG7B3) [GU574116.1] coincide además con la de un *Arthrobacter* aislado de materiales de construcción dañados por agua y previamente colonizados por hongos (Schäfer et al., 2010). La secuencia de *Bacillus* sp. (VG7B) coincide exactamente con una cepa previamente aislada a partir de pinturas y grabados en una cueva localizada en Ardales (Málaga, España) (Stomeo et al., datos no publicados).

El resto de las secuencias no coincidieron con secuencias de bacterias aisladas de obras de arte. No obstante, se ha comprobado que otras cepas de algunos de los géneros aislados en este estudio, se han detectado en diversos objetos artísticos. Así, *Bacillus* sp. (VG6B1) podría tratarse de *Bacillus muralis* [EU977747.1] o *simplex* [GU586306.1], especies filogenéticamente muy próximas. Se ha demostrado la presencia de ambas especies en pinturas murales (Heyrman et al., 2005); de hecho, *Bacillus muralis* recibe su nombre porque su cepa tipo se aisló a partir de pinturas murales localizadas en la iglesia Greene-Kreinsen (Alemania) y en otros estudios relacionados (Pepe et al., 2010). Una característica de *Bacillus muralis* es que tolera hasta un 7% de NaCl (Heyrman et al., 2005).

Otro caso lo encontramos en la bacteria identificada como *Virgibacillus* sp. (VG7B2). Este género se ha aislado previamente de pinturas murales (Gorbushina et al., 2004; Heyrman and Swings, 2001), y monumentos de piedra (Ettenauer et al., datos no publicados). Su crecimiento se ve favorecido por la presencia en el medio de 4% NaCl y no se inhibe hasta el 10% de sal (Heyndrickx et al., 1998).

Brevibacterium sp. se caracteriza por la producción de proteinasas extracelulares, y por ser capaz de tolerar elevadas concentraciones de sales (10 %, w/v). Especies de este género pueden encontrarse en diferentes hábitats como el suelo, la piel humana y alimentos, lo que podría indicar que su presencia se debe a una contaminación derivada del manejo del lienzo. No obstante, también han podido aislarse a partir de pinturas murales (Ripka et al., unpublished data; Pepe et al., 2010).

Al igual que los géneros anteriores, el aislado VG7B4, correspondiente con *Paucisalibacillus globulus*, es capaz de crecer a concentraciones entre 0 y 8% de NaCl (crecimiento óptimo al 1% w/v de NaCl). Puede asimilar celobiosa, en cuyo metabolismo se generan ácidos (Nunes et al., 2006). Previamente se ha aislado a partir de monumentos con eflorescencias salinas (Ettenauer et al., datos no publicados).

La cepa VG7B5, identificada también como *Arthrobacter* sp. parece ser psicrotolerante y halotolerante (NaCl 0-10%) (Ganzert et al., 2010). *Arthrobacter* es una bacteria aislada frecuentemente a partir de una enorme variedad de obras de arte como pinturas murales (Petushkova and Lyalikova, 1986; Rölleke et al., 1996; Gurtner et al., 2000; Heyrman and Swings, 2001; Gorbushina et al., 2004;), frescos (Lazar, I. 1971), vidrieras (Rölleke et al., 1999; Marvasi et al., 2009), pintura al óleo sobre tabla (Santos et al., 2010) y monumentos construidos en piedra (Suihko et al., 2007; Jroundi et al., 2010).

La secuencia de otra bacteria identificada como *Bacillus* sp. (VG6B4), podría corresponderse, a tenor de la comparación realizada, con 3 cepas diferentes: una bacteria psicrotrofa productora de proteasas procedente de ambientes fríos [FN870069.1] (Salwan and Kasana, unpublished), una bacteria capaz de degradar plásticos [AB360809.1] (Hu and Kawai, unpublished) o una bacteria productora de lipasas [GQ463238.1] (Kumar et al., unpublished).

Finalmente, la bacteria identificada como *Sporosarcina* sp. (VG7B6) se caracteriza por ser capaz de formar endosporas, por lo que es muy resistente a condiciones ambientales adversas.

En relación a los hongos, los valores de similitud entre nuestras secuencias y las depositadas en la base de datos del EMBL varían entre un 96% y un 100%. Todos los aislados coinciden con hongos previamente cultivados en condiciones de laboratorio.

Los resultados obtenidos tras el análisis de las secuencias demuestran que, de los 8 aislados iniciales, VG7H3 y VG5H1 al igual que VG7H1 y VG7H2 por otro lado, corresponden a la misma cepa, por lo que el número de hongos diferentes se reduce a 6. Se trata de cinco géneros incluidos en dos filos.

- **Filo Ascomycota** representan el 84% del total de la comunidad fúngica de la obra. A su vez, pertenecen a dos órdenes distintos: Eurotiales y Pleosporales. Dentro del orden Eurotiales, encontramos dos especies diferentes del género *Penicilium*, que representan el 40% del filo, y *Emericella* y *Eurotium*, cada uno de los cuales representa el 20% de individuos de dicho filo. Dentro del orden Pleosporales, el único aislado pertenece al género *Ulocladium* que representa el 20% restante.
- **Filo Zygomycota**. Dentro de este filo encontramos un único individuo perteneciente al orden Mucorales, el género *Mucor*, que representa el 16% del total de la comunidad fúngica.

El género *Penicillium* es el que representa mayor porcentaje dentro de la comunidad de esta obra, podemos encontrar distintas especies aisladas con frecuencia de obras de arte deterioradas como pinturas murales,(Sampò et al, 1989; Nugari et al., 1993; Guglielminetti et al., 1994; Berner et al., 1997; Gorbushina et al., 2004; Piñar et al., 2009; Pepe et al., 2010), óleos sobre tabla (Santos et al., 2009; Capodicasa et al., 2010), parte interior los muros de monumentos construidos en piedra (Suihko et al., 2007), lienzos (Vukojević and Ljaljević Grbić, 2010), óleos sobre lienzo (Inoue and Koyano, 1991), papel (Michaelsen et al., 2009; 2010) y vidrio (Krumbein et al., 1991).

Otro hongo que también ha sido aislado previamente de gran variedad de objetos artísticos es *Eurotium* sp. (VG7H5); se ha encontrado en pinturas murales (Guglielminetti et al., 1994), vidrio (Krumbein et al., 1991), óleo sobre tabla (Santos et al., 2009) y papel (Michaelsen et al., 2009; 2010).

Mucor sp. y *Ulocladium* sp. se encuentran con menor frecuencia en lienzos (Vukojević and Ljaljević Grbić, 2010) pinturas murales,(Nugari et al., 1993; Guglielminetti et al., 1994) o vidrio (Krumbein et al., 1991), mientras que el género *Emericella* sp. sólo se ha detectado en pinturas murales,(Guglielminetti et al., 1994).

Hongos filamentosos tales como *Penicillium* sp. y *Mucor* sp. se encuentran de forma habitual en el aire, siendo transportados por éste (Frisvad and Gravesen, 1994; Hyvärinen et al., 2002), por lo que podrían considerarse como simples contaminantes. Sin embargo, los hongos filamentosos son capaces de resistir largos periodos de desecación en los que no existe agua disponible, elevadas concentraciones de sales e incluso la presencia de determinados metales que pueden formar parte de la obra al emplearse en muchos pigmentos (Gallo, F. 1985; Zotti and Ferroni, 2008; Zyska, B. 1997), lo que podría llevarnos a considerar su implicación en el deterioro del óleo sobre lienzo Virgen de Guadalupe.

En el caso de *Penicillium* sp, se ha demostrado su habilidad para crecer a valores de actividad de agua por debajo de 0,8 (Nielsen, 2003), así como su capacidad para emplear como nutrientes materiales frecuentes en restauración (Sampo & Luppi Mosca, 1989). Se trata de un organismo extremadamente resistente que requiere para vivir cantidades ínfimas de materia orgánica. Incluso es capaz de crecer en agua destilada libre de nutrientes, como demostraron Stern et al. (1956). Estos hechos nos llevan a considerar su implicación en el biodeterioro.

Otro hongo identificado, *Eurotium* sp., es moderadamente xerófilo y representa la fase sexual (teleomorfo) de las especies de *Aspergillus* sp. Normalmente, *Eurotium* aparece relacionado con *Aspergillus* cuando éste último ha estado creciendo durante largo tiempo y la disponibilidad de nutrientes es suficiente como para que se produzca la transformación a su fase sexual. Esto hace pensar que durante cierto tiempo, el anamorfo de *Eurotium* debió encontrarse sobre la obra disfrutando de abundantes recursos para nutrirse.

Se ha demostrado que los hongos son capaces de utilizar como sustratos las pinturas y sus componentes, como el aceite de linaza (Ross, 1969). Sin embargo, no debemos olvidar que de la misma manera, también pueden crecer sobre una superficie pintada sin necesidad de degradar los constituyentes de la obra (Broome and Lowrey, 1970) gracias a su habilidad para obtener nutrientes a partir de los gases atmosféricos, de partículas depositadas sobre el lienzo como contaminantes atmosféricos o polvo, o incluso de células muertas de otros microorganismos, particularmente cuando el porcentaje de humedad ronda el 75%. Una vez que el hongo consigue introducirse y afianzarse sobre la superficie pintada del lienzo, con el tiempo va atrapando mayor cantidad de polvo y suciedad, que utilizará para alimentarse (Ross, 1969). Independientemente de que este hongo sea o no capaz de emplear los materiales constitutivos de la obra como fuente de carbono, al emplear otras sustancias se generarán, fruto de su metabolismo, distintos ácidos orgánicos o inorgánicos capaces de dañar la obra mediante procesos de disolución (Lugauskas et al., 2003) o quelación (Warscheid and Braams, 2000), tal y como se comentó en el capítulo de introducción.

Nuestros resultados son concordantes con los obtenidos por diversos autores en estudios previos, y ponen de manifiesto que las bacterias que se aíslan con más frecuencia de este tipo de muestras pertenecen al género *Bacillus* mientras que en el caso de los hongos corresponden al género *Penicillium*.

En general, es muy frecuente encontrar miembros del género *Bacillus* o relacionados, en distintas obras de arte biodeterioradas tales como pinturas murales (Gorbushina et al., 2004; Altenburger et al., 1996; Ciferri, 1999; Gonzalez et al., 1999; Heyrman et al., 2001; Gurtner et al., 2000; Lazar et al., 1971; Pepe et al., 2010; Radaelli et al., 2004), pinturas al

óleo sobre tabla (Capodicasa et al., 2010), vidrio (Marvasi et al., 2009) o papel (De Paolis and Lippi, 2008; Michaelsen et al., 2010) debido a su capacidad de formar endosporas. Las endosporas son estructuras metabólicamente inactivas, extremadamente resistentes a condiciones ambientales adversas, como pueden ser elevadas concentraciones de sales, ausencia de nutrientes o niveles bajos de humedad. Otro género frecuente es *Arthrobacter*, cuyos representantes son ubicuos, oligotrofos facultativos (Laiz et al., 2002), bastante resistentes a la desecación y a la falta de nutrientes, y capaces de degradar moléculas de difícil degradación tales como herbicidas y pesticidas.

A modo de resumen, podemos decir que la comunidad microbiana de la obra VG obtenida mediante técnicas dependientes de cultivo, representada por los géneros mencionados, se caracteriza por la presencia mayoritaria de bacterias formadoras de endosporas, picrófilas o psicotróficas y halotolerantes, lo que les confiere gran resistencia, capacidad para soportar bajas temperaturas y tolerancia a concentraciones relativamente altas de NaCl. Características todas ellas, idóneas para subsistir en hábitat inhóspitos como es el caso que nos ocupa. En cuanto a la comunidad fúngica podemos llegar a la misma conclusión ya que se da el predominio de especies xerófilas.

1.2. TECNICAS INDEPENDIENTES DE CULTIVO.

Si nos fijamos en los perfiles de DGGE mostrados en la **Fig. 10** (apartado 1.2.1. de Resultados) podemos constatar que los patrones de bandas obtenidos a partir del ADN total extraído de las muestras VG1 y VG3 (tomadas de zonas del anverso con signos de deterioro) tan sólo cuentan con cuatro y seis bandas dominantes respectivamente, cuya intensidad es bastante débil, sobre todo en el caso de la muestra VG1. Esto indicaría que la comunidad bacteriana correspondiente a estas dos muestras no es muy compleja. Por el contrario, al analizar los perfiles de DGGE generados a partir de las muestras VG2 y VG4 (tomadas de otras zonas del anverso con signos de deterioro), observamos que están constituidos por una serie de bandas dominantes (7 y 10 respectivamente) además de otras de intensidad más débil. De este modo, los patrones de ambas muestras revelan la presencia de complejas poblaciones bacterianas.

En cuanto a los hongos, analizando los perfiles de DGGE mostrados en la **Fig. 11** (apartado 1.2.1. de Resultados), podemos observar cómo los patrones de bandas obtenidos a partir del ADN total extraído de las muestras VG1, VG2 y VG3 consisten en un grupo de bandas débiles difíciles de diferenciar unas de otras entre las que sólo podemos encontrar dos o tres dominantes. Por el contrario, a partir del ADN total extraído de la muestra VG4 se obtiene un patrón de bandas más claro, con 4 bandas dominantes.

En lo referente a los clones (**Fig. 12** de Resultados), la banda correspondiente al clon CVG4B27 no coincide con la posición de ninguna banda del patrón generado mediante DGGE a partir del extracto de ADN total, al menos a simple vista. Podría deberse a que se trata de una cepa con escasa representación en la comunidad microbiana, por lo que pasaría desapercibida en el patrón de bandas original, dada su escasa intensidad.

Los valores de similitud entre la secuencia de los insertos contenidos por los distintos clones y las depositadas en la base de datos del EMBL varían entre un 96% y un 100%. La mayoría corresponden a bacterias previamente cultivadas excepto las de los clones CVG4B34 y CVG4B44.

Los resultados obtenidos tras el análisis de las secuencias demuestran que sus integrantes pertenecen a especies de seis géneros distintos incluidos en dos filos: Proteobacteria y Actinobacteria.

- El 60% de los miembros pertenecen al filo Proteobacteria. Dentro de este filo, el 83,3% se situarían en la clase de las Gammaproteobacterias, mientras que tan sólo el 16,7% lo haría en el grupo de las Betaproteobacterias.
- Un 20% corresponden a especies del filo Actinobacteria, encontrándose dos géneros: *Microbacterium* y *Arthrobacter*, cada uno representando el 50% del total de miembros de este filo.
- El 20% restante lo constituyen miembros del filo Firmicutes, clase Bacilli.

La secuencia de los insertos no permite llegar a una identificación a nivel de género en varios casos (CVG4B1, 34, 36 y 40); no obstante, proporcionan suficiente información para conocer el filo al que pertenecen estos miembros de la comunidad bacteriana, tratándose de Proteobacteria y Firmicutes.

El género *Aeromonas* (CVGB2) se caracteriza por su habilidad de secretar una gran variedad de enzimas asociadas con patogenicidad y adaptación al medio ambiente, entre las que se incluyen lipasas, proteasas y quitinasas (Pemberton et al., 1997). Previamente se ha detectado su presencia en pinturas murales (Ripka et al., unpublished data). Gracias a su gran variedad de actividades enzimáticas podría desempeñar un papel importante en los procesos de biodeterioro. Además, al igual que los integrantes del género *Microbacterium* (CVG18) son psicrotrofos.

Stenotrophomonas sp. (CVGB27) a pesar de tener un reducido espectro de nutrientes a emplear como fuente de carbono, es capaz de utilizar la celobiosa (procedente de la celulosa presente en el lienzo de lino), como única fuente de energía para su crecimiento (Palleroni and Bradbury, 1993). Miembros de este género se han aislado a partir de manuscritos de lino (Michaelsen et al., 2010) y de monumentos de piedra (Jroundi et al., 2010).

Los miembros del género *Pseudoalteromonas* (CVGB38) son quimioorganotrofos. Todas las especies de este género son halófilas, requiriendo agua de mar para su crecimiento (Gauthier et al., 1995).

Finalmente, el género *Arthrobacter* (CVGB33) se relaciona frecuentemente con objetos artísticos deteriorados, como ya se ha comentado.

Hasta la fecha, los géneros *Pseudoalteromonas* y *Microbacterium* no habían sido detectados en otros estudios relacionados con objetos del patrimonio artístico y cultural, al menos hasta donde alcanzan nuestros conocimientos.

En lo referente a la comunidad fúngica, los valores de similitud entre la secuencia de los insertos contenidos por los distintos clones y las depositadas en la base de datos del EMBL varían entre un 98% y un 100%. Todas las secuencias corresponden a hongos previamente cultivados.

Los resultados obtenidos a cerca de la diversidad fúngica de la muestra VG4, demuestran que todos sus integrantes pertenecen al filo Ascomycota. Dos de ellos, que representan el 66,7% del total, pertenecen al orden Saccharomycetales; el tercer aislado (33,3%), pertenece al orden Pleosporales. Los integrantes del orden Saccharomycetales se identificaron como *Candida cellae* (CVGH67) y *Pichia pastoris* (CVGH68), ambas levaduras, con poca o ninguna relación con el deterioro de lienzos. Por el contrario, dentro del orden Pleosporales se consiguió la identificación de *Alternaria* sp. (CVGH78) considerado junto a *Aspergillus* sp., uno de los principales agentes de biodeterioro puesto que producen celulasa que contribuye a la colonización inicial de la obra por la degradación de la celulosa presente en el lienzo (Radaelli, et al., 2004).

1.3. COMPARACION ENTRE LAS TECNICAS DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DE CULTIVO.

Para comparar los resultados obtenidos mediante las dos modalidades de técnicas (dependientes e independientes de cultivo), se seleccionaron las muestras VG7 y VG4 procedentes de la misma zona del anverso de esta obra. La observación de la diversidad de las comunidades microbianas de ambas muestras bacterianas y fúngicas, reveló diferencias importantes en cuanto a los integrantes de las mismas se refiere.

Como se acaba de comentar, empleando técnicas dependientes de cultivo se detectan diferentes géneros pertenecientes a los filos Firmicutes y Actinobacteria, siendo los miembros del filo Firmicutes los que se consiguen aislar en mayores porcentajes. No se consigue aislar ninguna proteobacteria utilizando esta metodología. Por el contrario, las

técnicas independientes de cultivo permiten detectar a los componentes de este filo, de hecho la mayoría de bacterias identificadas son proteobacterias. En cuanto al filo Firmicutes, sus representantes se detectan en proporciones mucho más bajas que en el caso anterior. Solo los miembros del filo Actinobacteria son detectados en porcentajes similares, mediante ambos procedimientos.

Analizando la **Fig.15** se puede observar cómo tan sólo las bandas generadas mediante DGGE a partir del ADN procedente de algunos aislados bacterianos de la muestra presentan la misma movilidad electroforética y, por tanto, se corresponden con bandas del perfil de DGGE generado a partir del extracto de ADN total obtenido de la muestra VG4. Se trata de las banda correspondientes a la muestra CVGB33, identificada como *Arthrobacter* sp. lo que demuestra que esta bacteria puede aislarse utilizando ambas metodologías. En este sentido, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Gurtner et al. (2000). Lo mismo ocurre en el caso de una bacteria identificada mediante técnicas independientes de cultivo como un miembro del filo Firmicutes (CVGB40), cuya identificación a nivel de género puede inferirse mediante la comparación entre ambos tipos de técnicas. De este modo, si observamos la **Fig. 15**. comprobaremos que la banda 3 de la primera calle del gel, posee la misma movilidad electroforética y por tanto la misma posición en el gel que la banda generada por la bacteria identificada como *Paucisalibacillus globulus*, previamente aislada mediante técnicas dependientes de cultivo. Así, podríamos concluir que el miembro del filo Firmicutes al que corresponde la banda 3 es *Paucisalibacillus globulus*.

El porcentaje de géneros del filo Firmicutes detectados mediante técnicas dependientes de cultivo es mucho mayor que el obtenido mediante técnicas independientes. Esto podría explicarse admitiendo que el protocolo de extracción de ADN total empleado no resulte eficaz a la hora de extraer el ADN de las endosporas bacterianas, probablemente debido a la mayor resistencia que ofrecen dichas estructuras con respecto a las células vegetativas. Como consecuencia, los únicos representantes del filo Firmicutes que se pueden detectar mediante técnicas independientes de cultivo serán los que se encuentren en forma vegetativa y, por tanto, metabólicamente activos. Por el contrario, las técnicas dependientes de cultivo nos llevarían sobreestimar este grupo de bacterias (Heyrman et al., 1999; Laiz et al., 2003a).

Respecto a los miembros del filo Proteobacteria, resulta imposible detectarlos empleando técnicas dependientes de cultivo pero sí se detectan mediante técnicas independientes, lo que podría indicar que en el momento en que se tomaron las muestras se encontraban como bacterias VBNC (viables pero no cultivables) o bien, que requieren otros medios de cultivo para conseguir su aislamiento. Las bacterias no formadoras de endosporas, Gram-negativas en su mayoría, son capaces de entrar en un estado de latencia en el que resulta imposible recuperarlas mediante cultivo, lo que se conoce como VBNC.

Respecto al análisis de las poblaciones fúngicas, mediante técnicas dependientes de cultivo es posible aislar diferentes géneros pertenecientes al filo Ascomycota, del orden Eurotiales en un 85,7%, y al filo Zygomycota, aunque éste último en una proporción mucho menor. Empleando técnicas independientes de cultivo también se detectan ascomicetos, pero que en este caso pertenecientes al orden Saccharomycetales (66,7%), tales como *Candida cellae* y *Pichia Pastoris* y Pleosporales (*Alternaria* sp.33,3%). Esto puede deberse a que los miembros del orden Saccharomycetales se encuentran en una concentración demasiado baja como para conseguir su aislamiento, por lo que resulta más fácil su detección mediante las técnicas independientes. El hecho de no poder aislar miembros del orden Eurotiales ni del Filo Zygomycota mediante esta modalidad podría deberse a que se encuentran en forma de esporas sobre el lienzo.

2. OBRA CRISTO DE LA PACIENCIA.

2.1. TECNICAS DEPENDIENTES DE CULTIVO.

Los aislados bacterianos y fúngicos obtenidos a partir de las muestras tomadas empleando hisopos e inoculadas en los diferentes medios, se agruparon inicialmente en función de la morfología y apariencia mostrada por las colonias. De este modo, obtuvimos un total de 16 bacterias y 4 hongos diferentes.

A partir de las muestras con signos visibles de biodeterioro (CP6 y CP7) consiguieron aislarse bacterias y hongos. La muestra CP6 corresponde al reverso del cuadro, la CP7 al anverso. Por el contrario, a partir de las muestras tomadas en zonas sin estos signos (CP3, CP4, reverso, y CP5, anverso), solo se aisló una bacteria. Dado que no aparece diversidad microbiana alguna podemos considerar que se trata de un contaminante accidental.

Como ocurre en la obra anterior, la presencia de bacterias y hongos en zonas con signos de biodeterioro, hace pensar que, los microorganismos aislados pueden estar implicados en el biodeterioro de los lienzos (Capodicasa et al., 2010)

Basándonos en los patrones de bandas generados mediante RAPD, las distintas bacterias aisladas pueden agruparse en 15 cluster y los hongos en 3. A partir de aquí, se eligió una cepa representativa de cada grupo para secuenciar e identificar filogenéticamente. Las secuencias obtenidas se compararon con otras previamente depositadas en la base de datos del EMBL mediante la herramienta BLAST. Los valores de similitud entre nuestras secuencias y las depositadas en esta base variaron entre un 99% y un 100% para los aislados bacterianos, y entre un 96% y un 100% para los hongos. La mayoría de aislados correspondieron con bacterias u hongos previamente cultivados excepto la cepa CP7B10 que se corresponde con la secuencia de un clon no cultivado.

En cuanto a la comunidad bacteriana, los resultados tras el análisis de las secuencias demostraron que, de los 16 aislados iniciales, CP6B3 y CP7B5 eran la misma cepa de *Virgibacillus* sp. Y CP7B4 y CP7B11 el mismo *Paucisalibacillus globulus*, por lo que el número de bacterias distintas se redujo a 14, pertenecientes a especies de seis géneros incluidos en dos filos:

- **Filo Firmicutes**, orden Bacillales. Representa el 85.7% del total de bacterias de esta obra. Entre los aislados, encontramos los géneros:

Bacillus, que representa el 58,4% de las bacterias del filo, *Sporosarcina* (25%), *Paucisalibacillus* (8,3%) y *Virgibacillus* (8,3%).

- **Filo Actinobacteria**, orden Actinomycetales. Fueron 2 los aislados de este filo, lo que representa el 14,3% del total de las bacterias aisladas del lienzo. Se trata de los géneros *Microbacterium* y *Arthrobacter*. Cada uno representa el 50% del total de aislados de este filo.

Tan solo las secuencias de dos bacterias coincidieron con las de bacterias aisladas previamente en estudios relacionados con biodeterioro de obras de arte. Se trata de *Bacillus psychrodurans*, aislado previamente en la tumba Etrusca de Mercareccia (Sprocati et al., 2007), y de *Bacillus* sp., previamente aislado de pinturas murales con signos de biodeterioro localizadas en la tumba de Servilia (Heyrman et al., 2001).

El resto de secuencias bacterianas no mostraron coincidencia alguna.

La mayoría de bacterias aisladas son géneros relacionados con *Bacillus* sp., frecuentemente aislados de diferentes tipos de obras de arte con signos de biodeterioro como se comentó al hablar de la comunidad bacteriana presente en la obra Virgen de Guadalupe

En cuanto a los hongos, los valores de similitud entre nuestras secuencias y las depositadas en la base de datos del EMBL se encuentran entre el 96% y el 100% y en todos los casos coinciden con las de otros géneros previamente cultivados.

La comunidad fúngica obtenida mediante técnicas dependientes de cultivo, resultó ser muy pobre puesto que tan sólo se consiguieron aislar a partir de la muestra CP7. Tras el análisis de las secuencias, se comprobó que todos los aislados pertenecían al mismo género: *Penicillium* incluido en el filo Ascomycota, orden Eurotiales. Como se comentó en la discusión de la obra Virgen de Guadalupe, el género *Penicillium*, incluye distintas especies con frecuencia aisladas a partir de obras de arte deterioradas.

De este modo, los resultados obtenidos referentes a la estructura de las comunidades microbianas de esta obra, empleando técnicas dependientes de cultivo concuerdan con los obtenidos en estudios previos así como con los resultados del lienzo Virgen de Guadalupe y ponen de manifiesto nuevamente que las bacterias más comunes aisladas a partir de obras de arte son del género *Bacillus* mientras que los hongos más frecuentes pertenecen al género *Penicillium*.

Conocer los principales hábitats y las características morfológicas y fisiológicas de las distintas bacterias y hongos aislados, nos ayudará a entender las posibles causas de su presencia en la obra estudiada así como su posible participación en el biodeterioro de la misma (Abrusci, 2005). El 85,7% de bacterias aisladas corresponde a especies relacionadas con el género *Bacillus*, es decir, bacterias capaces de formar endosporas. El 14,3 % restante corresponde a actinobacterias, entre las que encontramos el género *Arthrobacter* que se caracteriza porque sus representantes son ubicuos, oligotrofos facultativos (Laiz et al., 2002), bastante resistentes a la desecación y falta de nutrientes, y capaces de degradar moléculas de difícil degradación (herbicidas, pesticidas, etc). Ambos grupos comparten tanto la capacidad de ser resistentes a condiciones ambientales adversas así como la de degradar una amplia variedad de sustratos (Claus and Berkeley, 1986).

Dentro de los aislados fúngicos, la total dominancia del género *Penicillium* puede explicarse por su ubicuidad, la amplia variedad de actividades enzimáticas que suelen poseer y la producción de esporas (Gorbushina et al., 2004).

2.2. TECNICAS INDEPENDIENTES DE CULTIVO.

Como se explicó en Resultados, tras la extracción del ADN total de las muestras CP1 y CP2, sólo se obtuvo amplificación usando cebadores específicos del ADNr 16S de bacterias. Al no conseguir amplificar las regiones ITS de hongos, no fue posible analizar la comunidad fúngica.

Observando el perfil de DGGE obtenido a partir del ADN total extraído de la muestra CP2, encontramos tres bandas dominantes, lo que indica una comunidad bacteriana poco compleja. Por el contrario, al analizar el perfil obtenido de la muestra CP1, observaremos que está constituido por 4 bandas dominantes, además de otras de intensidad más débil lo que indica la presencia de una comunidad mas compleja que la detectada en la muestra anterior o lo que es lo mismo con mayor diversidad. Consecuentemente, se eligió la muestra CP1 para elaborar una genoteca de clones que contuviera fragmentos del ADNr 16S de las bacterias presentes en la muestra. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el apartado anterior ya que fue en la muestra CP7, procedente de la misma zona que CP1 donde se encontró la comunidad microbiana mas abundante y diversa.

Las bandas correspondientes a los clones CCP1B31, CCP1B18, CCP1B14 y CCP1B28 no aparecen, al menos a simple vista, en el patrón generado a partir del extracto de ADN total. Podría deberse a que estos clones representan cepas poco abundantes en la comunidad microbiana, por lo que originarían bandas de muy baja intensidad que podrían pasar desapercibidas.

Los valores de similitud entre la secuencia de los insertos contenidos en los distintos clones y las depositadas en la base de datos del EMBL oscilan entre el 96% y el 100%. La mayoría de ellas corresponden a bacterias previamente cultivadas excepto las de los clones CCP1B2 y CCPB28, que son coincidentes con cepas de *Aquabacterium* sp. y *Arthrobacter* sp. no cultivadas previamente en condiciones de laboratorio.

En lo que se refiere a la diversidad bacteriana de la muestra, los resultados obtenidos tras el análisis de las secuencias demuestran que sus integrantes pertenecen a especies de siete géneros distintos incluidos en dos filos:

- **Filo Proteobacteria.** Los miembros de la comunidad bacteriana de este filo representan el 77,8% del total de la comunidad y están incluidos en cuatro órdenes distintos: Burkholderiales (*Aquabacterium* sp., 11,1% del total de proteobacterias; *Delftia* sp., 11,1%), Enterobacteriales (*Citrobacter* sp., 11,1%; *Providencia* sp, 11,1%), Xanthomonadales (*Stenotrophomonas* sp., 22,2%) y Pseudomonadales (*Acinetobacter* sp., 11,1%).
- **Filo Actinobacteria.** Las bacterias englobadas en este filo representan el 22,2% del total de la comunidad, perteneciendo todos al orden Actinomycetales y, dentro de éste, al género *Arthrobacter*.

Como se mencionó en la obra anterior, el género *Arthrobacter* está muy ligado al biodeterioro de objetos artísticos.

El género *Delftia* se ha encontrado en monumentos de piedra (Ettenauer et al., datos no publicados; Jroundi et al., 2010). *Acinetobacter* sp. se ha detectado también en monumentos de piedra (Piñar et al., 2009; 2010), óleos sobre tabla (Capodicasa et al., 2010), pinturas murales (Rölleke et al., 1996), y en un manuscrito realizado en lino (Michaelsen et al., 2010).

En cuanto al género *Stenotrophomonas* se ha detectado su presencia en el manuscrito citado anteriormente y en monumentos de piedra (Jroundi et al., 2010).

Los tres clones restantes (CCP1B2, CCP1B11 y CCP1B18) mostraron secuencias correspondientes a *Aquabacterium* sp., *Citrobacter* sp. y *Providencia* sp. Estos géneros no habían sido detectados, hasta ahora, en otros estudios relacionados con objetos del patrimonio artístico y cultural, al menos hasta donde alcanzan nuestros conocimientos.

Como se comentó previamente en las técnicas dependientes de cultivo, la presencia *Arthrobacter* sp. se relaciona con el hecho de ser microorganismos oligotrofos facultativos y presentar gran resistencia a condiciones de falta de nutrientes y disponibilidad de agua; incluso han sido propuestos por Petushkova y Lyalikova (1986) como colonizadores primarios en pinturas murales.

En cuanto a *Acinetobacter* sp., se trata de microorganismos ubicuos, aerobios y heterótrofos (Baumann, 1968), capaces de utilizar gran cantidad de fuentes de carbono orgánicas. Aún no se conoce a través de qué mecanismos podrían llevar a cabo los miembros del género *Acinetobacter* el proceso de biodeterioro; sin embargo, sí es conocida su capacidad de usar una amplia variedad de compuestos tales como alcoholes alifáticos, aminoácidos, ácidos grasos, hidrocarburos no ramificados y azúcares entre los que se incluye la glucosa, arabinosa, celobiosa, galactosa, manosa, ribosa y xilosa, via aldosa deshidrogenasa (Baumann, 1968; Juni, 1978).

Las otras cepas encontradas han sido *Delftia* sp., cuyos miembros muestran actividad lipasa y son capaces de crecer activamente en medios que contengan ácidos orgánicos (que pueden proceder del metabolismo de hongos), peptona y carbohidratos a excepción de la glucosa (Wen et al., 1999), y *Stenotrophomonas* sp. que, a pesar de tener un espectro muy reducido de nutrientes de los que poder alimentarse, es capaz de utilizar la celobiosa (procedente de la glucosa presente en el lienzo de lino) como única fuente de carbono y energía para su crecimiento (Palleroni and Bradbury, 1993).

El género *Citrobacter*, se caracteriza por estar formado por bacterias Gram-negativas de la familia Enterobacteriaceae, patógenos oportunistas. Son capaces de emplear citrato como única fuente de carbono, producto generado en el ciclo de Krebs (Farmer, 1981). Determinadas cepas de este género son capaces de decolorar tintes empleados en textiles (Jang et al., 2007).

2.3. COMPARACION ENTRE LAS TECNICAS DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DE CULTIVO.

Al igual que en el caso anterior se ha realizado una comparación de los resultados obtenidos mediante las metodos dependientes e independientes de cultivo, en cuanto a la composición de las comunidades existentes en la obra pictórica. Se han seleccionado las muestras CP7 y CP1 estudiadas anteriormente, procedentes de la misma zona del cuadro. También en esta ocasión hemos encontrado diferencias

Como se ha detallado en los apartados anteriores, mediante técnicas dependientes de cultivo se han detectado diferentes géneros bacterianos pertenecientes a los filos Firmicutes y Actinobacteria. Las técnicas independientes también detectan a los miembros del filo Actinobacteria pero no a los de Firmicutes. Sí es posible detectar distintos géneros del filo Proteobacteria, lo cual no se consigue mediante cultivo previo.

Únicamente resulta posible identificar mediante ambos tipos de técnicas las cepas del género *Arthrobacter*. En un estudio previo, Gurtner et al. (2000) también consiguieron aislar este género usando ambos métodos.

Como se ha comprobado en otros estudios (Heyrman et al., 1999), resulta difícil determinar si en el momento de la toma de muestras los microorganismos se encuentran metabólicamente activos o formando estructuras de resistencia como endosporas bacterianas y esporas fúngicas. Los principales representantes del filo Firmicutes que pueden aislarse pertenecen al género *Bacillus*, o bien, a géneros relacionados. Sin embargo, mediante técnicas independientes no se consiguió detectar ningún miembro de este filo por encontrarse probablemente en forma de endosporas.

Si se hubiesen encontrado como células vegetativas, el método empleado para la extracción no encontraría impedimentos a la hora de extraer su ADN y, por tanto, su presencia en la obra se verificaría también mediante esta modalidad. No obstante, considerando los hábitats y las características fisiológicas, previamente comentadas, de los integrantes de la comunidad microbiana de este lienzo, si se dieran las condiciones apropiadas, las esporas podrían germinar, lo que supondría un serio riesgo de deterioro para la obra.

Por otro lado, al igual que ocurre en la obra Virgen de Guadalupe, los integrantes del filo Proteobacteria sólo pueden detectarse mediante técnicas independientes de cultivo, lo que indica que en el momento de la toma de muestras se encontraban en estado de latencia en forma de bacterias VBNC. Otra opción sería la necesidad de requerimientos nutricionales más específicos lo que les impediría crecer e los medios de cultivo que habitualmente se emplean en este tipo de muestreos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios (Laiz et al. 2003a).

En cuanto a los representantes del filo Actinobacteria, el hecho de ser los únicos capaces de aislarse mediante ambos métodos implica que son los únicos representantes de la comunidad que podrían encontrarse en forma vegetativa.

El estudio realizado en las dos obras pictóricas evidencia que la combinación de las técnicas dependientes e independientes de cultivo, es la metodología más adecuada, ya que permite detectar a la mayoría de los miembros que conforman las comunidades microbianas presentes en los lienzos, sugerencia realizada también por autores tales como Busse et al. 1996; Laiz et al., 2003a; Ettenauer et al., 2010) que indican la necesidad de emplear ambos tipos de técnicas de forma complementaria dada la diferencia de resultados obtenidos con cada una de ellas. Además, conocer los principales géneros que las suelen integrar, facilita la elección de los medios de cultivo más apropiados para futuros muestreos, en función de los microorganismos obtenidos en este estudio.

En cuanto a la localización de las comunidades microbianas (anverso y reverso de los lienzos) nuestros resultados demuestran que son mucho más abundantes y variadas las existentes en el anverso de las obras, es decir sobre la superficie pintada de las mismas (muestras VG5, VG6 y VG 7 y CP7).

Las biopelículas superficiales, es decir, las formadas por el crecimiento microbiano sobre superficies expuestas al aire, como es el caso de los óleos sobre lienzo, constituyen un nicho ecológico único en el que sólo aquellos microorganismos adaptados a condiciones de limitación en la disponibilidad de agua son capaces de sobrevivir. Aspectos importantes por su influencia en la formación de estas biopelículas son, la ubicación de la obra, las condiciones de almacenamiento o los factores ambientales que la rodean.

Un caso particular son los interiores de edificios de tipo conventos o monasterios, no abiertos al público, ya que constituyen ambientes cerrados y relativamente estables (Gorbushina et al., 2004). El aire del interior de estos edificios suele contener gran cantidad de microorganismos en suspensión, sobre todo esporas de hongos de diversos géneros, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor* o *Penicillium* y bacterias formadoras de endosporas, debido a sus escasos requerimientos nutricionales lo que les permite crecer empleando como fuente de carbono distintas partículas o contaminantes atmosféricos así como el agua de condensación (Nugari et al, 1993).

Los oleos estudiados, proceden de la iglesia convento de San Antón y de su superficie se han aislado fundamentalmente bacterias del género *Bacillus*, Actinobacterias y hongos de los géneros *Penicillium*; *Eurotium* y *Emericella*, teleomorfos de *Aspergillus* o *Mucor*, todos ellos presentes en el aire. Podemos aventurarnos a decir por tanto que, el hecho de encontrar mayor diversidad en las comunidades del anverso de los lienzos es debido a la exposición de esta superficie al aire circundante.

CAPITULO III

Biodeterioro

MATERIAL Y METODOS

1. CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS.

El análisis de las distintas actividades enzimáticas presentes en las bacterias y hongos aislados, se llevó a cabo mediante el uso de las Galerías API® ZYM (Biomérieux).

1.1. Preparación de suspensiones bacterianas y fúngicas e inoculación de las galerías API® ZYM.

Las suspensiones, se prepararon a partir de cultivos crecidos previamente en TSB o PDB (caldo patata dextrosado) e incubados a 28°C durante 24h. A continuación, se transfirió 1ml de cultivo a tubos de microcentrífuga y se centrifugó 10 minutos a 13000 xg. El sobrenadante se desechó y se lavó con 1 ml de agua destilada. Finalmente, el pellet se resuspendió en 1 ml de agua ultrapura.

Cada microtubo se inoculó con 65 µl de las suspensiones celulares de bacterias y de hongos, y la galería se incubó durante 4 horas 30 minutos a 37 °C.

1.2. Lectura de los resultados.

Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de color que se revelan mediante la adición de una gota de los reactivos ZymA y ZymB en cada microtubo. El reactivo ZYM A es un agente tensoactivo que facilita la solubilización del reactivo ZYM B en el medio.

La lectura de los resultados se efectuó de acuerdo a la intensidad del color de la reacción, comparándolos con la tabla proporcionada por el fabricante; de este modo, los resultados obtenidos se pueden semicuantificar, expresándose en función de los nanomoles de sustrato hidrolizados por enzima:

- Reacción negativa, ausencia de color: -.
- Reacción positiva, presencia de color (5 nanomoles/s): +.
- Reacción positiva, presencia de color (10 nanomoles/s): ++.
- Reacción positiva, presencia de color (20 nanomoles/s): +++.
- Reacción positiva, presencia de color (30 nanomoles/s): ++++.
- Reacción positiva, presencia de color (≥40 nanomoles/s): +++++.

N°	Enzima estudiada	Substrato	pH	Reacción	
				Positiva	Negativa
1	Control			Incolora o color de la muestra según importancia de la coloración	
2	Fosfatasa alcalina	2-naftil fosfato	8,5	Violeta	Incolora o amarillo muy pálido
3	Esterasa (C4)	2-naftil butirato	6,5	Violeta	
4	Esterasa lipasa (C8)	2-naftil caprilato	7,5	Violeta	
5	Lipasa (C14)	2-naftil miristato	7,5	Violeta	
6	Leucina arilamidasa	L-leucil-2-naftilamina	7,5	Naranja	
7	Valina arilamidasa	L-valil-2-naftilamina	7,5	Naranja	
8	Cistina arilamidasa	L-cistil-2-naftilamina	7,5	Naranja	
9	Tripsina	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamina	8,5	Naranja	
10	α -quimotripsina	N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamina	7,5	Naranja	
11	Fosfatasa ácida	2-naftil fosfato	5,4	Violeta	
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	Naftol-AS-BI-fosfato	5,4	Azul	
13	α -galactosidasa	6-Br-2-naftil- α D-galactopiranosido	5,4	Violeta	
14	β -galactosidasa	6-Br-2-naftil- β D-galactopiranosido	5,4	Violeta	
15	β -glucuronidasa	Naftol-AS-BI- β D-glucurónido	5,4	Azul	
16	α -glucosidasa	2-naftil- α D-glucopiranosido	5,4	Violeta	
17	β -glucosidasa	6-Br-2-naftil- β D-glucopiranosido	5,4	Violeta	
18	N-acetil- β -glucosaminidasa	1-naftil-N-acetil- β D-glucosaminido	5,4	Marrón	
19	α -mannosidasa	6-Br-2-naftil- α D-mannopiranosido	5,4	Violeta	
20	α -fucosidasa	2-naftil- α L-fucopiranosido	5,4	Violeta	

Tabla. 1. Tabla de lectura de resultados de la galería API Zym.

2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ESTUDIOS EXPERIMENTALES DE BIODETERIORO.

2.1. PREPARACIÓN DE LOS INOCULOS

2.1.1. Preparación de suspensiones bacterianas.

En el caso de las bacterias, los inóculos se prepararon de la siguiente forma:

- A partir d cultivos previos en placa, las bacterias se sembraron en TSB y se incubaron durante 24 horas a 28°C.
- A continuación, se colocó 1ml de cada cultivo en tubos de microcentrifuga y se centrifugó 10 minutos a 13000 xg.
- El sobrenadante se desechó y se lavó con 1 ml de agua destilada varias veces, para eliminar cualquier restos de medio de cultivo.
- Finalmente, el pellet correspondiente a las células bacterianas se resuspendió en 1 ml de agua ultrapura.
- La concentración de células se determinó mediante la realización de diluciones seriadas y recuento del número de UFC/ml. La concentración final a la que se prepararon las suspensiones bacterianas se encontró en torno a 10^7 células /ml.

2.1.2. Obtención de esporas fúngicas.

El protocolo desarrollado fue el siguiente:

- Los hongos se sembraron en tubos con medio PDA y se incubaron a 28°C durante una semana.
- Acabada la incubación, se añadieron 4 ml de tween 80 (0,1% en agua destilada).
- A continuación, el contenido del tubo se filtró a través de lana de vidrio colocada sobre un embudo.
- La suspensión obtenida se repartió en tubos de microcentrifuga y se centrifugó 5 minutos a 13000 xg. A continuación se lavó con 1 ml de agua destilada varias veces. Tras cada lavado se centrifugó y se eliminó el sobrenadante.
- Finalmente, el pellet correspondiente a las esporas, se resuspendió en 1 ml de agua ultrapura y se realizó un recuento en cámara de Neubauer.
- La concentración se ajustó a 10^5 - 10^6 esporas /ml.

2.2. SOPORTES DE CULTIVO.

2.2.1. Preparación de los soportes de cultivo.

Se emplearon portaobjetos de vidrio de tamaño estándar (24x80mm), barnizados a pincel con las resinas elegidas en tres capas finas sucesivas.

Estos soportes imitan las características de una superficie barnizada, pero eliminan las posibles interferencias que podamos encontrar en obras de arte reales. Los soportes así preparados se dejaron secar en oscuridad durante 60 días.

A continuación se detallan las resinas empleadas:

a) Dammar (resina natural triterpénica). Seleccionada en base a estudios previos (datos no mostrados). Se preparó a partir de resina de dammar blanco a trozos grandes de primera calidad, suministrados por Caremi Pigmentos (Sevilla, España) disueltos en esencia de trementina rectificada (Titán). Las proporciones empleadas fueron de 175 g de resina por 300 ml de esencia de trementina (Mayer, 1985).

b) Plexisol P550 (resina sintética). Seleccionada en base a estudios previos (datos no mostrados). Resina acrílica a base de poli butil-metacrilato en solución al 40% en benzina; es soluble en ésteres, cetonas, hidrocarburos aromáticos, alifáticos y clorurados, pudiendo diluirse limitadamente con alcohol. Fue suministrada por CTS Europe. Se empleó disuelta en acetona.

c) Goma laca (cereo-resina). Se eligió porque la estratigrafía reveló que se trataba del barniz empleado en la obra Virgen de Guadalupe. Se preparó a partir de goma laca en escamas a razón de 20 gramos por cada 100ml de etanol 96%.

d) Control. El control consiste en el portaobjetos sin barnizar, y por tanto, sin ningún tipo de resina.

2.2.2. Inoculación de los soportes de cultivo.

Sobre los soporte de cultivo se colocaron gotas de 20 µl de la suspensión de esporas de determinados hongos aislados. A continuación, los soportes se incubaron a 28°C y con un 75% de humedad relativa.

2.3. PROBETAS.

2.3.1. Preparación de las probetas.

Se dispuso de cuatros tipos de probetas, en las cuales se trató de reproducir la composición de las capas constitutivas de un lienzo.

a) Probeta tipo A.

- **Capa de apresto.** Sobre el soporte de lino se extendió una dispersión acuosa de cola de conejo (aguacola) en proporción 70 gramos de cola de conejo por cada litro de agua.
- **Capa de preparación.** Esta capa contiene una mezcla de aguacola, blanco de cinc y blanco de España. Se preparó añadiendo a un litro de aguacola 30 gramos de blanco de cinc y 30 gramos de blanco de España.
- **Capa pictórica.** Se trata de pintura al óleo que se preparó empleando aceite de linaza cocido sin secante y blanco de cinc como pigmento.
- **Capa de protección.** En este primer tipo de probeta, no se añadió capa de protección de ninguna clase.

b) Probeta tipo B.

La capa de apresto, de preparación y la capa pictórica se elaboraron con los mismos materiales que la probeta tipo A.

La única diferencia se encuentra en la capa de protección, constituida en este tipo de probeta por la resina dammar.

c) Probeta tipo C.

La capa de apresto, de preparación y la capa pictórica se elaboraron con los mismos materiales que la probeta tipo A.

La única diferencia se encuentra en la capa de protección, constituida en este tipo de probeta por la resina acrílica plexisol.

d) Probeta tipo D.

- **Capa de apresto.** Sobre el soporte de lino se extendió una dispersión acuosa de cola de conejo (aguacola) en proporción 70 gramos de cola de conejo por cada litro de agua.
- **Capa de preparación.** Esta capa contiene una mezcla de aguacola y blanco de España sobre la que se extiende una capa de tierra roja aglutinada con aceite de linaza.
- **Capa pictórica.** Se trata de pintura al óleo preparado empleando aceite de linaza cocido sin secante y blanco de cinc como pigmento.
- **Capa de protección.** El barniz superficial es de goma laca.

2.3.2. Inoculación en las probetas e incubación.

Se emplearon tres clases de inóculos:

- a) **Bacterias.** Cada tipo de probeta se inoculó con una gota de 20 μl de las suspensiones bacterianas preparadas como se muestra en el apartado 2.1.1. de Material y Métodos.
- b) **Hongos.** Cada tipo de probeta se inoculó con una gota de 20 μl de las suspensiones de esporas preparadas como se muestra en el apartado 2.1.2. de Material y Métodos.
- c) **Mezclas de bacterias y hongos.** Las probetas tipo B y C, fueron además inoculadas con 20 μl de una suspensión obtenida tras mezclar 10 μl de una suspensión de esporas con 10 μl de una suspensión bacteriana preparadas como se indica en los en los apartados 2.1.1. y 2.1.2. respectivamente de este capítulo.

Para las tres clases de inóculos las condiciones de cultivo fueron 28°C y humedad relativa del 75% durante 30 días en oscuridad.

3. METODOS DE ESTUDIO

3.1. CONTROL DEL CRECIMIENTO DE HONGOS SOBRE SOPORTES DE CULTIVO.

La germinación de las esporas de los distintos hongos empleados, así como el seguimiento del crecimiento de los mismos, se llevó a cabo a distintos tiempos de incubación (tiempo cero, 24 horas, 48 horas, cinco, diez y treinta días), observándolos con un microscopio Nikon Eclipse TS100 equipado con cámara digital Nikon DS-5M.

3.2. ESPECTROSCOPIA RAMAN.

La espectroscopía Raman es una técnica de dispersión que investiga modos de vibración fundamentales, resultando en una excelente selectividad molecular. Esta técnica es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico permitiendo así su identificación. En ella se mide la intensidad y frecuencia de fotones que se dispersan en el material al ser irradiado con luz monocromática de alta intensidad (láser, típicamente 785 nm) es decir, mide el desplazamiento de la longitud de onda de la luz dispersada respecto a la luz incidente (desplazamiento Raman). El patrón de frecuencias de desplazamiento es determinado por estados vibracionales y rotacionales típicos de la muestra bajo estudio. El espectro Raman generado, que representa la cantidad de luz esparcida a distintas frecuencias, contiene información sobre las vibraciones de los átomos del material.

Los análisis basados en la espectroscopía Raman se llevaron a cabo en la Universidad de Jaén.

Los análisis se llevaron a cabo con un micro-espectrómetro Renishaw Ramascope 2000. El equipo Micro-Raman utiliza la combinación de espectroscopía Raman y microscopía óptica, permitiendo realizar espectros Raman de muestras con una resolución espacial del orden de micrómetros. Los análisis se llevaron a cabo en ausencia de luz para evitar posibles interferencias.

Las condiciones experimentales utilizadas fueron tres acumulaciones espectrales, tiempos de adquisición de 60 segundos, empleándose el objetivo de 20x.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LOS MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS.

1.1. OBRA VIRGEN DE GUADALUPE.

Los resultados obtenidos del estudio de la presencia/ausencia de distintas actividades enzimáticas en las bacterias y los hongos previamente identificados, se muestra en las tablas 2 y 3.

ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	AISLADOS BACTERIANOS CUADRO VIRGEN DE GUADALUPE				
	<i>Brevibacterium</i> sp. (VG5B1)	<i>Bacillus</i> sp. (VG6B1)	<i>Bacillus</i> sp. (VG6B2; VG6B3)	<i>Bacillus</i> sp. (VG6B4)	<i>Bacillus</i> sp. (VGO7B1)
Fosfatasa alcalina	-	-	-	-	-
Esterasa C4	++	++	+	-	-
Esterasa lipasa C8	+	-	-	+	+
Lipasa C14	-	-	-	-	+
Leucina arilamidasa	-	-	-	+	-
Valina arilamidasa	----				
Cistina arilamidasa	----				
Tripsina	----				
α -quimotripsina	----				
Fosfatasa ácida	+	-	-	-	-
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	+	+	+	+	+
A- galactosidasa	-	-	-	-	-
β -galactosidasa	+	-	-	-	-
β -glucuronidasa	-	-	+	-	-
α -glucosidasa	+	-	-	+++	-
β -glucosidasa	----				
N-acetil- β -glucosaminidasa	----				
α - manosidasa	----				
A- fucosidasa	----				

Tabla. 2. Actividades enzimáticas detectadas en las bacterias identificadas. Reacción negativa (-); reacción positiva: 5 nanomoles/s (+), 10 nanomoles/s (++) , 20 nanomoles/s (+++) , 30 nanomoles/s (++++), ≥ 40 nanomoles/s(+++++).

ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	AISLADOS BACTERIANOS CUADRO VIRGEN DE GUADALUPE				
	<i>Virgibacillus</i> sp. (VG7B2)	<i>Arthrobacter</i> sp. (VG7B3)	<i>Paucisalibacillus globulus</i> (VG7B4)	<i>Arthrobacter</i> sp. (VG7B5)	<i>Sporosarcina</i> sp. (VG7B6)
Fosfatasa alcalina	-	-	++	-	+
Esterasa C4	+	+	++	++	-
Esterasa lipasa C8	+	-	+	-	-
Lipasa C14	-	-	-	-	-
Leucina arilamidasa	-	-	-	-	-
Valina arilamidasa	-----				
Cistina arilamidasa	-----				
Tripsina	-----				
α -quimotripsina	-----				
Fosfatasa ácida	-	-	+	+	-
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	+	+	++	+	+
A-galactosidasa	-	-	-	++	-
B-galactosidasa	-	-	-	++	-
B-glucuronidasa	-	-	-	+	-
α -glucosidasa	-	-	++	+++	-
β -glucosidasa	-----				
N-acetil- β -glucosaminidasa	-----				
α -manosidasa	-----				
A-fucosidasa	-----				

Tabla. 2. Continuación. Actividades enzimáticas detectadas en las bacterias identificadas. Reacción negativa (-); reacción positiva: 5 nanomoles/s (+), 10 nanomoles/s (++) , 20 nanomoles/s (+++), 30 nanomoles/s (++++), ≥ 40 nanomoles/s(+++++).

La actividad enzimática encontrada con mayor frecuencia es la Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa (presente en el 100% de bacterias las bacterias estudiadas), seguida por la Esterasa C4 (70%) y la esterasa lipasa (50%).

Arthrobacter sp. (VG7B5) es la bacteria que presenta mayor variedad de actividades enzimáticas, seguida por *Paucisalibacillus globulus* (VG7B4).

ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	AISALDOS FÚNGICOS CUADRO VIRGEN DE GUADALUPE					
	<i>Penicillium</i> sp. (VG7H3; VG5H1)	<i>Emericella</i> sp. (VG6H1)	<i>Mucor racemosus</i> (VG6H2)	<i>Penicillium</i> sp. (VG7H1; VG7H2)	<i>Ulocladium septosporum</i> (VG7H4)	<i>Eurotium</i> sp. (VG7H5)
Fosfatasa alcalina	++++	++	+++	++++		+++
Esterasa C4	++	++	+	++	+	+++
Esterasa lipasa C8				++		+
Lipasa C14	---					
Leucina arilamidasa		++				
Valina arilamidasa	+					
Cistina arilamidasa	---					
Tripsina	---					
α -quimotripsina	---					
Fosfatasa ácida	+	+	+++	+++	++	++++
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	+	++	++	+++	++	++++
α -galactosidasa	---					
β -galactosidasa				+++		+
β -glucuronidasa	---					
α -glucosidasa	---					
β -glucosidasa	---					
N-acetil- β -glucosaminidasa	+			+++	+	++
α -manosidasa				++		+
A-fucosidasa	---					

Tabla. 3. Actividades enzimáticas detectadas en los hongos identificados. Reacción negativa (-); reacción positiva: 5 nanomoles/s (+), 10 nanomoles/s (++) , 20 nanomoles/s (+++), 30 nanomoles/s (++++), ≥ 40 nanomoles/s(+++++).

Las actividades enzimáticas que pueden encontrarse en todos los hongos aislados son la Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, fosfatasa ácida y Esterasa C4 (100% de los hongos aislados)

Penicillium sp. (VG7H1) y *Eurotium* sp. (VG7H5) son los que presentan mayor número de actividades enzimáticas.

1.2. OBRA CRISTO DE LA PACIENCIA.

Los resultados obtenidos de las actividades enzimáticas presentes en las bacterias y hongos identificados, se muestran en las tablas 4 y 5 respectivamente.

ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	AISLADOS BACTERIANOS CUADRO CRISTO DE LA PACIENCIA						
	<i>Microbacterium</i> sp. (CP5B1)	<i>Bacillus</i> sp. (CP6B1)	<i>Sporosarcina</i> sp. (CP6B2)	<i>Bacillus psychrodurans</i> (CP6B3)	<i>Bacillus</i> sp. (CP6B4)	<i>Bacillus</i> sp. (CP7B1)	<i>Bacillus herbersteinensis</i> (CP7B2)
Fosfatasa alcalina	-	-	-	-	-	+	-
Esterasa C4	+	+++	-	+	+++	+	-
Esterasa lipasa C8	-	+	-	-	+	-	-
Lipasa C14	-	-	-	-	-	-	-
Leucina arilamidasa	-	-	+	-	-	-	-
Valina arilamidasa	-----						
Cistina arilamidasa	-----						
Tripsina	-----						
α -quimotripsina	-----						
Fosfatasa ácida	-	-	-	-	+	-	-
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	+	+	+	+	+	+	+
α -galactosidasa	-	-	-	-	-	+	+
β -galactosidasa	-	+	-	-	-	+	+
β -glucuronidasa	-----						
α -glucosidasa	-	-	-	++	-	+	+
β -glucosidasa	-	+++	-	-	-	-	-
N-acetil- β -glucosaminidasa	-----						
α -manosidasa	-----						
α -fucosidasa	-----						

Tabla. 4. Actividades enzimáticas detectadas en las bacterias identificadas. Reacción negativa (-); reacción positiva: 5 nanomoles/s (+), 10 nanomoles/s (++), 20 nanomoles/s (+++), 30 nanomoles/s (++++), ≥ 40 nanomoles/s(+++++).

ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	AISLADOS BACTERIANOS CUADRO CRISTO DE LA PACIENCIA						
	<i>Virgibacillus</i> sp. (CP7B3; B5)	<i>Paucisalibacillus globulus</i> (CP7B4; 11)	<i>Bacillus</i> sp. (CP7B6)	<i>Bacillus</i> sp. (CP7B7)	<i>Arthrobacter agilis</i> (CP7B8)	<i>Sporosarcina</i> sp. (CP7B9)	<i>Sporosarcina</i> sp. CP7B10)
Fosfatasa alcalina	++	-	-	-	-	-	-
Esterasa C4	++	+	-	+	+	-	+
Esterasa lipasa C8	+	+	+	+	+	-	-
Lipasa C14	-	-	+	-	-	-	-
Leucina arilamidasa	-	-	-	-	-	-	-
Valina arilamidasa	-----						
Cistina arilamidasa	-----						
Tripsina	-----						
α -quimotripsina	-----						
Fosfatasa ácida	-	-	-	+	-	-	+
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	+	+	+	+	+	+	++
α -galactosidasa	-	-	-	-	+	+	-
β -galactosidasa	+	-	-	-	+	+	-
β -glucuronidasa	-----						
α -glucosidasa	-	-	++	-	+	+	++
β -glucosidasa	+++	-	-	-	-	-	-
N-acetil- β -glucosaminidasa	-----						
α -manosidasa	-----						
α -fucosidasa	-----						

Tabla. 4. Continuación. Actividades enzimáticas detectadas en las bacterias identificadas. Reacción negativa (-); reacción positiva: 5 nanomoles/s (+), 10 nanomoles/s (++) , 20 nanomoles/s (+++), 30 nanomoles/s (++++), ≥ 40 nanomoles/s(+++++).

La actividad enzimática mas frecuente es la Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa (100% del total de bacterias aisladas), seguida por la Esterasa C4 (71,4%) y la esterasa lipasa (50%).

ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	AISLADOS FÚNGICOS CUADRO CRISTO PACIENCIA		
	<i>Penicillium</i> sp. (CP7H1; CP7H2)	<i>Penicillium</i> sp. (CP7H3)	<i>Penicillium</i> sp. (CP7H4)
Fosfatasa alcalina	++++	+	+++
Esterasa C4	+++	+	++
Esterasa lipasa C8	+	-	-
Lipasa C14	-----		
Leucina arilamidasa	-----		
Valina arilamidasa	-----		
Cistina arilamidasa	-----		
Tripsina	-----		
α -quimotripsina	-----		
Fosfatasa ácida	+++	++	+++
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	+++	++	++
α -galactosidasa	-----		
β -galactosidasa	-----		
β -glucuronidasa	-----		
α -glucosidasa	-----		
β -glucosidasa	-----		
N-acetil- β -glucosaminidasa	+	+	+
α -manosidasa	-----		
A-fucosidasa	-----		

Tabla. 5. Actividades enzimáticas detectadas en los hongos aislados a partir de la obra Cristo de la Paciencia. Reacción negativa (-); reacción positiva: 5 nanomoles/s (+), 10 nanomoles/s (++) , 20 nanomoles/s (+++), 30 nanomoles/s (++++), ≥ 40 nanomoles/s(+++++).

Todos los hongos aislados a partir de este lienzo muestran un patrón casi idéntico de actividades enzimáticas. En todos ellos encontramos las actividades fosfatasa alcalina y ácida, Esterasa C4, N-acetil- β -glucosaminidasa, Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa. La única diferencia la encontramos en las cepas de *Penicillium* sp CP7H1 y CP7H2 que poseen, además de las anteriores enzimas, la Esterasa lipasa C8, de la que carecen las otras dos cepas.

2. ESTRATIFICACIÓN DEL LIENZO VIRGEN DE GUADALUPE.

Los análisis químicos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Análisis para la Restauración y la Conservación de Obras de Arte (Villanueva de la Cañada, Madrid).

2.1. Muestra SA-1 A.

En la **Fig. 1**, se muestra un corte trasversal de la muestra SA-1A y en la **Tabla. 6**, la distribución de materiales constitutivos de la obra presentes en las diversas capas de la misma.

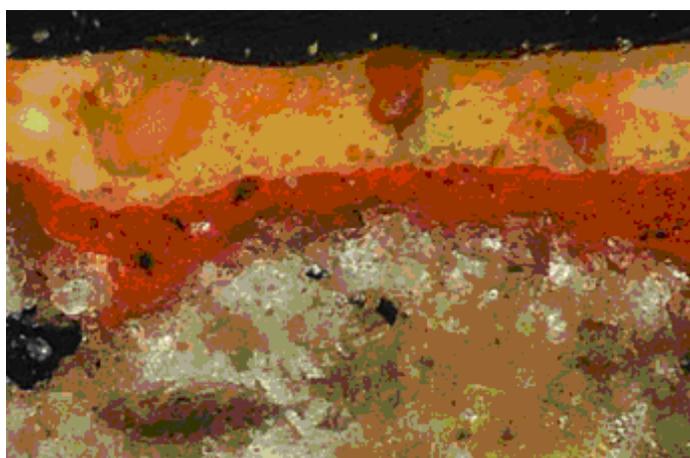


Fig. 1. Corte trasversal de la muestra SA-1 A, procedente de la obra Virgen de Guadalupe.

Capa N°	Color	Espesor (μ)	Pigmentos	Aglutinantes
1	gris claro	400	calcita, cuarzo, yeso (tr.), negro de hueso (tr.), arcillas (tr.), dolomita (tr.)	cola animal
2	rojo	15-30	tierra roja	aceite de linaza
3	anaranjado	15-55	albayaalde, litargirio, cuarzo, tierras (tr.)	aceite de linaza
4	pardo translúcido irregular	5	-	goma laca, cera de carnauba

tr.: trazas

Tabla. 6. Distribución de materiales encontrados en las diversas capas de la obra Virgen de Guadalupe.

2.2. Muestra SA-1 B.

En la **Fig. 2**, se muestra un corte transversal de la muestra SA-1B y en la **Tabla. 7**, la distribución de materiales constitutivos de la obra presentes en las diversas capas de la misma.



Fig. 2. Corte transversal de la muestra SA-1 B, procedente de la obra Virgen de Guadalupe.

Capa N°	Color	Espesor (μ)	Pigmentos	Aglutinantes
1	gris claro	130	calcita, cuarzo, yeso (tr.), negro de hueso (tr.), arcillas (tr.), dolomita (tr.)	cola animal
2	rojo	15-90	tierra roja	aceite de linaza
3	azul (dos capas)	45-60	albayaalde, indigotina, laca roja (tr.), calcita (tr.), negro carbón (tr.), tierras (tr.)	aceite de linaza
4	translúcido	5	-	barniz resinoso
5	azul claro	25-60	albayaalde, indigotina, negro carbón (tr.), calcita (tr.), tierras (tr.)	aceite de linaza
6	translúcido	5	-	goma laca

r.: trazas

Tabla. 7. Distribución de materiales encontrados en las diversas capas de la obra Virgen de Guadalupe.

2.3. Muestra SA-1 C.

En la **Fig. 3**, se muestra un corte trasversal de la muestra SA-1C y en la **Tabla. 8**, la distribución de materiales constitutivos de la obra presentes en las diversas capas de la misma.



Fig. 3. Corte trasversal de la muestra SA-1 C, procedente de la obra Virgen de Guadalupe.

Capa N°	Color	Espesor (μ)	Pigmentos	Aglutinantes
1	gris claro	35	calcita, cuarzo, yeso (tr.), negro de hueso (tr.), arcillas (tr.), dolomita (tr.)	cola animal
2	rojo	15-20	tierra roja	aceite de linaza
3	anaranjado	15	minio de plomo, cuarzo (tr.)	aceite de linaza
4	blanco amarillento	15-50	albayalde, arcillas (tr.)	aceite de linaza
5	pardo oscuro	5	-	goma laca

tr.: trazas

Tabla. 8. Distribución de materiales encontrados en las diversas capas de la obra Virgen de Guadalupe.

2.4. Resumen de la estratigrafía.

Analizando los materiales encontrados en las distintas capas de las tres muestras, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- **Capa de preparación.** Sobre el soporte de lino (posiblemente) encolado encontramos una capa de nivelación de color grisáceo, con calcita, cuarzo y negro carbón acompañado de fosfato de calcio (negro carbón de hueso o marfil). El aglutinante empleado es la cola animal (espesor variable, entre 20 y 400 μ). Hay una segunda capa de color rojo que es una imprimación general de tierra roja aglutinada con aceite de linaza. Su espesor es más uniforme, estando en torno a las 50 μ . La tierra roja contiene arcillas, cuarzo, óxidos de hierro y trazas de calcita, pirita y rutilo.
- **Capa de color.** Se trata de capas al óleo de aceite de linaza en las que los pigmentos hallados fueron los siguientes:
 - Blancos: albayalde, calcita.
 - Negros: negro carbón.
 - Rojos: tierra roja, laca roja.
 - Amarillos: litargirio.
 - Azules: indigotina.
 - Anaranjados: minio de plomo.

En la muestra nº 2 hay un repinte azul con albayalde e indigotina al óleo. Debe ser un repinte antiguo (anterior al siglo XIX), ya que no posee pigmentos modernos.

- **Capa de protección.** El barniz superficial es de goma laca, aunque la muestra SA-1 A contiene también cera de carnauba.

3. SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS.

En base a la caracterización enzimática previa, se seleccionaron bacterias y hongos, procedentes de las dos obras, con el fin de estudiar su capacidad como agentes de biodeterioro. Se seleccionaron aquellos microorganismos que mostraron mayor número y diversidad de actividades enzimáticas. Siguiendo este criterio, los microorganismos seleccionados fueron:

- **Bacterias:** *Arthrobacter* sp. (VG7B5), *Paucisalibacillus globulus* (VG7B4),
Arthrobacter agilis (CP7B8).
- **Hongos:** *Eurotium* sp. (VG7H5), *Penicillium* sp. (VG7H1).

4. CONTROL DEL CRECIMIENTO DE LOS HONGOS SELECCIONADOS SOBRE LOS SOPORTES DE CULTIVO.

Para determinar la germinación y el crecimiento de las esporas de los hongos seleccionados en el apartado anterior, sobre los soportes preparados según se indica en el apartado 2.1.2. de Material y Métodos, se llevó a cabo un seguimiento que consistió en la observación de los soportes inoculados mediante microscopía óptica a distintos tiempos de incubación (0, 24 y 48 horas, y 5, 10 y 30 días).

4.1. Control del crecimiento de *Eurotium* sp. (VG7H5).

Observando la Fig. 4., podemos comprobar la ausencia de germinación de las esporas sobre el control (vidrio sin resina). Tampoco apareció germinación en los soportes con la resina natural dammar (Fig. 5).

Sin embargo, sí se aprecia germinación de las esporas de este hongo, e incluso cierto crecimiento de las hifas a lo largo del tiempo, sobre el soporte con la resina Plexisol (Fig. 6) y sobre el soporte con la resina goma laca (Fig.7).

4.2. Control del crecimiento de *Penicillium* sp. (VG7H1).

De acuerdo con la Fig. 8, encontramos ausencia de germinación de las esporas sobre el control. Tampoco se detectó dicha germinación sobre el soporte con la resina natural dammar (Fig.9).

Sin embargo, se produce la germinación de las esporas de este hongo, e incluso cierto crecimiento de las hifas a lo largo del tiempo, sobre los soportes con las resinas Plexisol (Fig. 10) y goma laca (Fig. 11).

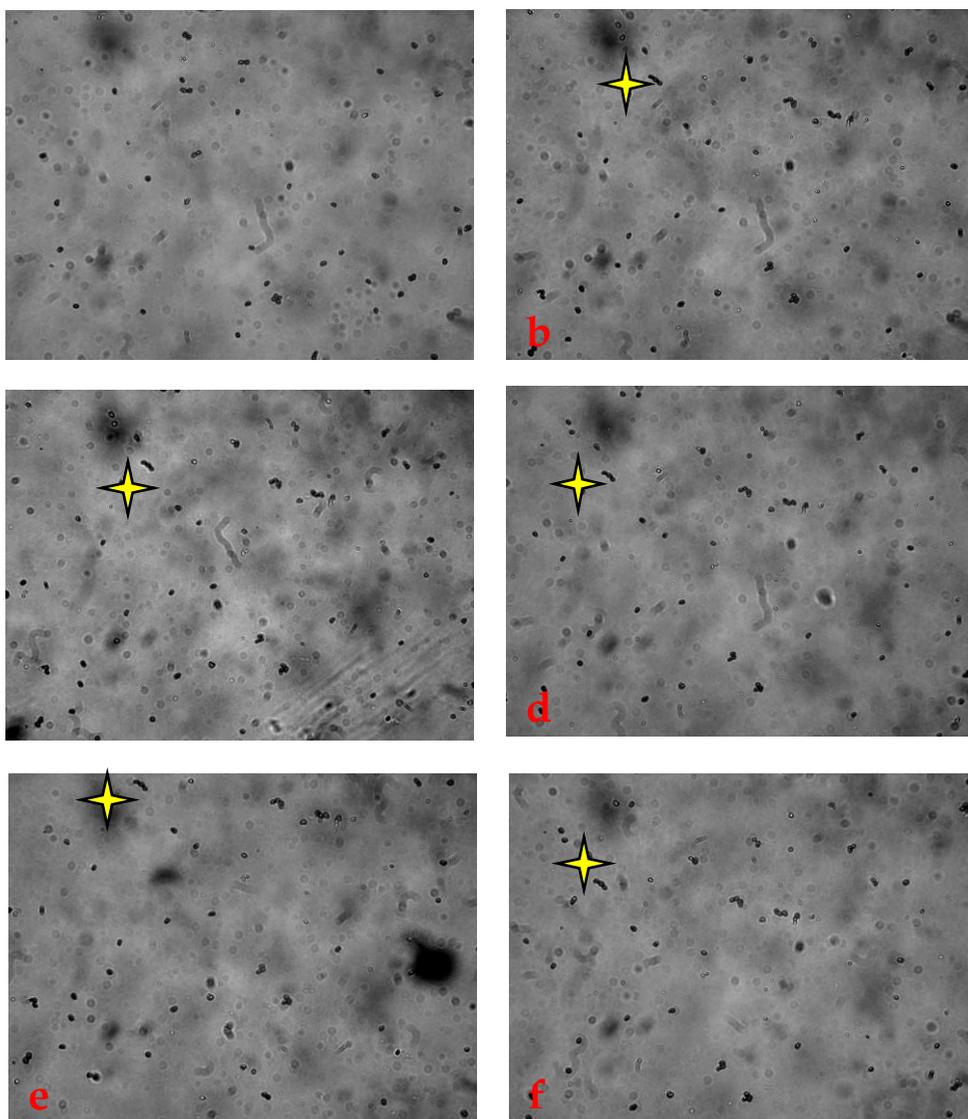


Fig. 4. Esporas de *Eurotium* sp. inoculadas sobre el soporte de vidrio sin resina (control) a distintos tiempos de incubación: a) 0 horas; b) 24 horas; c) 48 horas; d) 5 días; e) 10 días; f) 30 días. (X40). Punto de referencia. ✦

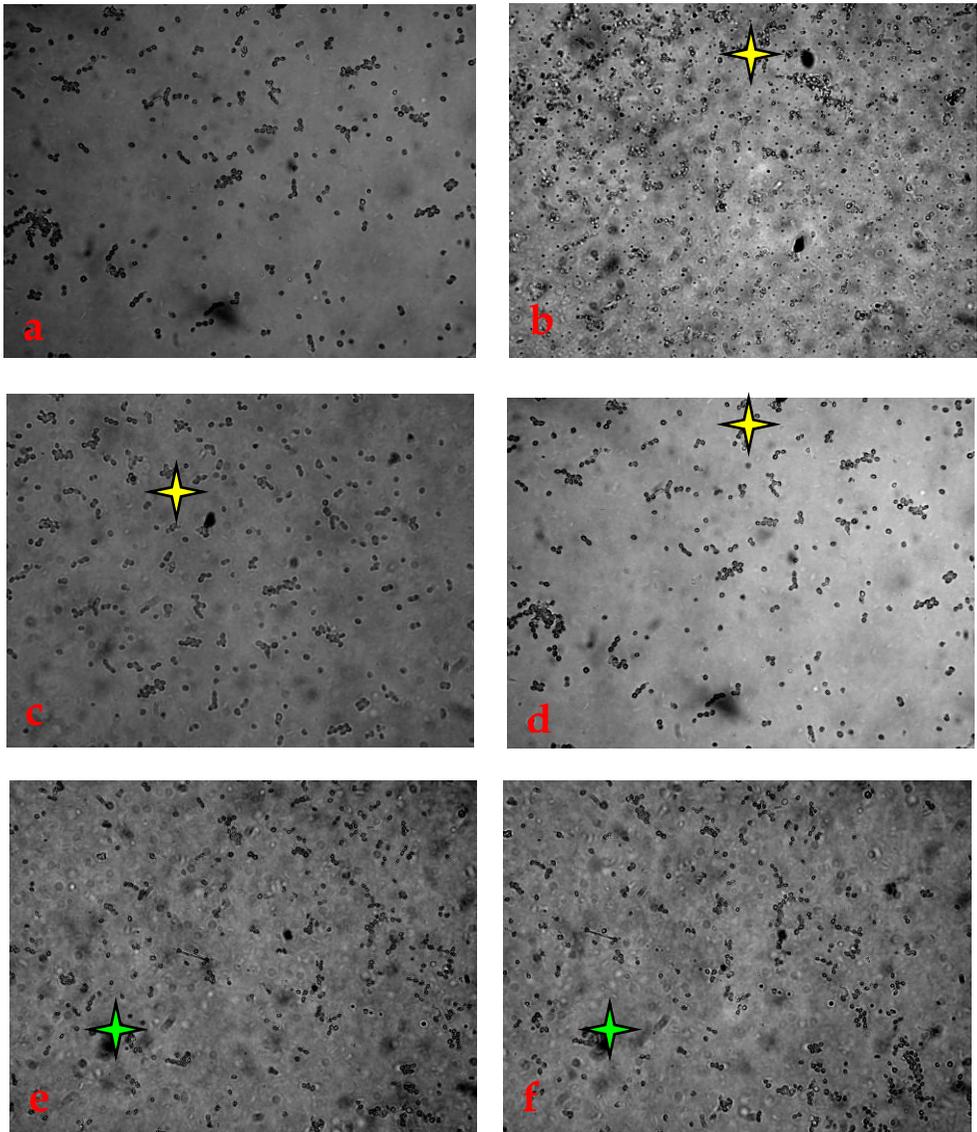


Fig. 5. Esporas de *Eurotium* sp. inoculadas sobre la resina natural Dammar a distintos tiempos de incubación: a) 0 horas; b) 24 horas; c) 48 horas; d) 5 días; e) 10 días; f) 30 días. (X40). Puntos de referencia.  

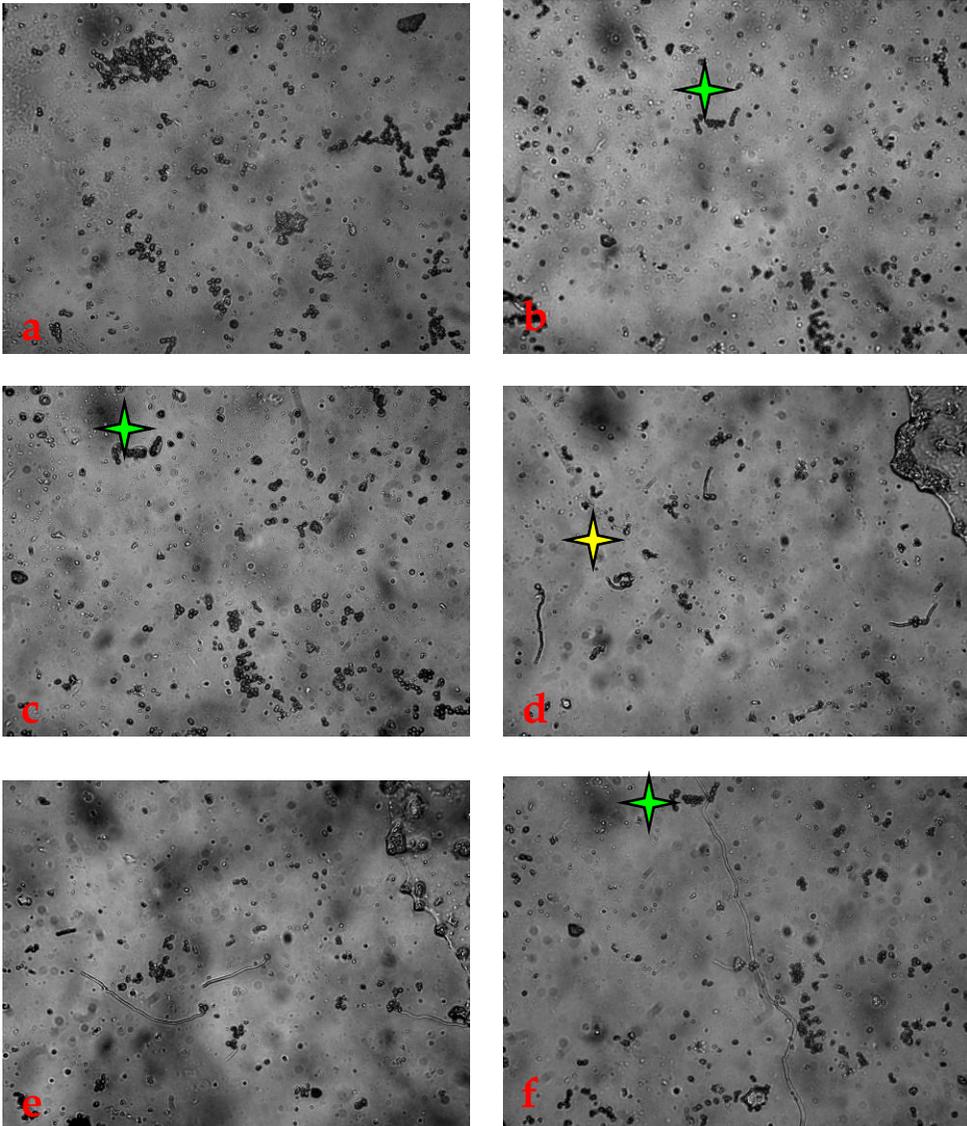


Fig. 6. Esporas de *Eurotium* sp. germinando sobre la resina sintética Plexisol P-550 a distintos tiempos de incubación: a) 0 horas; b) 24 horas; c) 48 horas; d) 5 días; e) 10 días; f) 30 días. (X40). Puntos de referencia.  

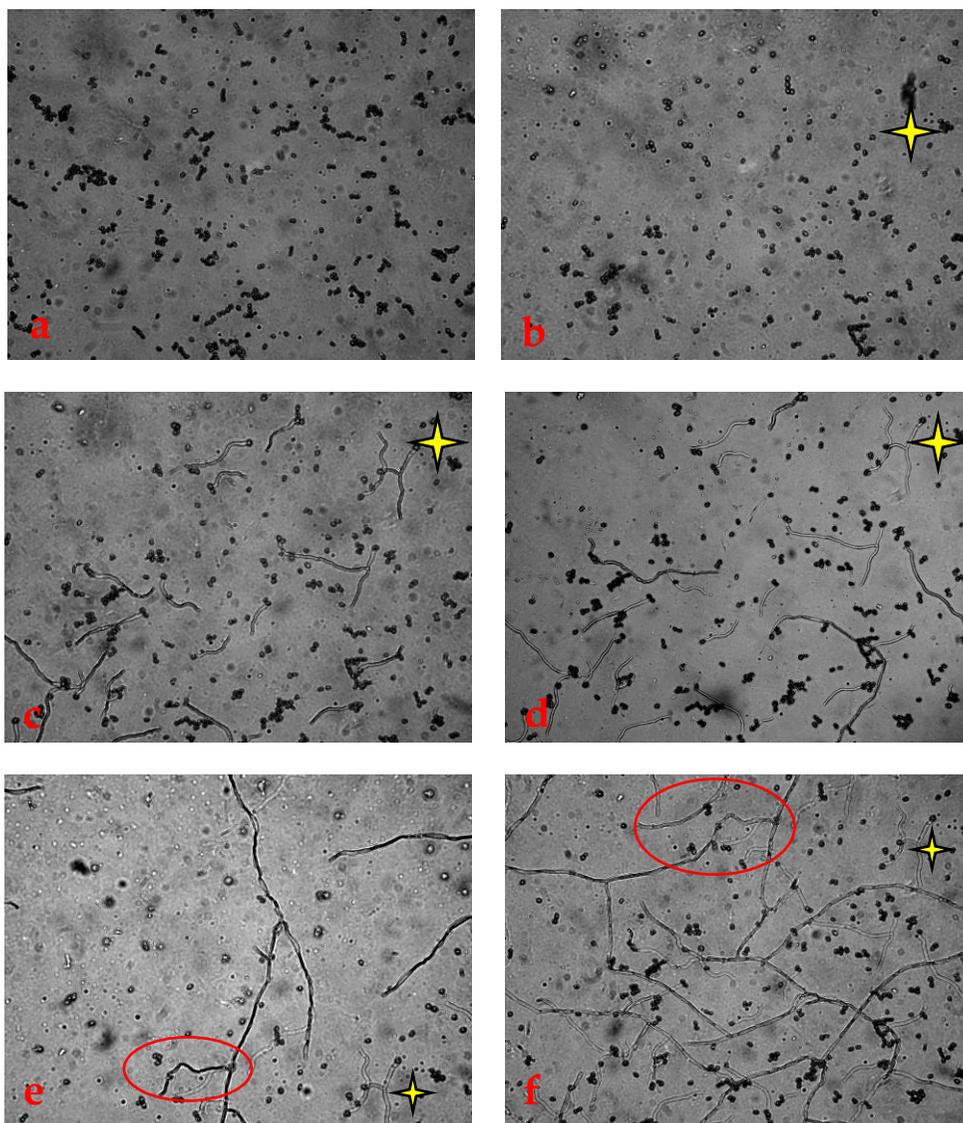


Fig. 7. Esporas de *Eurotium* sp. germinando sobre la resina goma laca a distintos tiempos de incubación: a) 0 horas; b) 24 horas; c) 48 horas; d) 5 días; e) 10 días; f) 30 días. (X40). Punto de referencia. ✦

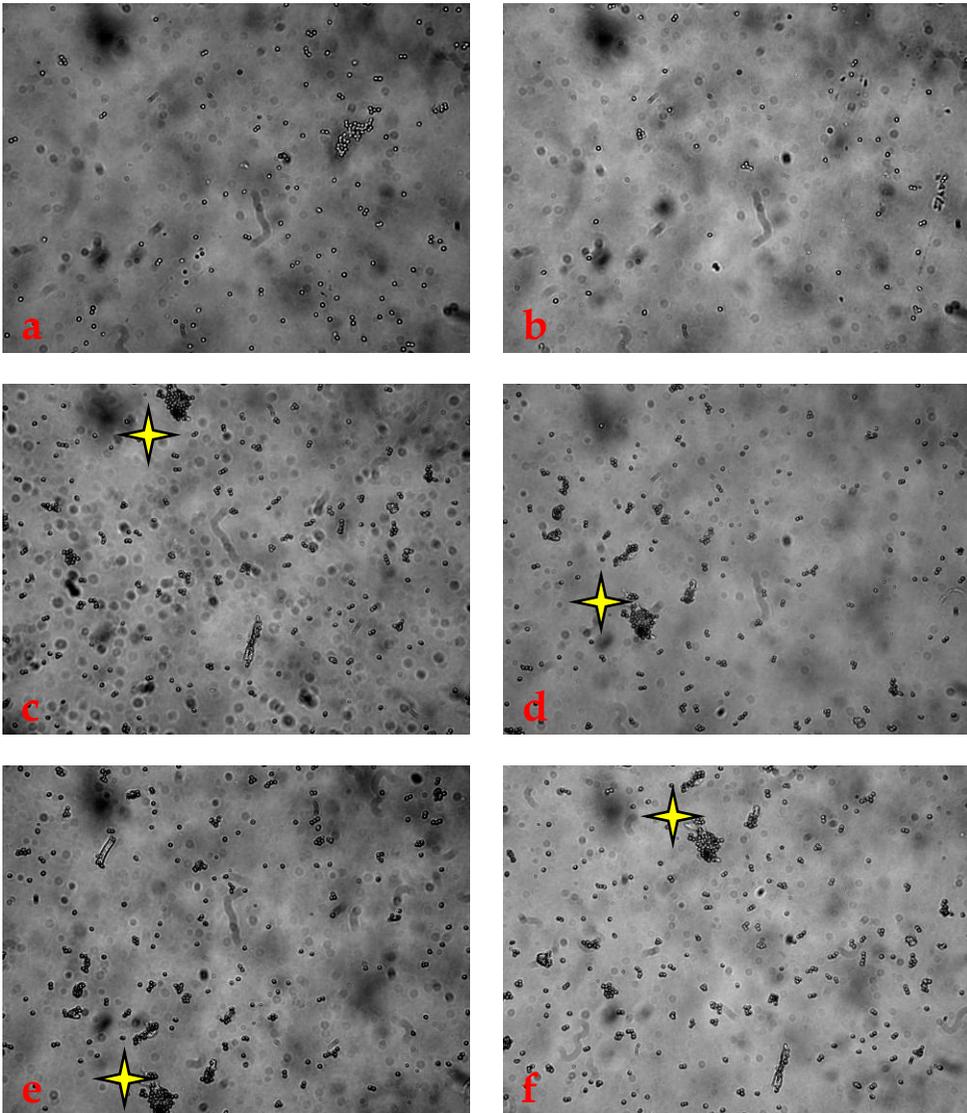


Fig. 8. Esporas de *Penicillium* sp. inoculadas sobre el soporte de vidrio sin resina (control) a distintos tiempos de incubación: a) 0 horas; b) 24 horas; c) 48 horas; d) 5 días; e) 10 días; f) 30 días. (X40). Punto de referencia. ✦

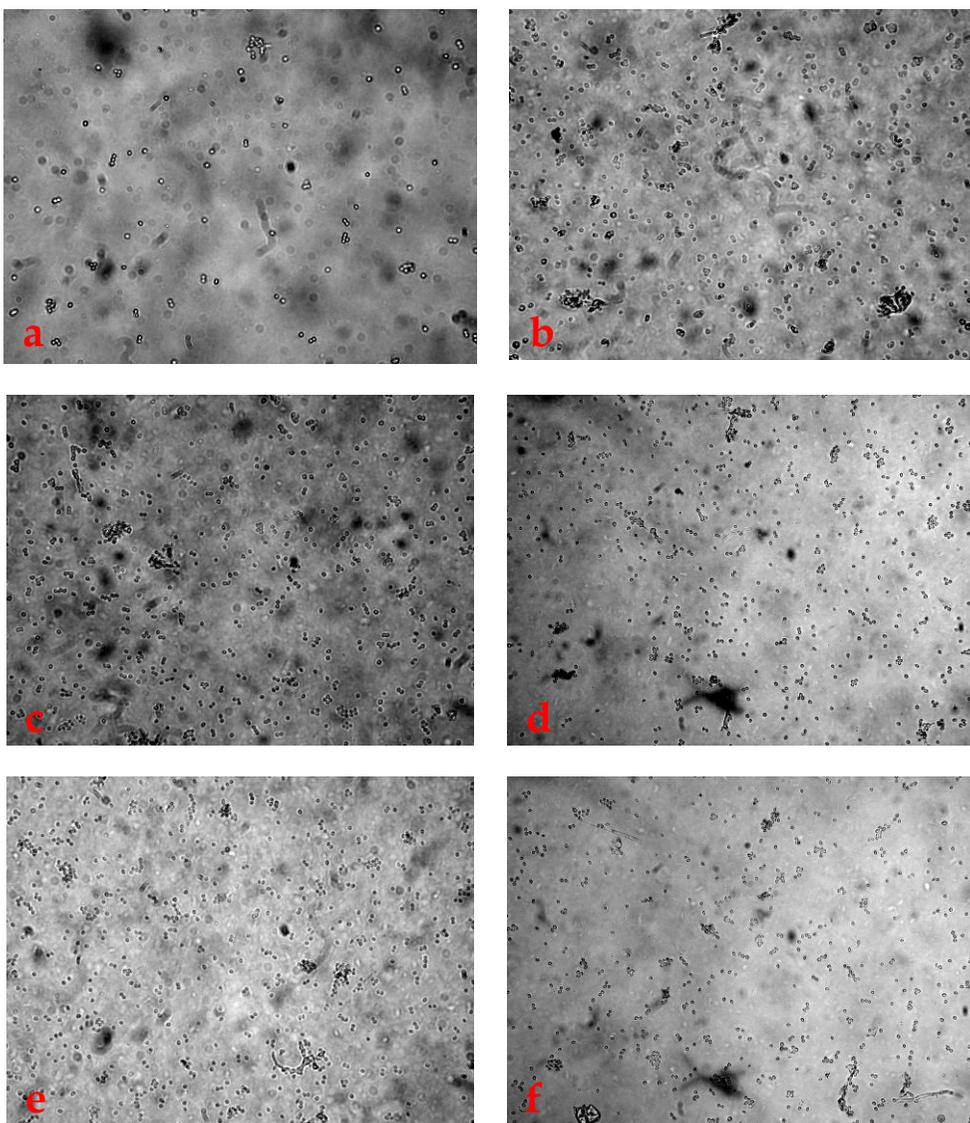


Fig. 9. Esporas de *Penicillium* sp. inoculadas sobre la resina natural Dammar a distintos tiempos de incubación: a) 0 horas; b) 24 horas; c) 48 horas; d) 5 días; e) 10 días; f) 30 días. (X40).

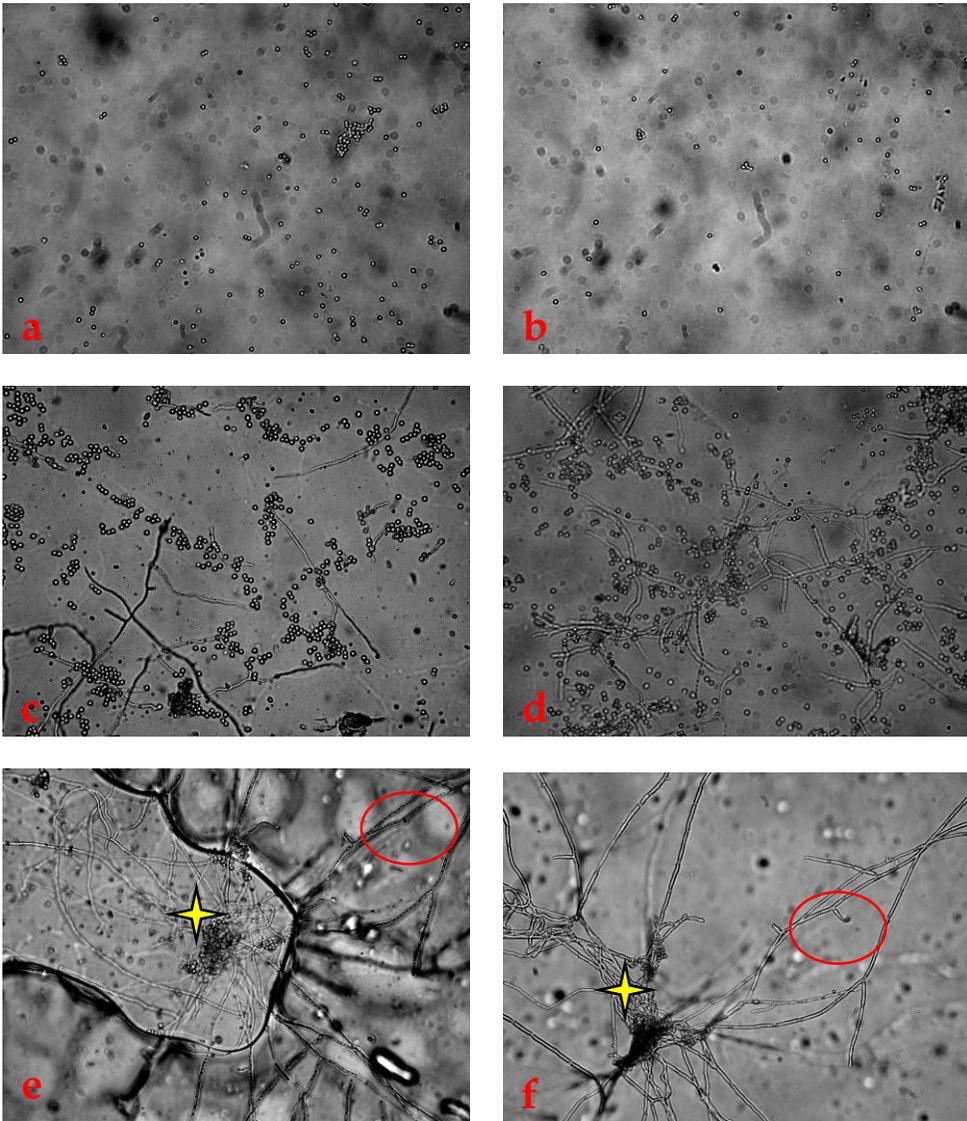


Fig. 10. Esporas de *Penicillium* sp. germinando sobre la resina sintética Plexisol P-550 a distintos tiempos de incubación: a) 0 horas; b) 24 horas; c) 48 horas; d) 5 días; e) 10 días; f) 30 días. (X40). Punto de referencia. ✦

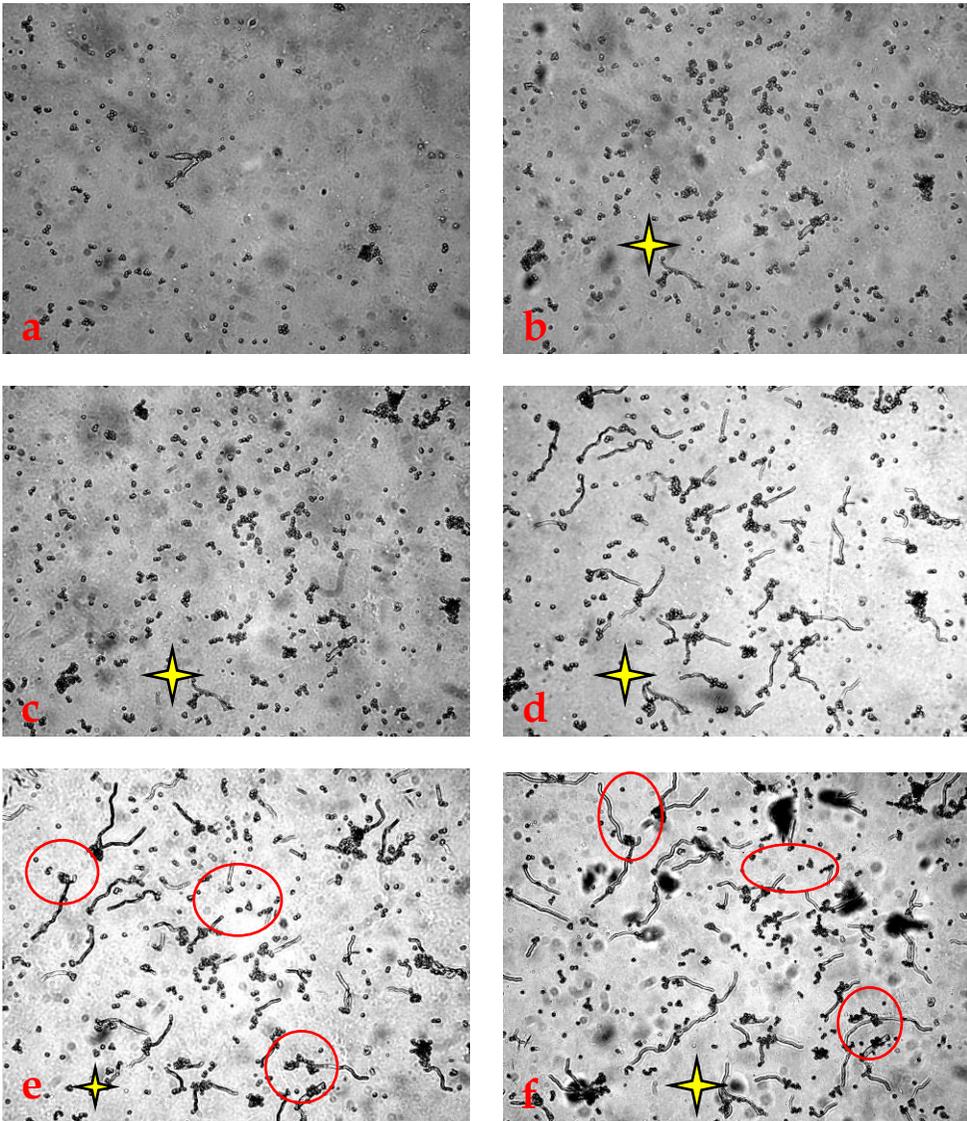


Fig. 11. Esporas de *Penicillium* sp. germinando sobre la resina goma laca a distintos tiempos de incubación: a) 0 horas; b) 24 horas; c) 48 horas; d) 5 días; e) 10 días; f) 30 días. (X40). Punto de referencia. ✨

5. ESPECTROSCOPIA RAMAN.

La capacidad degradativa de las bacterias y hongos seleccionados se estudió empleando espectroscopía Raman.

En función de los resultados del crecimiento observado, según se explica en el apartado anterior, el tiempo de incubación elegido fue de 30 días, puesto que no se apreciaron cambios en el crecimiento de ninguno de los microorganismos empleados más allá de este periodo.

5.1. Determinación de la viabilidad de los microorganismos seleccionados tras el periodo de incubación.

Tras los 30 días de incubación, se tomaron muestras de la superficie de las probetas mediante hisopos que se emplearon para sembrar en placas con los medios de cultivo TSA y PDA, a fin de determinar si, tanto bacterias como hongos, continuaban siendo viables.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla. 9**. Como puede verse, transcurridos 30 días, sólo crecen los hongos en las placas sembradas a partir de las probetas tipo B y C, inoculadas con mezclas de bacterias y hongos (**Fig. 12,13 y 14**).

TIPO DE PROBETA	BACTERIAS		HONGOS		HONGO + BACTERIA	
	<i>A.agilis</i>	<i>P. globulus</i>	<i>Eurotium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp	<i>P. globulus</i> + <i>Eurotium</i> sp.	<i>P. globulus</i> + <i>Penicillium</i> sp.
Probeta tipo A	-	-	-	-	-	-
Probeta tipo B	-	-	-	-	+	-
Probeta tipo C	-	-	-	-	+	+

Tabla. 9. Viabilidad de los microorganismos tras 30 días de incubación sobre las probetas. +: crecimiento. -: ausencia de crecimiento.



Fig. 12. Probeta tipo B inoculada con una mezcla de *P. globulus* y *Eurotium* sp., donde se puede observar el crecimiento fúngico (18X).



Fig. 13. Probeta tipo C inoculada con una mezcla de *P. globulus* y *Penicillium* sp., donde se puede observar el crecimiento fúngico (18X).



Fig. 14. Probeta tipo C inoculada con una mezcla de *P. globulus* y *Eurotium* sp. donde se puede observar el crecimiento fúngico (18X).

5.2. Espectros Raman de referencia.

El espectro Raman de los distintos tipos de probetas sin inocular, reveló la existencia de una serie de picos correspondientes a los materiales empleados en la elaboración de las mismas, lo que permitió establecer un patrón característico para cada tipo de probeta.

Para asignar los materiales a los picos que originan en el espectro, nos basamos en espectros Raman previamente establecidos para cada uno de los materiales empleados.

5.2.1. Espectro Raman de referencia de la probeta tipo A.

Distinguimos ocho picos importantes (Fig. 15). La correspondencia entre la posición e intensidad de los picos y el material que los genera, se muestra en la Tabla 10.

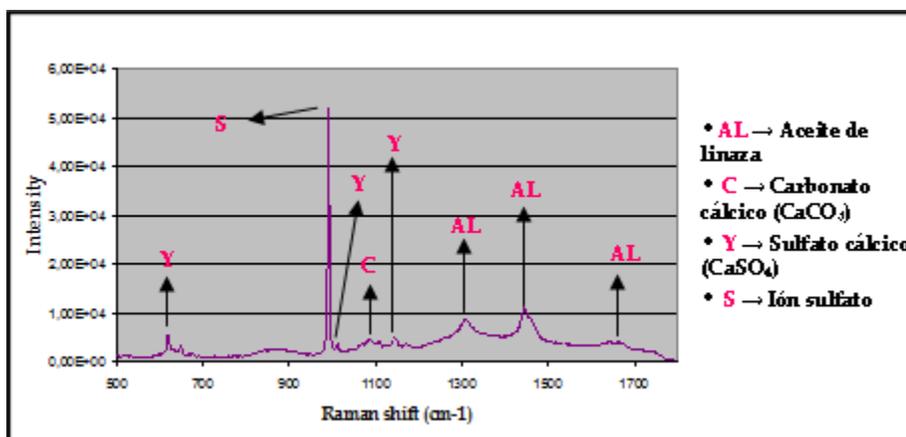


Fig. 15. Espectro Raman de referencia generado a partir de una muestra de la probeta tipo A.

PROBETA TIPO A			
Pico (cm ⁻¹)	Intensidad (U.A.)	Material	Modo de vibración del enlace
619	5301,97	Sulfato cálcico	---
991	51883,1	Ión sulfato	---
1011	3797,36	Sulfato cálcico	---
1086	4502,75	Carbonato cálcico	---
1143	4949,74	Sulfato cálcico	---
1309	8841,24	Aceite de linaza	$\delta(\text{CH}_2)_2$ deformation
1444	10924	Aceite de linaza	$\delta(\text{CH}_2)$
1661	4113,51	Aceite de linaza	$\nu(\text{C}=\text{C})$ stretching vibration

Tabla. 10. Correspondencia entre la posición e intensidad de los picos y el material que los genera, incluyendo la vibración del enlace implicado.

5.2.2. Espectro Raman de referencia de la probeta tipo B.

El espectro Raman se representa en la Fig. 16; la correspondencia entre la posición e intensidad de los picos y el material que los genera, la aparece en la Tabla 11.

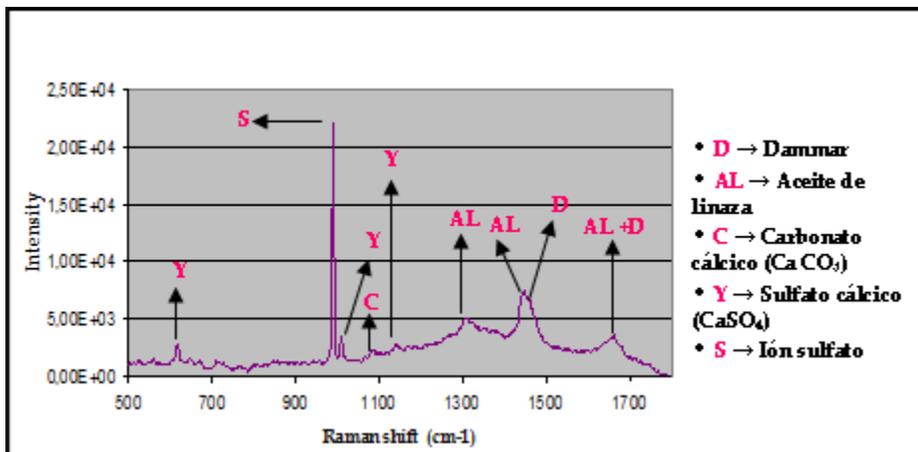


Fig. 16. Espectro Raman de referencia generado a partir de una muestra de la probeta tipo B.

PROBETA TIPO B			
Pico (cm ⁻¹)	Intensidad (U.A.)	Material	Modo de vibración del enlace
617	2851,81	Sulfato cálcico	---
989	22072,7	Ión sulfato	---
1010	3417,68	Sulfato cálcico	---
1084	2288,64	Carbonato cálcico	---
1140	2862,06	Sulfato cálcico	---
1308	5078,14	Aceite de linaza	$\delta(\text{CH}_2)_2$ deformation
1447	7467,22	Aceite de linaza	$\delta(\text{CH}_2)$
1457	6715,48	Dammar	$\delta(\text{CH}_2)$ scissoring mode
1661	3568,81	Aceite de linaza + dammar	$\nu(\text{C}=\text{C})$ stretching vibration

Tabla. 11. Correspondencia entre la posición e intensidad de los picos y el material que los genera, incluyendo el tipo de enlace implicado.

En este espectro Raman encontramos los mismos picos que en el espectro de referencia de la probeta tipo A, además de los característicos del dammar.

En el espectro el dammar aparece dos veces; sin embargo sólo observamos un pico más; esto se debe a que el pico correspondiente al enlace C=C presente en el dammar aparece en la misma posición (1661 cm^{-1}) que el pico del mismo enlace correspondiente al aceite de linaza. Si nos fijamos en la intensidad de este pico en el anterior espectro de referencia (Fig. 15.) observaremos que es mayor en la probeta tipo A ($4113,51$) que en la tipo B ($3568,81$), lo que podría explicarse por el hecho de que la capa de barniz de dammar, al ser la más superficial, podría enmascarar la presencia de enlaces pertenecientes a los materiales que se encuentran debajo de esta capa. Lo mismo ocurre con el resto de picos, excepto el correspondiente a 1447 cm^{-1} , cuya intensidad es menor en el caso del espectro de referencia de la probeta tipo B.

5.2.3. Espectro Raman de referencia de la probeta tipo C.

El espectro Raman se representa en la Fig. 17; la correspondencia entre la posición e intensidad de los picos y el material que los genera, la aparece en la Tabla 12.

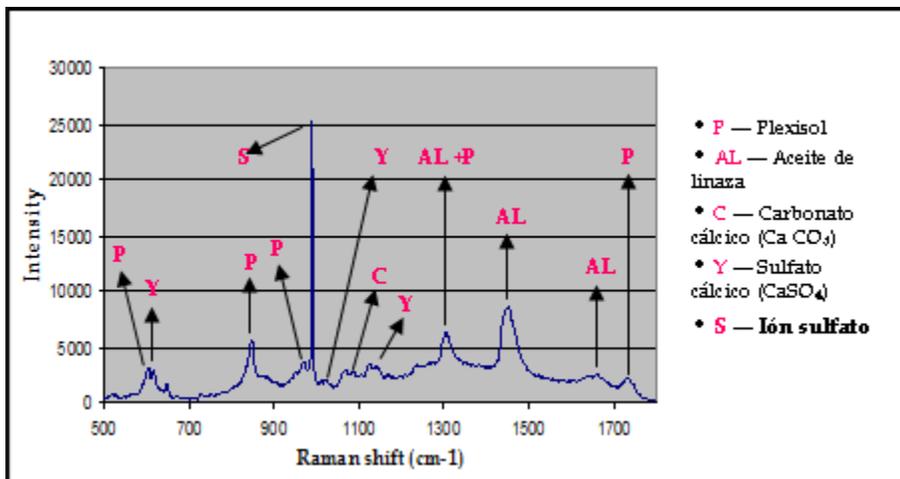


Fig. 17. Espectro Raman generado a partir de una muestra de la probeta tipo C.

PROBETA TIPO C			
Pico (cm ⁻¹)	Intensidad (U.A.)	Material	Modo de vibración del enlace
604	3077,94	Plexisol	C-O deformation
617	2923,82	Sulfato cálcico	---
848	5607,59	Plexisol	Skeletal vibration
969	3699,25	Plexisol	CH ₂ wagging
989	25329,3	Ión sulfato	---
1010	1989,44	Sulfato cálcico	---
1085	2785,57	Carbonato cálcico	---
1141	3292,25	Sulfato cálcico	---
1304	6311,86	Aceite de linaza + plexisol	$\delta(\text{CH}_2)_2$ deformation
1450	8618,42	Aceite de linaza	$\delta(\text{CH}_2)$
1661	2590,51	Aceite de linaza	$\nu(\text{C}=\text{C})$ stretching vibration of a cis dialkyl C=C double bond
1730	2249,48	Plexisol	$\nu(\text{C}=\text{C})$ stretching, CH ₂ =CCH ₃ COOR

Tabla. 12. Correspondencia entre la posición e intensidad de los picos y el material que los genera, incluyendo el tipo de enlace implicado.

En este espectro Raman encontraremos los mismos picos que en el espectro de referencia de la probeta tipo A, añadiéndole los característicos del Plexisol. De esta forma, distinguimos doce picos importantes, cuatro de ellos correspondientes al plexisol en exclusiva y uno más que comparte con el aceite de linaza en la posición 1304 cm^{-1} . La intensidad de este pico ($1311,86$) es mayor que la intensidad que este pico en el espectro de referencia de la probeta tipo B, donde corresponde tan sólo con el modo vibracional del enlace $(\text{CH}_2)_2$ del aceite de linaza. Esta mayor intensidad en el espectro representado en la **Fig. 14** se debe a la presencia de mayor número de enlaces del tipo $(\text{CH}_2)_2$, puesto que a los del plexisol se unen los del aceite de linaza.

Como ocurre en el caso anterior, la intensidad de los picos que este espectro comparte con el generado a partir del espectro de referencia de la probeta tipo A, es mayor en este último que en el caso del espectro de referencia de la probeta tipo C, lo que podría explicarse por el hecho de que la capa de esta resina, al ser la más superficial, podría enmascarar la presencia de enlaces pertenecientes a los materiales que se encuentran debajo de ella.

5.3. Análisis del espectro Raman de las probetas inoculadas.

Para cada una de las probetas inoculadas, se determinó el espectro Raman de la zona más alejada al punto de inoculación, con el fin de disponer de un control propio para cada probeta. Con esto, se trata de reducir el error debido a la distinta cantidad de los materiales que componen la muestra en diferentes zonas del lienzo.

La comparación del espectro Raman obtenido a partir de una muestra de los distintos tipos de probetas inoculadas, con el espectro de su correspondiente control, evidenciará la existencia de un proceso de biodeterioro, en caso de existir diferencias entre ambos espectros.

No se observaron diferencias sustanciales entre el espectro de las probetas tipo A, B y C inoculadas con las bacterias y hongos seleccionados y el espectro de sus respectivos controles. Tampoco se observaron diferencias al comparar el espectro de las probetas tipo B y C inoculadas con una bacteria y un hongo al mismo tiempo con el espectro de su control correspondiente. En el caso de la probeta tipo D, no se obtuvieron resultados concluyentes debido a problemas de fluorescencia.

5.3.1. Muestras de la probeta tipo A inoculadas con las bacterias y los hongos seleccionados.

a) *Arthrobacter agilis*.

En la Fig. 18 se representa el espectro Raman de una muestra de probeta tipo A inoculada con una suspensión celular de *A. agilis* tras 30 días de incubación y el espectro de su control.

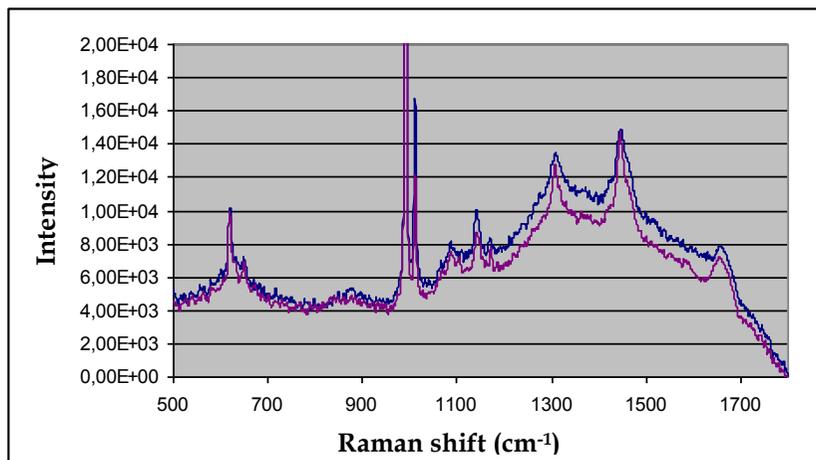


Fig. 18. Espectros Raman de la probeta tipo A inoculada con *A. agilis* (---) y de su control (---).

b) *Paucisalibacillus globulus*.

En la Fig. 19 se representa el espectro Raman de una muestra de probeta tipo A inoculada con una suspensión celular de *P. globulus* tras 30 días de incubación y el espectro de su control.

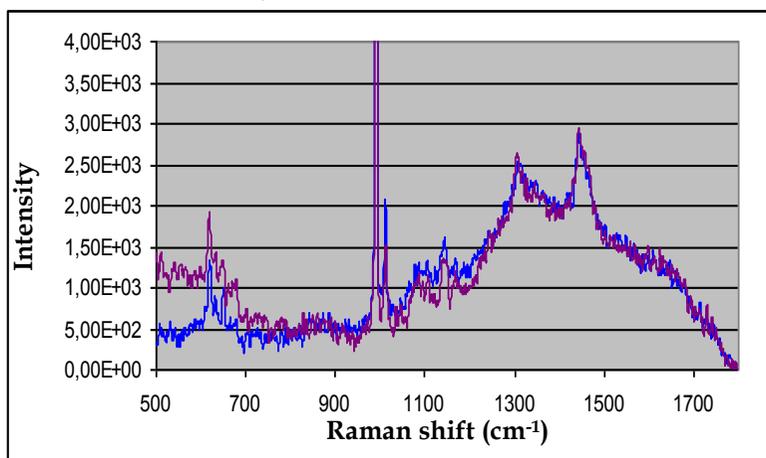


Fig. 19. Espectros Raman de la probeta tipo A inoculada con *P. globulus* (---) y de su control (---).

c) *Eurotium* sp.

En la Fig. 20 se representa el espectro Raman de una muestra de probeta tipo A inoculada con una suspensión de esporas de *Eurotium* sp. tras 30 días de incubación y el espectro de su control.

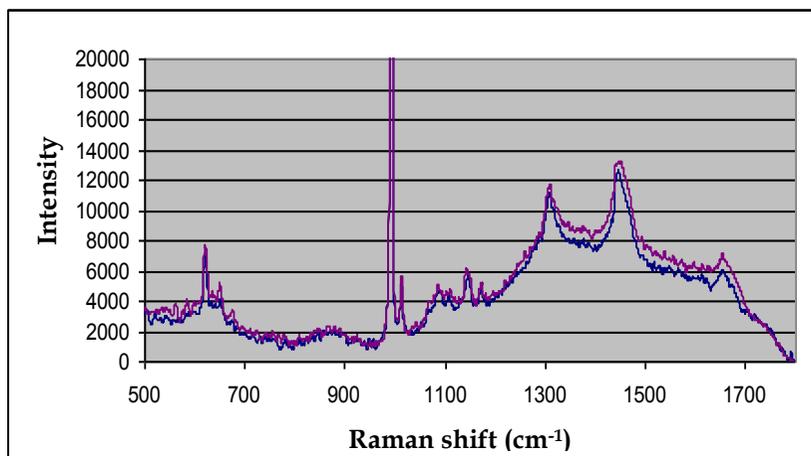


Fig. 20. Espectros Raman de la probeta tipo A inoculada con *Eurotium* sp. (---) y de su control (---).

d) *Penicillium* sp.

En la Fig. 21. se representa el espectro Raman de una muestra de probeta tipo A inoculada con una suspensión de esporas de *Penicillium* sp. tras 30 días de incubación y el espectro de su control.

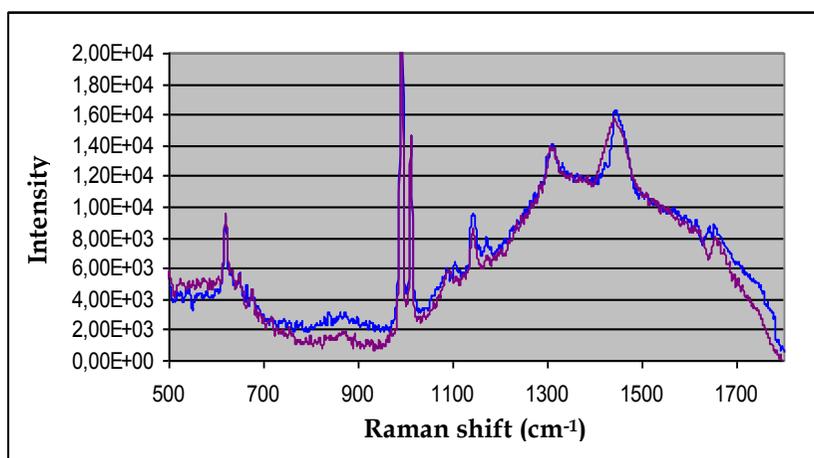


Fig. 21. Espectros Raman de la probeta tipo A inoculada con *Penicillium* sp. (---) y de su control (---).

5.3.2. Muestras de la probeta tipo B inoculadas con las distintas bacterias y hongos seleccionados.

a) *Arthrobacter agilis*.

En la Fig. 22 se representa el espectro Raman de una muestra de probeta tipo B inoculada con una suspensión celular de *A. agilis* tras 30 días de incubación y el espectro de su control.

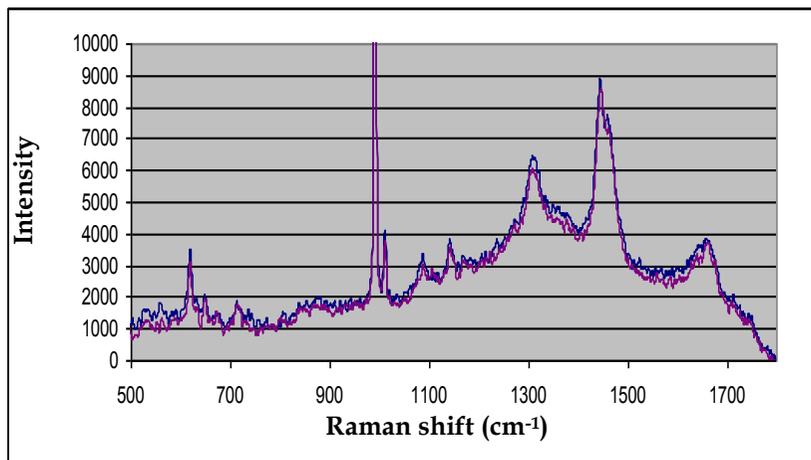


Fig. 22. Espectros Raman de la probeta tipo B inoculada con *A. agilis* (—) y de su control (—).

b) *Paucisalibacillus globulus*.

En la Fig. 23. se representa el espectro Raman de una muestra de probeta tipo B inoculada con una suspensión celular de *P. globulus* tras 30 días de incubación y el espectro de su control.

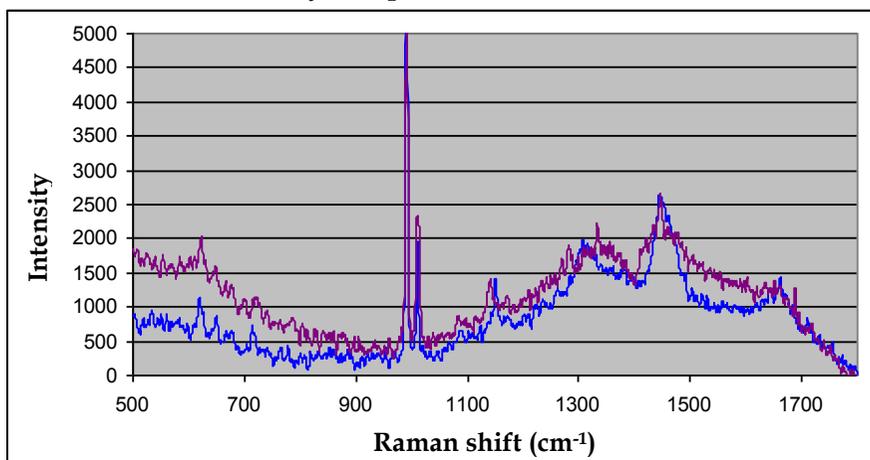


Fig. 23. Espectros Raman de la probeta tipo B inoculada con *P. globulus* (—) y de su control (—).

c) *Eurotium* sp.

En la Fig. 24. se representa el espectro Raman de una muestra de probeta tipo B inoculada con una suspensión de esporas de *Eurotium* sp. tras 30 días de incubación y el espectro de su control.

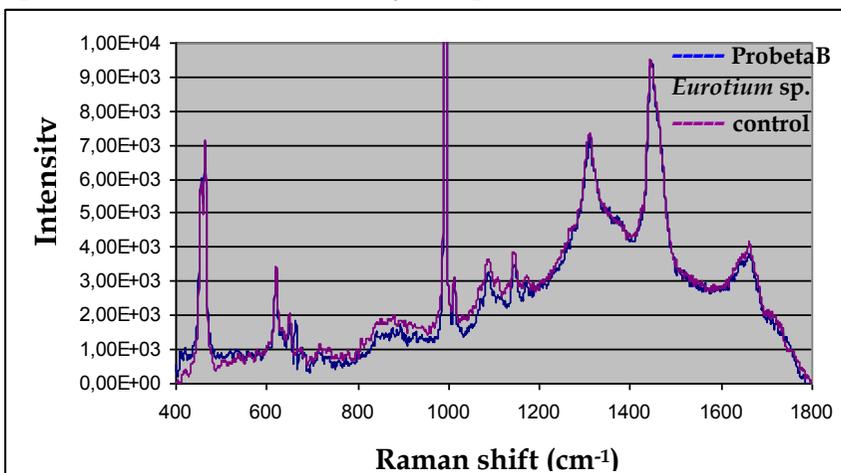


Fig. 24. Espectros Raman de la probeta tipo B inoculada con *Eurotium* sp. (---) y de su control (---).

d) *Penicillium* sp.

En la Fig. 25. se representa el espectro Raman de una muestra de probeta tipo B inoculada con una suspensión de esporas de *Penicillium* sp. tras 30 días de incubación y el espectro de su control.

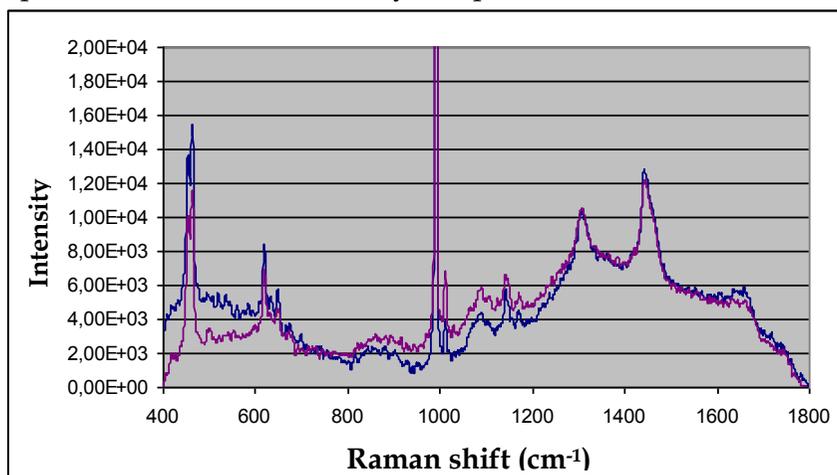


Fig. 25. Espectros Raman de la probeta tipo B inoculada con *Penicillium* sp. (---) y de su control (---).

e) *P. globulus* + *Eurotium* sp.

En la Fig. 26. se representa el espectro Raman de una muestra de probeta tipo B inoculada con con una mezcla de *P. globulus* y *Eurotium* sp. tras 30 días de incubación y el espectro del control.

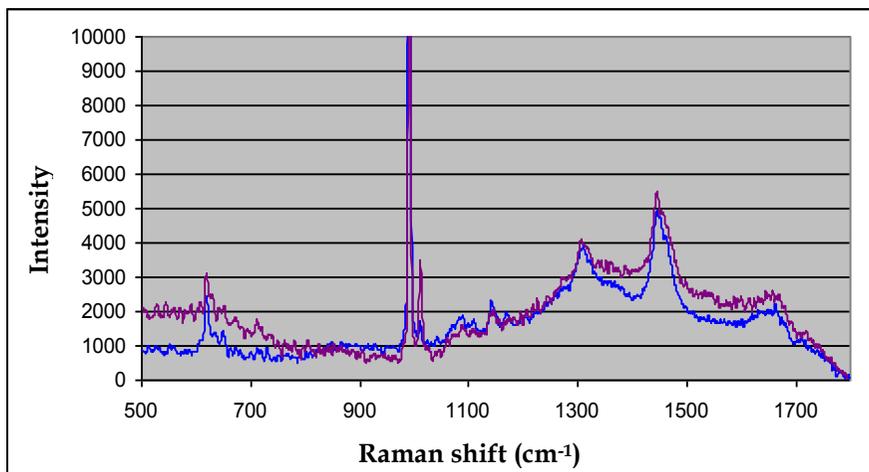


Fig. 26. Espectros Raman de la probeta tipo B inoculada con *P. globulus* + *Eurotium* sp. (---) y de su control (---).

f) *P. globulus* + *Penicillium* sp.

En la Fig. 27. se representa el espectro Raman de una muestra de probeta tipo B inoculada con una con una mezcla de *P. globulus* y *Penicillium* sp. tras 30 días de incubación y el espectro de su control.

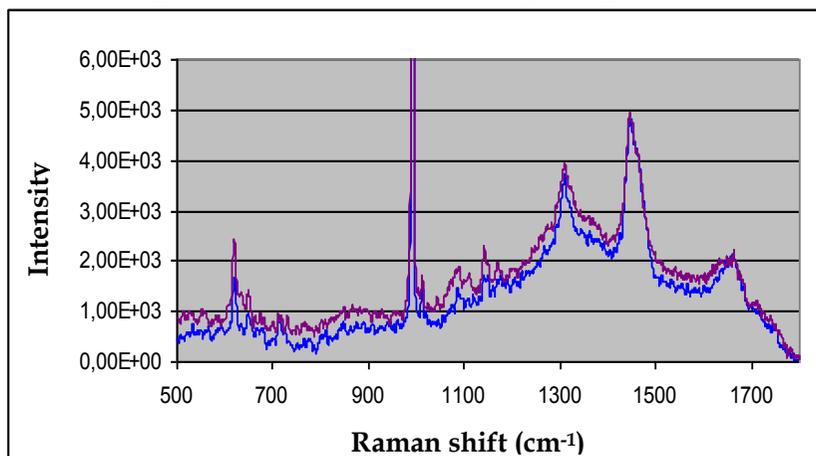


Fig. 27. Espectros Raman de la probeta tipo B inoculada con *P. globulus* + *Penicillium* sp. (---) y de su control (---).

5.3.3. Muestras de la probeta tipo C inoculadas con las distintas bacterias y hongos seleccionados.

a) *Arthrobacter agilis*.

En la Fig. 28. se representa el espectro Raman de una muestra de probeta tipo C inoculada con una suspensión celular de *Arthrobacter agilis* tras 30 días de incubación y el de su control.

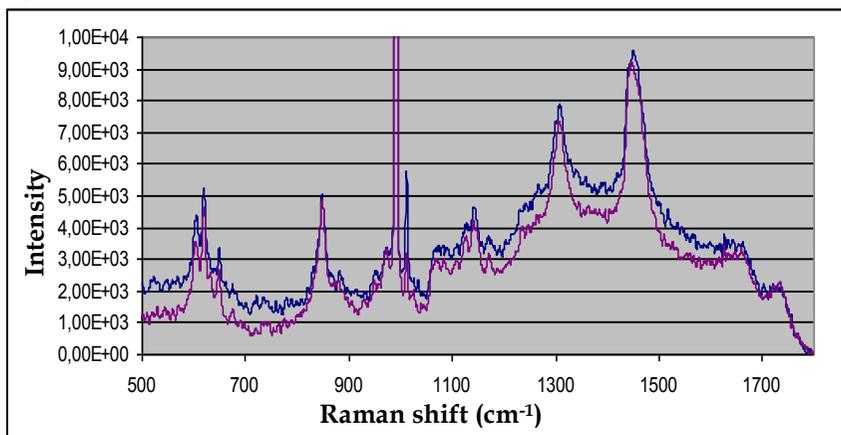


Fig. 28. Espectros Raman de la probeta tipo C inoculada con *A. agilis* (---) y de su control (---).

b) *Paucisalibacillus globulus*.

En la Fig. 29. se representa el espectro Raman de una muestra de probeta tipo C inoculada con una suspensión celular de *Arthrobacter agilis* tras 30 días de incubación y el de su control.

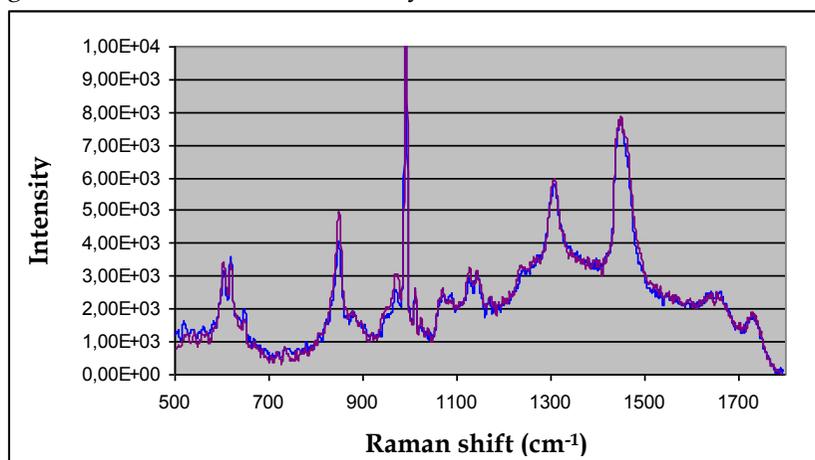


Fig. 29. Espectros Raman de la probeta tipo C inoculada con *P. globulus* (---) y de su control (---).

c) *Eurotium* sp.

En la Fig. 30. se representa el espectro Raman de una muestra de probeta tipo C inoculada con una suspensión de esporas de *Eurotium* sp. tras 30 días de incubación y el espectro de su control.

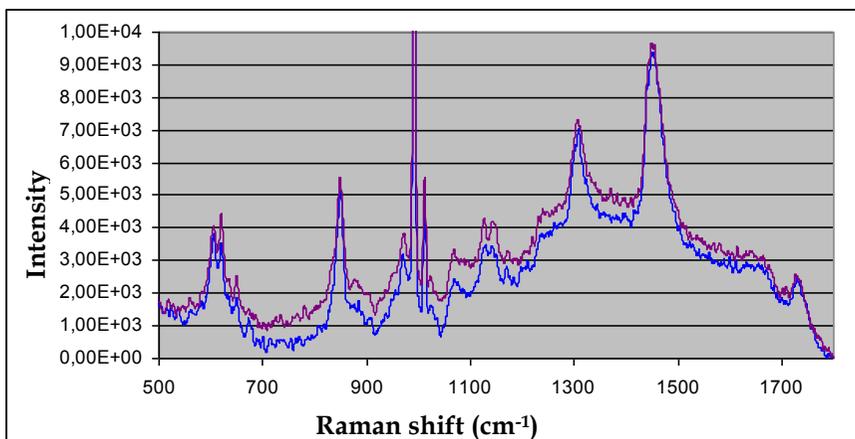


Fig. 30. Espectros Raman de la probeta tipo C inoculada con *Eurotium* sp. (—) y de su control (---).

d) *Penicillium* sp.

En la Fig. 31. se representa el espectro Raman de una muestra de probeta tipo C inoculada con una suspensión de esporas de *Penicillium* sp. tras 30 días de incubación y el espectro de su control.

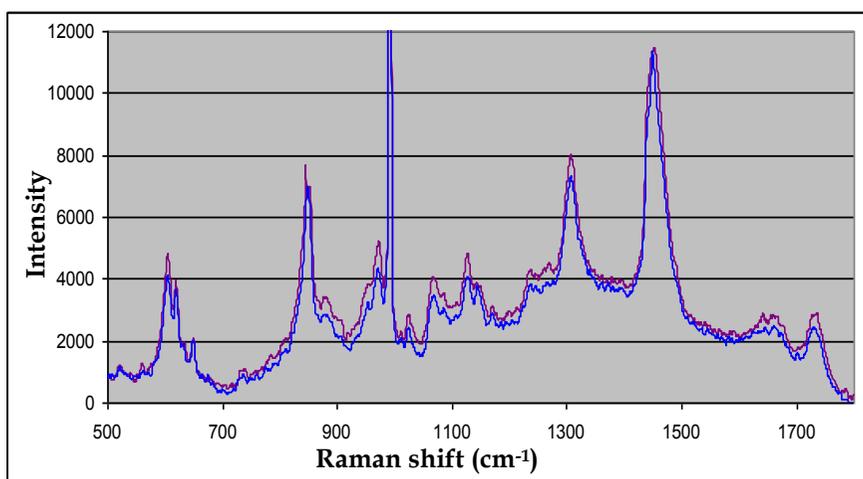


Fig. 31. Espectros Raman de la probeta tipo C inoculada con *Penicillium* sp. (—) y de su control (---).

e) *Paucisalibacillus globulus* + *Eurotium* sp.

En la Fig. 32. se representa el espectro Raman de una muestra de probeta tipo C inoculada con una mezcla de *P. globulus* y *Eurotium* sp. tras 30 días de incubación y el espectro de su control.

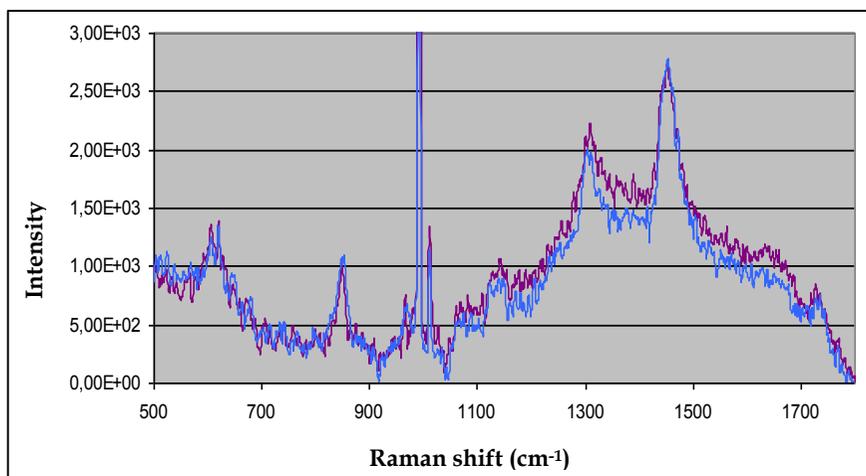


Fig. 32. Espectros Raman de la probeta tipo C inoculada con *P. globulus* + *Eurotium* sp. (-----) y de su control (-----).

f) *Paucisalibacillus globulus* + *Penicillium* sp.

En la Fig. 33. se representa el espectro Raman de una muestra de probeta tipo C inoculada con una mezcla de *P. globulus* y *Penicillium* sp. tras 30 días de incubación y el espectro de su control.

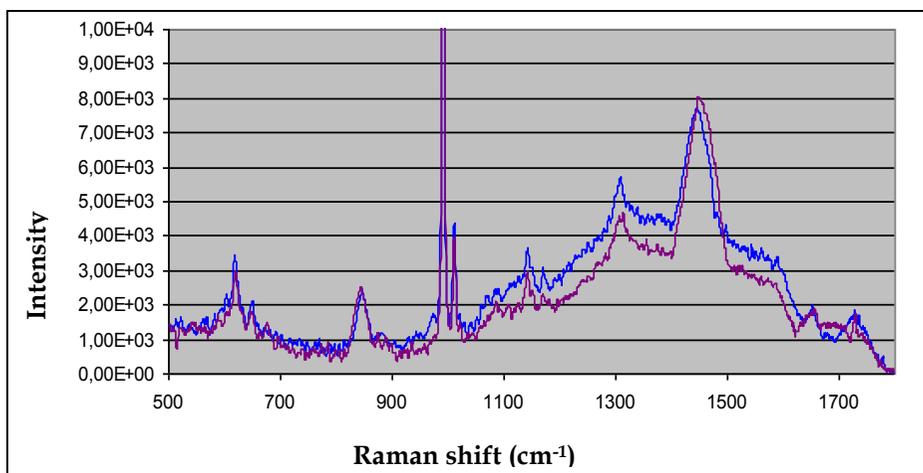


Fig. 33. Espectros Raman de la probeta tipo C inoculada con *P. globulus* + *Penicillium* sp. (-----) y de su control (-----).

DISCUSSION

El estudio de la colonización y degradación de diferentes tipos de resinas por los microorganismos, comúnmente se ha realizado empleando métodos como la observación visual, microscopía óptica o electrónica, y la medida de determinados cambios en las propiedades físicas de las mismas. Más recientemente, se han utilizado métodos espectroscópicos tales como la espectroscopía Raman o la Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) obteniendo relativamente buenos resultados (Romero-Noguera, 2007; Capitelli et al. 2005).

Aunque las comunidades microbianas presentes en obras de arte pueden llegar a ser diversas, como las de los dos lienzos estudiados en las que conviven bacterias y hongos de diferentes géneros, solo los miembros más resistentes, con bajos requerimientos nutricionales y amplia diversidad de actividades enzimáticas podrán intervenir de algún modo en su deterioro (Abrusci et al., 2005). De ahí que la caracterización enzimática de los distintos aislados bacterianos y fúngicos sea importante a la hora de valorar el potencial deteriorante de los microorganismos. Las principales enzimas microbianas relacionadas con degradación de polímeros pertenecen al grupo de las hidrolasas, siendo las lipasas, estererasas y proteasas las que se consideran más interesantes en relación con el biodeterioro.

Al caracterizar a nivel enzimático las bacterias aisladas de la obra Virgen de Guadalupe, se encontró que todas ellas presentaban actividad Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, encargada de liberar grupos fosfato al medio. Otras actividades enzimáticas detectadas con mucha frecuencia fueron la estererasa C4 (70% del total de bacterias) y la estererasa lipasa (50%), ambas relacionadas con hidrólisis de lípidos, por lo que podrían intervenir en la degradación de materiales como el aceite de linaza presentes en los óleos. Las enzimas con actividad peptidasa solo pudieron observarse en *Bacillus* sp. (VG6B4) que, concretamente, mostró actividad leucina arilamidasa. Los aislados bacterianos que presentaron mayor número de actividades enzimáticas fueron *Paucisalibacillus globulus* (VG7B4) y *Arthrobacter agilis*, (VG7B5) en los que se detectan entre otras, la actividad estererasa y estererasa lipasa. Otras enzimas como la fosfatasa ácida y la alcalina, que sólo se encuentran en *Paucisalibacillus globulus*, no desempeñarían un papel importante en el deterioro de lienzos, dada la ausencia de materiales que contengan fósforo.

El hecho de que todas las bacterias aisladas, exceptuando *Sporosarcina* sp. muestren actividad estererasa, estererasa lipasa o ambas, permite relacionarlas con el deterioro del lienzo.

Los perfiles enzimáticos de los hongos aislados a partir del mismo lienzo, ponen de manifiesto que las enzimas Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, fosfatasa ácida y Esterasa C4 aparecen en todos los casos. En cuanto a la actividad peptidasa, solo *Penicillium* sp. (VG7H3; VG5H1) y *Emericella* sp. (VG6H1) muestran actividad valina y leucina arilamidasa respectivamente. Los aislados con mayor número de actividades fueron *Penicillium* sp. (VG7H1) y *Eurotium* sp. (VG7H5). En ambos géneros encontramos las actividades esterasa y esterasa lipasa, mencionadas anteriormente. Estudios previos sobre el biodeterioro del polivinilcloruro plastificado por efecto de los hongos (Webb et al., 2000), demuestran que son capaces de producir esterases extracelulares capaces de degradar el plastificante. Otra enzima que merece especial atención es la N-acetil- β -glucosaminidasa, capaz de hidrolizar el peptidoglucano de la pared celular de bacterias, la quitina presente en la pared celular de hongos, así como determinados glicanos. Su acción combinada con la de otras enzimas (amidasa y exo-3-N-acetilmuramidasa) pueden convertir el peptidoglicano en monosacáridos que emplean como fuente de carbono ante situaciones de escasez de nutrientes (Priest, 1977).

La caracterización enzimática de las bacterias aisladas del lienzo Cristo de la Paciencia, reveló que las enzimas encontradas en mayor proporción eran la Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa (100% del total de bacterias aisladas), seguida por la Esterasa C4 (71,4%) y la esterasa lipasa (50%). Las bacterias que presentaron mayor número de actividades enzimáticas fueron *Arthrobacter agilis* (CP7B8) y *Paucisalibacillus globulus* (CP7B4; CP7B11). *Arthrobacter agilis* produce esterasa y esterasa lipasa. Otras enzimas detectadas en este aislado son la α y β -galactosidasa, relacionadas con hidrólisis de distintos azúcares, por lo que no intervendrían en el deterioro del óleo dada la ausencia de estos compuestos en el mismo. En el caso de *Paucisalibacillus globulus*, además de poseer la esterasa y esterasa lipasa como en el caso anterior, encontramos las fosfatasas ácida y alcalina, aunque ninguna de las dos desempeñaría un papel importante en el deterioro de nuestros lienzos, dada la ausencia de materiales que contengan fósforo. El resto de bacterias aisladas no presenta ninguna otra actividad enzimática, distinta a las ya mencionadas, que tenga interés a nivel de biodeterioro. La única excepción la encontraríamos en el aislado correspondiente a *Bacillus* sp. (CP6B1) que presenta actividad β -glucosidasa, enzima capaz de hidrolizar el enlace glicosídico $\beta(1\rightarrow4)$ del disacárido celobiosa, desempeñando un papel fundamental en la hidrólisis total de la celulosa al liberar moléculas de glucosa que serán empleadas como fuente de carbono.

Esta bacteria pudo haber intervenido de forma activa en el biodeterioro de la obra gracias a la posesión de esta enzima, sobre todo teniendo en cuenta el hecho de que fue aislada del reverso de la obra misma encontrándose, por tanto, en contacto directo con el lienzo de naturaleza celulósica.

En cuanto a los hongos, todas las cepas de *Penicillium* sp. mostraron un perfil enzimático muy similar. Junto con la esterasa y la esterasa lipasa encontramos también la N-acetil- β -glucosaminidasa como las más frecuentes.

Una vez analizadas las capacidades enzimáticas de bacterias y hongos de ambos lienzos, podemos concluir que los microorganismos aislados que podrían estar implicados en mayor medida en los procesos de biodeterioro de los óleos sobre lienzo, objeto de nuestro estudio, son *Paucisalibacillus globulus*, *Arthrobacter agilis* y *Penicillium* sp. Estos tres géneros comparten la capacidad de ser resistentes a condiciones ambientales adversas y la de degradar una amplia variedad de sustratos. Por ello, fueron los géneros seleccionados para el estudio experimental del biodeterioro, junto con el hongo xerofílico *Eurotium* sp.

Con el estudio experimental de biodeterioro que hemos llevado a cabo, se pretendía comprobar si las actividades enzimáticas encontradas en *Paucisalibacillus globulus*, *Arthrobacter agilis*, *Penicillium* sp. y *Eurotium* sp. les permitían crecer utilizando como nutrientes los componentes de una obra pictórica. Inicialmente, tratamos de determinar si los hongos seleccionados podían utilizar diversas resinas naturales y sintéticas como fuente de carbono, por tratarse de uno de los componentes de la obra menos estudiados. De este modo se realizó un control de la germinación y el crecimiento de las cepas elegidas sobre los soportes de cultivo con las resinas dammar, Plexisol y goma laca. En este experimento no se emplearon suspensiones bacterianas por la imposibilidad de seguir el crecimiento de las bacterias mediante microscopía óptica.

Como se ha expuesto en el apartado correspondiente de resultados, las esporas de *Eurotium* sp. son capaces de germinar y de continuar creciendo a lo largo del tiempo de incubación sobre las resinas Plexisol y goma laca. En la resina Plexisol (**Fig. 6**), la germinación parece producirse entre las 48 horas y los cinco días de incubación. Una vez que tiene lugar dicha germinación, las hifas mantienen su crecimiento más allá del quinto día. En el caso de la goma laca (**Fig. 7**), la germinación ocurre entre las 24 y

48 horas de incubación y el crecimiento de las hifas se mantiene más allá del décimo día. *Eurotium* sp. experimenta mayor crecimiento sobre la goma laca que sobre Plexisol. En ningún caso se observó que el crecimiento continuase más allá de los 30 días de incubación.

En el caso de *Penicillium* sp, observamos resultados similares para Plexisol y goma laca. En Plexisol (**Fig. 10**), la germinación parece producirse entre las 24 y 48 horas de incubación y posteriormente, las hifas mantienen su crecimiento más allá del décimo día de incubación. En el caso de la goma laca (**Fig. 11**), la germinación tiene lugar entre las 48 horas y los cinco días de incubación y el crecimiento de las hifas se mantiene más allá del décimo día. Al contrario que *Eurotium* sp., *Penicillium* sp. experimenta mayor crecimiento sobre Plexisol que sobre goma laca. En ningún caso se observó que el crecimiento continuase más allá de los 30 días de incubación.

Puesto que ambos hongos son capaces de crecer sobre Plexisol y goma laca, pero no lo hacen en los correspondientes controles, podría ocurrir que tanto *Eurotium* sp. como *Penicillium* sp. empleasen los principales componentes de estas resinas, poli-butil metacrilato en el caso del Plexisol e hidroxiácidos alifáticos y alicíclicos y sus polímeros en el caso de la goma laca, como fuente de nutrientes. No obstante, hay que hacer constar que la presencia de los hongos en la superficie de un material no implica necesariamente que sea capaz de utilizarlo como nutriente (Wainwright et al., 1993).

A lo largo de la incubación, el agua y la fuente de carbono comienzan a ser limitantes lo que origina una disminución del crecimiento hasta que finalmente tiene lugar el cese del mismo (Oliver, 1993), de ahí que no se observe un incremento del crecimiento pasados los 30 días de incubación. Esta limitación en el contenido de materia orgánica que impide el crecimiento continuo de los hongos, nos lleva a considerar el sistema experimental creado como oligotrofo, es decir pobre en nutrientes (Laiz et al., 2003). Por otro lado, estas resinas carecen de nitrógeno, fundamental para la síntesis de proteínas y otros compuestos nitrogenados, lo que convierte a este elemento en otro nutriente limitante para el crecimiento microbiano (Mas-Castella et al., 1995).

En el caso del dammar, nuestros resultados no coinciden con los publicados por Romero- Noguera et al. (2010), que fueron positivos en cuanto a la germinación de esporas de *Chrysonilia sitophila*, *Penicillium chrysogenum* y *Phoma herbarum* sobre soportes de cultivo con esta resina. Además, comprobó que se producían cambios químicos apreciables en la misma tras inocularla con los hongos citados. Se trata, no obstante, de cepas diferentes a las empleadas en nuestro estudio, por lo que podrían tener otros requerimientos a la hora de germinar. Nuestros resultados nos llevan a pensar, por tanto, que los hongos utilizados en este estudio son incapaces de degradar la resina dammar. Aún así, también la empleamos en los experimentos de espectroscopía Raman puesto que, a pesar de que en ausencia de otra fuente de carbono no puede sustentar el crecimiento de los hongos, podría ocurrir que se diese su modificación química al estar acompañada de otros materiales presentes en el lienzo.

A la vista de los resultados anteriores, quisimos comprobar si los hongos mantenían la capacidad de crecimiento en las resinas cuando éstas se encuentran formando parte de un lienzo, junto a otros materiales constituyentes habituales de los mismos. En estos experimentos, se emplearon también las bacterias *Arthrobacter agilis* y *Paucisalibacillus globulus*, previamente seleccionadas. Para ello, junto a las probetas A y B, se elaboró la probeta tipo D, que reproduce las capas y materiales presentes en el lienzo Virgen de Guadalupe, cuya estratigrafía se estudió previamente con dicha finalidad. Esta probeta, al igual que las demás modalidades se analizó mediante espectroscopía Raman.

Al comparar el espectro Raman de las distintas probetas inoculadas, de un lado con las bacterias, y de otro con los hongos, con sus controles sin inocular, se observa la ausencia de cambios en los picos principales correspondientes a los enlaces característicos de cada tipo de resina estudiada. Al decir cambio, nos referimos a la desaparición de algún pico presente en el control o a la aparición de nuevos picos ausentes en él. Estos resultados parecen indicar que ninguno de los microorganismos ensayados utilizan individualmente las resinas dammar y Plexisol. Tampoco se observan cambios en los picos de los espectros Raman correspondientes a otros componentes, principalmente orgánicos, que forman parte de las probetas, como la cola de conejo o el aceite de linaza, lo que indica que tampoco son utilizados para su crecimiento. En cuanto a las probetas inoculadas con un hongo y una bacteria de forma simultánea, tampoco se encontraron diferencias.

No pudieron obtenerse los espectros Raman generados a partir de las probetas tipo C debido a problemas de fluorescencia. Como consecuencia, no podemos asegurar que el crecimiento de los hongos seleccionados sobre los soportes con esta resina se deba a que sean capaces de utilizar la goma laca como fuente de nutrientes llevando a cabo la degradación de la misma.

Resulta contradictorio que *Eurotium* sp. y *Penicillium* sp. sean capaces de germinar y crecer sobre los soportes de cultivo con la resina Plexisol cuando ésta representa su única fuente de carbono, con la ausencia de cambios en el espectro Raman, que está indicando su incapacidad para degradarla. La explicación puede encontrarse en los posibles restos de bencina que contiene el Plexisol, ya que es frecuente que los productos comerciales contengan en su formulación otros componentes como disolventes, aditivos o impurezas. Por esta razón, el crecimiento de ambos hongos sobre los soportes de cultivo no se debería a la degradación o asimilación de la resina, sino a la de otros compuestos orgánicos más fáciles de emplear como fuente de carbono (Cappitelli et al., 2005). La bencina es un líquido incoloro, volátil e inflamable que se emplea como disolvente no polar. Se trata de un alcano, compuesto exclusivamente por carbono e hidrógeno, lo que constituye la clase de compuestos orgánicos más sencilla. Se trata de cadenas de átomos de carbono saturados de hidrógeno, cuya fórmula general es C_nH_{2n+2} . La mayoría se obtienen por destilación de distintas fracciones del petróleo. Los productos obtenidos en la biodegradación de la bencina son el óxido y monóxido de carbono (CO, CO₂).

En aquellos casos en los que el inóculo consistió en la mezcla de una suspensión bacteriana con una suspensión de esporas, a pesar de no encontrarse cambios en el espectro Raman, se comprobó que tras el periodo de incubación, los hongos continuaban siendo viables mientras que las bacterias no lo eran. Esto pudo observarse en la probeta tipo B inoculada con *Paucisalibacillus globulus* y *Eurotium* sp. y en la probeta tipo C inoculada con *Paucisalibacillus globulus* + *Penicillium* sp. y con *Paucisalibacillus globulus* + *Eurotium* sp tras la siembra en los medios de cultivo (TSA y PDA respectivamente).

Basándonos en los resultados obtenidos en los diferentes experimentos de biodeterioro que hemos realizado, podemos concluir que los hongos estudiados, a pesar de disponer de gran variedad de actividades enzimáticas, no pueden crecer sobre las probetas a base de los materiales analizados, cuando se inoculan en solitario; sí lo hacen a expensas de las células bacterianas muertas que se lisan liberando su contenido celular del que pueden nutrirse, sin tener que degradar ni las resinas ni ningún otro componente del óleo. De este modo, como defienden Guglielminetti et al. (1994), las bacterias constituyen una importante fuente de nutrientes que permiten el crecimiento fúngico. Esta situación podría generar las condiciones adecuadas para el crecimiento de bacterias heterótrofas que emplearían determinados productos originados en el metabolismo fúngico como fuente de carbono. La colonización del lienzo por bacterias heterótrofas ha sido descrita por Capodicasa et al. (2010). Quizás si se mantuviera durante más tiempo la incubación de las probetas inoculadas con bacterias y hongos simultáneamente, sería posible detectar algún cambio químico en las resinas, una vez que la comunidad microbiana estuviera bien establecida.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Cappitelli et al. (2004), en un estudio realizado mediante FTIR sobre la degradación por hongos, de diferentes resinas acrílicas (Acrylic Emulsion D 498-M, Texicryl 13-031, Emulsion F y Emulsion G) extendidas sobre soportes de vidrio. Las resinas citadas no se vieron afectadas tras ser inoculadas con hongos de colección de los géneros *Aspergillus*, *Gliocladium*, *Chaetomium*, *Aureobasidium* y *Penicillium*.

Extrapolando a la realidad los resultados obtenidos en este trabajo podríamos postular, que en el caso de las obras estudiadas, a pesar de existir comunidades microbianas de cierta complejidad, no son responsables, en el momento del estudio, del biodeterioro mostrado en los lienzos, lo cual no excluye que lo hayan sido en alguna etapa anterior, o que lo pudieran ser en el futuro, en caso de permanecer en las obras, siempre y cuando las condiciones ambientales de humedad y temperatura les fueran favorables. De otro lado, el crecimiento de los microorganismos sobre los lienzos no lleva consigo necesariamente la degradación de los materiales de la obra, toda vez que pueden utilizar otras sustancias provenientes del ambiente o proporcionadas por los propios componentes de la comunidad que configura la biopelícula superficial correspondiente.

CAPITULO IV

Conclusiones

1. Se han aislado microorganismos, bacterias y hongos, en zonas con signos visibles de deterioro a partir de dos óleos sobre lienzo titulados Virgen de Guadalupe y Cristo de la Paciencia. Ambos, de autor y época desconocidos, se localizan en la Iglesia convento de San Antón (Granada).
2. La detección y el aislamiento de los microorganismos se han realizado mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo, demostrándose que deben utilizarse de forma complementaria, dado que aisladamente ninguna de ellas detecta todos los componentes de las comunidades microbianas.
3. Los integrantes de las comunidades bacterianas de ambos lienzos pertenecen a los filos Proteobacteria, Firmicutes, y Actinobacteria. Los géneros identificados han sido los siguientes. En el cuadro Virgen de Guadalupe: *Aeromonas*, *Stenotrophomonas* y *Pseudoalteromonas*, pertenecientes al filo Proteobacteria; *Bacillus*, *Virgibacillus*, *Paucisalibacillus* y *Sporosarcina*, al filo Firmicutes y las Actinobacterias, *Brevibacterium*, *Arthrobacter* y *Microbacterium*. Además, se han detectado dos gammaproteobacterias, una Betaproteobacteria y dos firmicutes imposibles de identificar a nivel de género. En el óleo Cristo de la Paciencia encontramos los siguientes géneros: *Aquabacterium*, *Citrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Providencia*, *Delftia* y *Acinetobacter* (filo Proteobacteria); *Bacillus*, *Virgibacillus*, *Paucisalibacillus* y *Sporosarcina* (filo Firmicutes) y *Arthrobacter* y *Microbacterium* (filo Actinobacteria).
4. Los miembros de las comunidades fúngicas presentes en los lienzos pertenecen a los filos Ascomycota y Zygomycota. En el óleo Virgen de Guadalupe, se han identificado los hongos *Penicillium* sp., *Eurotium* sp., *Emericella* sp., *Ulocladium septosporum*, *Alternaria* sp., *Candida cellae*, y *Pichia pastoris* (Ascomycota) y *Mucor racemosus* (Zygomycota). Todos los hongos detectados en el lienzo Cristo de la Paciencia pertenecen al género *Penicillium*.
5. Los microorganismos aislados, bacterias y hongos, presentan diversas actividades enzimáticas, entre ellas la actividad esterasa, esterasa lipasa, N-acetil- β -glucosaminidasa y β -glucosidasa, todas ellas, relacionadas en mayor o menor medida con el biodeterioro.

6. Dado que, mediante las técnicas dependientes de cultivo no fue posible aislar miembros del filo Proteobacteria, previamente identificados mediante técnicas independientes, parece probable que se encontraran como células viables no cultivables (VCNB) en el momento de la toma de muestras. Por el contrario, la mayoría de miembros del filo Firmicutes y parte de los hongos no se detectaron mediante técnicas independientes, posiblemente debido a limitaciones en la estrategia molecular, lo que parece indicar que estos microorganismos se encuentran en estado de latencia.
7. Los hongos de los géneros *Eurotium* y *Penicillium* aislados de las obras estudiadas, germinan y crecen experimentalmente sobre soportes de vidrio con las resinas Plexisol y goma laca; por el contrario, no lo hacen sobre la resina natural dammar.
8. Los resultados de la espectroscopía Raman ponen de manifiesto que, ni las bacterias (*Arthrobacter* sp. y *Paucisalibacillus globulus*), ni los hongos (*Eurotium* sp. y *Penicillium* sp.) por separado, ni tampoco mezclas de ambos, producen cambios químicos sobre las resinas Plexisol y dammar cuando se inoculan en las probetas correspondientes. Tampoco los producen en el resto de materiales empleados en la preparación de las mismas.
9. En las probetas tipo B y C inoculadas con mezclas de *Paucisalibacillus globulus* con *Eurotium* sp. y *Paucisalibacillus globulus* con *Penicillium* sp. y *Paucisalibacillus globulus* con *Eurotium* sp., respectivamente, se comprobó que tras el periodo de 30 días de incubación, los hongos seguían siendo viables mientras que las bacterias no lo eran. No obstante, no aparecieron cambios observables en los espectros Raman correspondientes.
10. Podemos constatar que las superficies de los óleos sobre lienzo constituyen un hábitat susceptible de ser colonizado por microorganismos con características fisiológicas determinadas, tales como la halotolerancia, la xerofilia y la oligotrofia. Sin embargo, no parece que los materiales presentes en dichas superficies sean utilizados como fuente de nutrientes, al menos por los microorganismos empleados en este estudio, por lo que éstos permanecen inalterados.

CONCLUSIONS

1. The visual and microscopical inspection of samples taken from two oil on canvas, namely “Virgen de Guadalupe” and “Cristo de la Paciencia”, both located at the Closter of San Antón (Granada), showed biodeterioration signs. Further microbiological and molecular analyses revealed the presence of complex microbial communities (bacteria and fungi) associated with the deterioration phenomena.
2. The results obtained in this study highlight the inability to detect all members of the microbial communities inhabiting the painting samples by using only culture-dependent or -independent techniques, indicating the necessity to combine both of them as complementary techniques.
3. Sequence analyses performed with the samples of both paintings showed that the bacterial community members were affiliated with the same three phyla, namely *Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Actinobacteria*. 16S rDNA sequences derived from the samples obtained from the painting “Virgen de Guadalupe” were affiliated with different species of the genera *Aeromonas*, *Stenotrophomonas* and *Pseudoalteromonas*, belonging to the phylum *Proteobacteria*; with species of *Bacillus*, *Virgibacillus*, *Paucisalibacillus* and *Sporosarcina*, belonging to the phylum *Firmicutes*, and with species of the genera *Brevibacterium*, *Arthrobacter* and *Microbacterium*, belonging to the phylum *Actinobacteria*. In addition, we could detect two *Gamma-proteobacteria*, a *Beta-proteobacteria* and two *Firmicutes*. The 16S rDNA sequences detected on the samples obtained from the painting “Cristo de la Paciencia”, were affiliated with species of the genera *Aquabacterium*, *Citrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Providencia*, *Delftia* and *Acinetobacter*, belonging to the phylum *Proteobacteria*; with species of *Bacillus*, *Virgibacillus*, *Paucisalibacillus* and *Sporosarcina* belonging to the phylum *Firmicutes*, as well as with species of the genera *Arthrobacter* and *Microbacterium*, belonging to the phylum *Actinobacteria*.
4. Analyses of the non-coding ribosomal-DNA internally transcribed spacer regions (ITS-fungal regions) revealed a complex fungal community inhabiting the painting “Virgen de Guadalupe”. The retrieved sequences affiliated with different genera belonging to the phyla *Ascomycetes* and *Basidiomycetes*. Species of the genera *Penicillium*, *Eurotium*, *Emericella*, *Ulocladium*, *Alternaria*, *Candida* and *Pichia*, belonging to the phylum *Ascomycota*, as well as *Mucor racemosus*, belonging to the phylum *Zygomycota* were detected on this painting. In the contrary, sequence analyses revealed the lower diversity of the fungal communities inhabiting the painting “Cristo de la Paciencia”. All sequences showed to be affiliated with species of the genus *Penicillium* sp.

5. Fungal and bacterial strains isolated from both paintings displayed metabolic activities with potential for being responsible of the biological degradation of the paintings. The most important enzymatic activities related with deterioration processes detected on the isolated strains were esterase, esterase lipase, N-acetyl- β -glucosaminidase and β -glucosidase.
6. Our results revealed that the non-spore-forming bacteria belonging to the phylum *Proteobacteria*, detected by molecular techniques, could not be isolated by culture-dependent techniques. This group of bacteria may enter in a viable but non cultivable stage (VBNC) and therefore, were unable to grow on the supplied culture media. In the contrary, most isolated strains belonging to *Bacillus*-related genera as well as most fungal strains could not be detected by molecular means, indicating bias in the extraction of DNA from spores or even the low dominance of these species on the total microbial communities.
7. *Eurotium* and *Penicillium* were able to germinate and grow on Plexisol and shellac. However, they could not grow on glass slides (control) or on dammar.
8. Raman spectroscopy studies revealed that, neither bacteria (*Arthrobacter* sp., *Paucisalibacillus globulus*) nor fungi (*Eurotium* sp., *Penicillium* sp.), inoculated separately, were able to cause chemical changes on the tested resins (Plexisol and dammar) or on other painting materials. When one bacterium and one fungus were inoculated together, chemical changes neither occur.
9. When one bacterial and one fungal strain were inoculated together, fungi remained viable after 30 days of incubation. However, bacteria did not remain viable after this period of time. We observed this phenomenon on dammar resin inoculated with *Paucisalibacillus globulus* + *Eurotium* sp., as well as on plexisol resin inoculated with *Paucisalibacillus globulus* + *Penicillium* sp. or *Paucisalibacillus globulus* + *Eurotium* sp.
10. In conclusion, results obtained from the experiments related to biodeterioration indicate that the surface of the painting, even though susceptible to microbial colonisation, is not degraded by the microorganisms isolated from our two paintings used in this study. Only halotolerant, oligotrophs or xerophilic species are able to grow on this kind of surfaces.

BIBLIOGRAFIA

- Abrusci, C. 2005. Isolation and identification of bacteria and fungi from cinematographic films. *International Biodeterioration & Biodegradation* 56, 58–68.
- Alakomi, H.-L., Paananen, A., Suihko, M.L., Helander, I.M., Saarela, M. 2006. Weakening effect of cell permeabilizers on Gram-negative bacteria causing biodeterioration, *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4695–4703.
- Albertsson, A.C. and Karlsson, S. 1993. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 31,161.
- Altenburger, P., KVampfer, P., Makristathis, A., Lubitz, W., Busse, H.-J. 1996. Classification of bacteria isolated from a medieval wall painting. *Journal of Biotechnology* 47, 39–52.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, J.D., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389–3402.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143–169.
- Anglos, D. 2006. *Lasers for the Preservation of Cultural Heritage: Principals and Applications*; Fotakis, C., Anglos, D., Georgiou, S., Zaphiropoulos, V., Tornari, V., Eds; Francis and Taylor.
- Atlas, R.M., Chowdhury, A.N., Lal Gauri, K., 1988. Microbial calcification of gypsum-rock and sulfated marble. *Studies in Conservation* 33, 149–153.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G, Smith, J.A. and Struhl, K. 1991. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York.
- Ayerst, G. 1968. Prevention of biodeterioration by control of environmental conditions. In: *Biodeterioration of Materials*. Eds. A.H. Walters and J.J. Elphick. Elsevier Applied Science, London, 223–241.

- Baumann, P. 1968. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *J. Bacteriol.* 96:39-42.
- Bell, I.M., Clark, R.J.H. and Gibbs, P.J. 1997. Raman spectroscopic library of natural and synthetic pigments (Pre ~1850 AD). *Spectrochim Acta A*, 53, 2159-2179.
- Berner, M., Wanner, G., & Lubitz, W. 1997. A Comparative Study of the Fungal Flora Present in Medieval Wall Paintings in the Chapel of the Castle Herberstein and in the Parish Church of St Georgen in Styria, Austria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 40, No. 1, 53-61.
- Best, S.P, Clark, R.J.H., Daniels, M.A.M., Porter, C.A. and Withnall, R. 1995. *Stud. Conserv.*, 40, 31.
- Bianchi, A., Favali, M.A., Barbieri, N., Bassi, M., 1980. The use of fungicides on mould covered frescoes in San Eusebio in Pavia. *Int. Biodeterior. Bull.* 16, 45-51.
- Bitossi, G., Giorgi, R., Mauro, M., Salvadori, B. and Dei, L. 2005. *Appl. Spectrosc. Rev.* 40, 187.
- Bock, E., W. Sand, M. Meincke, B. Wolters, B. Ahlers, C. Meyer, and F. Sameluck. 1988. Biologically induced corrosion of natural stones—strong contamination of monuments with nitrifying organisms, p.436-440. In D. R. Houghton, R. N. Smith, and H. O. W. Eggin (ed.), *Biodeterioration*, vol. 7. Elsevier Applied Science, New York, N.Y.
- Bock, E. and W. Sand. 1993. The microbiology of masonry biodeterioration. *J. Appl. Bacteriol.* 74:503-514.
- Bouchard, M. and Smith, D.C. 2003. *Spectrochim. Acta Part A*, 59: 2247-2266.
- Broome, T. T. and Lowrey, E. J. 1970. Mechanism for the preservation by phenyl mercurials on wood substrates. *J. Paint Technol.*, 42, 227-36.
- Burgio, L., Ciomartan, D.A. and Clark, R.J.H. 1997. *J. Raman Spectrosc.* 28, 79.

- Burgio, L. and Clark, R.J.H. 2001. Library of FT-Raman spectra of pigments, minerals, pigment media and varnishes, and supplement to existing library of Raman spectra of pigments with visible excitation. *Spectrochimica Acta Part A*, 57, 1491–1521.
- Burrafato, G., Calabrese, M., Cosentino, A., Gueli, A. M., Troja, S. O. and Zuccarello, A. 2004. *J. Raman Spectrosc.*, 35, 879-886.
- Busse, H.J., Denner, E.B.M. and Lubitz, W. 1996. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *J. Biotechnol.* 47: 3-38.
- Camuffo, D., 1998. *Microclimate for Cultural Heritage*. Elsevier, Amsterdam. 415.
- Capodicasa, S., Fedia, S., Porcellia, A.M. and Zannoni, D. 2010. The microbial community dwelling on a biodeteriorated 16th century painting. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Volume 64, Issue 8, Pages 727-733.
- Cappitelli, F., Zanardini, E. and Sorlini, C. 2004. The Biodeterioration of Synthetic Resins Used in Conservation. *Macromol. Biosci.*, 4, 399- 406.
- Cappitelli, F., Vicini, S., Piaggio, P., Abbruscato, P., Princi, E., Casadevall, A., Nosanchuk, J.D. and Zanardini, E. 2005. Investigation of Fungal Deterioration of Synthetic Paint Binders Using Vibrational Spectroscopic Techniques. *Macromol. Biosci.*, 5, 49–57.
- Cappitelli, F., C. Sorlini, E. Pedemonte, E. Princi, and S. Vicini. 2006. Effectiveness of graft synthetic polymers in preventing biodeterioration of cellulose-based materials. *Macromol. Symp.* 238:84–91.
- Cappitelli, F. and Sorlini, C. 2008. Microorganisms Attack Synthetic Polymers in Items Representing Our Cultural Heritage. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 74, No. 3, p. 564–569.

- Capitelli, F., Fermo, P., Vecchi, R., Piazzalunga, A., Valli, G., Zanardini, E., Sorlini, C., 2009. Chemical-physical and microbiological measurements for indoor air quality assessment at the Ca'Granda Historical Archive, Milan (Italy). *Water, Air, and Soil Pollution* 201, 109-120.
- Carlyle, L. and Bourdeau, J. 1994. *Varnishes: Authenticity and Permanence. Workshop Handbook*. Ottawa: Canadian Conservation Institute, 19-20.
- Ciferri, O. 1999. Microbial degradation of paintings. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 879-885.
- Clark, J. M. 1988. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 16: 9677- 9686.
- Clark, R.J.H. 1995. Raman Microscopy: Application to the identification of pigments on medieval manuscripts. *Chem. Soc. Rev.* 24, 187-196.
- Clark, R.J.H., Cridland, L., Kariuki, B.M., Harris, K.D.M. and Withnall, R. 1995. *J. Chem. Soc. Dalton*, 16, 2577.
- Clark, R.J.H., Gibbs, P.J., Seddon, K.R., Brovenko, N.M. and Petrosyan, Y.A. 1997. Non-destructive in situ identification of cinnabar on ancient Chinese manuscripts. *J. Raman Spectrosc.*, 28, 91-94.
- Clark, R.J.H. and Cooksey, C.J. 1997. *J. Soc. Dyers Colour* 113, 316.
- Clark, R.J.H. and Gibbs, P.J. 1997. Identification of lead (II) sulphide and pararealgar on a 13th Century manuscript by Raman microscopy. *Chem. Commun.*, 1003-1004.
- Clark, R.J.H. and Gibbs, P.J. 1998. Raman microscopy of a 13th-Century illuminated text. *Anal. Chem.*, 70, 99A-104A.
- Claus, D. and Berkeley, C.W. 1986. The genus *Bacillus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2. Sneath PHA (Ed). Williams, Wilkins, Baltimore. 34: 1105-1139.

- Coupry, C., Sagon, G. and Gorguet-Ballesteros, P. 1997. *J. Raman Spectrosc.*, 28, 85.
- Crispin, C. A. and Gaylarde, C. C. 2005. Cyanobacteria and biodeterioration of cultural heritage: a review. *Microb Ecol* 49, 1-9.
- Davey, C., Gardiner, D.J., Singer, B.W. and Spokes, M. 1994a. *J. Raman Spectrosc.*, 25, 53.
- Davey, C., Lautie, A., Revault, M. and Dufilho, J. 1994b. *J. Raman Spectrosc.*, 25, 89.
- De la Rie, E.R. 1988. Photochemical and thermal degradation of films of dammar resin. *Studies in Conservation*, 33, 53-70.
- DeLong, E.F. 2005. Microbial community genomics in the ocean. *Nat Rev Microbiol* 3, 459-469.
- DeLong, E.F., Karl, D.M. 2005. Genomic perspectives in microbial oceanography. *Nature* 437:336-342.
- De los Ríos, A., Galván, V., Ascaso, C. 2004. In situ microscopical diagnosis of biodeterioration processes at the convent of Santa Cruz la Real, Segovia, Spain. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54: 113 - 120.
- De Paolis, M.R. and Lippi, D. 2008. Use of metabolic and molecular methods for the identification of a *Bacillus* strain isolated from paper affected by foxing. *Microbiol Res* 163:121-131.
- Doménech-Carbó, M.T. 2008. Novel analytical methods for characterising binding media and protective coatings in artworks *analytica chimica acta* 621, 109-139.
- Edwards, H.G.M. and Farwell, D.W. 1995. *Spectrochim. Acta A* 51, 2073.
- Edwards, H.G.M. and Falk, M.J. 1997. *Spectrochim. Acta A* 53, 2393.
- Edwards, H.G.M., Farwell, D.W. and Webster, D. 1997a. *Spectrochim. Acta A* 53, 2383.

- Edwards, H.G.M., Farwell, D.W., Holder, J.M. and Lawson, E.E. 1997b. *Spectrochim. Acta A* 53, 2403.
- Edwards, H.G.M., Drummond, L. and Russ, J. 1998. Fourier-transform Raman spectroscopic study of pigments in native American Indian rock art: Seminole Canyon. *Spectrochim. Acta A*, vol 54, 1849-1856.
- Edwards, H.G.M. and Chalmers, J.M. 2005 (eds). *Raman Spectroscopy in Archaeology and Art History*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge.
- Ettenauer, J., Sterflinger, K., Piñar, G. 2010. Cultivation and molecular monitoring of halophilic microorganisms inhabiting an extreme environment presented by a salt-attacked monument. *International Journal of Astrobiology*, 9, 59-72.
- Ettenauer, J.D., Pinar, G. and Sterflinger, K. Microbial community inhabiting deteriorated stones of the Closter of San Jeronimo in Granada, Spain (Unpublished).
- Ettenauer, J.D., Pinar, G., Sterflinger, K. and Lubitz, W. Detection of halophilic bacteria and archaea on the extreme environment presented by salt attacked monuments (Unpublished).
- Feller, R.L. 1986. (Ed.), *Artists' Pigments, Vol. 1*, Cambridge University Press, pp. 7-15.
- Felske, A., Wolterink, A., Van Lis, R., Akkermans, A.D.L., 1998. Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in Drentse A grassland soils (The Netherlands). *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 871-879.
- Farmer, J. 1981. The genus *Citrobacter*. In *The Prokaryotes*, 1st edn, pp. 1140-1147. Edited by M. O. Starr, H. Stolp, H. Triiper, A. Balows & H. G. Schlegel. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- Fischer, S. G., and L. S. Lerman. 1983. DNA fragments differing by single basepair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1579-1583.

- Flannigan, B., Samson, R.A., Miller J.D. 2002. *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments: Diversity, Health Impacts, Investigation and Control*. CRC Press, 504.
- Flemming, H.C. 1998. Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials. *Polym. Degrad. Stabil.* 59:309– 315.
- Franquelo, M.L., Duran, A., Herrera, L.K., Jimenez de Haro, M.C. and Perez-Rodriguez, J.L. 2009. Comparison between micro-Raman and micro-FTIR spectroscopy techniques for the characterization of pigments from Southern Spain Cultural Heritage. *Journal of Molecular Structure*, 924–926, 404–412.
- Frisvad, J.C., Gravesen, S., 1994. *Penicillium and Aspergillus from Danish homes and working places with indoor air problems: identification and mycotoxin determination*. In: Samson, R.A., Flannigan, B., Flannigan, M.E., Verhoeff, P. (Eds.), *Health Implications of Fungi in Indoor Air Environment*. Elsevier, Amsterdam, pp. 281–290.
- García-Izquierdo, C., Gil-Sotres, F., Harnández-Fernández, T. and Trasar-Cepeda, C. 2003. *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos*. Ed. española.
- Gallo, F. 1985. *Biological factors in the deterioration of books*, Technical Notes. ICCROM, Rome.
- Gardiner, D.J., Singer, B.W. and Derow, J.P. 1993. *Pap. Conserv.*, 17, 13.
- Gauthier, G., Gauthier, M. and Christen, R. 1995. Phylogenetic Analysis of the Genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* Using Genes Coding for Small-Subunit rRNA Sequences and Division of the Genus *Alteromonas* into Two Genera, *Alteromonas* (Emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and Proposal of Twelve New Species Combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology.*, 45, 755-761.
- Gayo, M.D. 1996. *Pigmentos y colorantes presentes en los bienes culturales, toma de muestras y métodos de análisis*, in *Técnicas de diagnóstico aplicadas a la conservación de los bienes muebles*, IAPH Sevilla, 119–133.

- Gerald, K. 2005. *Biología Celular y Molecular, Conceptos y Experimentos*. Cuarta Edición, Editorial McGraw Hill. México.
- Giacobini, C., Pietrini, A.M., Ricci, S. and Roccardi, A. 1987. *Boll. d'Arte, Suppl.* 41, 53.
- Gibb, G. D. and Strohl, W. R. 1987. Physiological regulation of protease activity in *Streptomyces peucetius*. *Can. J. Microbiol.* 34, 187-190.
- Gillan, D.C., Speksnijder, A.G.C.L., Zwart, G., De Ridder, C., 1998. Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca, Bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3464-3472.
- Gillat, J. 1990. The biodeterioration of polymer emulsions and its prevention with biocides. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 26, 205.
- Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L., Field, K.G. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature (London)* 345, 60-63.
- Gomez, M.L. 1988. *La restauración. Examen científico aplicado a la conservación de obras de arte*, Ed. Cátedra, 436.
- González, I., Laiz, L., Hermosin, B., Caballero, B., Incerti, C., Saiz- Jiménez, C., 1999. Bacteria isolated from rock art paintings: the case of Atlanterra shelter (south Spain). *Journal of Microbiological Methods* 36, 123-127.
- Gonzalez JM, Laiz L, Saiz-Jimenez C. 2003. Classifying bacterial isolates from hypogean environments: application of a novel fluorimetric method for the estimation of G + C mol% content in microorganisms by thermal denaturation temperature. In: Saiz- Jimenez C (ed) *Molecular biology and cultural heritage*. Swets & Zeitlinger BV, Lisse, pp 47-54
- Göpferich, A. 1996. Mechanism of polymer degradation and erosion, *Biomaterials* 17, 103-114.

- Gorbushina, A.A., Heyrman, J., Dorniedena, T., Gonzalez-Delvalle, M., Krumbein, W.E., Laiz, L., Petersen, K., Saiz-Jimenez, C., Swings, J. 2004. Bacterial and fungal diversity and biodeterioration problems in mural painting environments of St. Martins church (Greene-Kreienzen, Germany). *International Biodeterioration & Biodegradation* 53, 13 - 24.
- Griffin, P.S., N. Indictor and R.J. Koestler. 1991. The biodeterioration of stone: a review of deterioration mechanisms, conservation case histories, and treatment. *Int. Biodeterior.* 28:187-207.
- Guglielminetti, M., C. De Giuli Morghen, A. Radaelli, F. Bistoni, G. Carruba, G. Spera, and G. Caretta. 1994. Mycological and ultrastructural studies to evaluate biodeterioration of mural paintings. Detection of fungi and mites in frescos of the monastery of St. Damian in Assisi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 34, 269-283.
- Guineau, B. 1984. *Stud. Conserv.*, 29, 35.
- Guineau, B. 1989. *Stud. Conserv.*, 34, 38.
- Gurtner, C., Heyrman, J., Piñar, G., Lubitz, W., Swings, J., Rölleke, S. 2000. Comparative analyses of the bacterial diversity on two different biodeteriorated wall paintings by DGGE and 16S rDNA sequence analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46, 229-239.
- Hakkarainen, M., Karlsson, S. and Albertsson, A.C. 2000. Rapid (bio)degradation of polylactide by mixed culture of compost microorganisms - low molecular weight products and matrix changes, *Polymer* 41, 2331-2338.
- Heuer, H., Hartung, K., Wieland, G., Kramer, I. and Smalla, K. 1999. Polynucleotide Probes That Target a Hypervariable Region of 16S rRNA Genes To Identify Bacterial Isolates Corresponding to Bands of Community Fingerprints. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 65, No. 3, 1045-1049.

- Heyndrickx, M., Lebbe, L., Kersters, K., De Vos, P., Forsyth, G. and Logan, N.A. 1998. *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*. International Journal of Systematic Bacteriology, 48, 99-106.
- Heyrman, J., Mergaert, J., Denys, R., and Swings, J. 1999. The use of fatty methyl ester analysis (FAME) for the identification of heterotrophic bacteria present on three mural paintings showing severe damage by microorganisms. FEMS Microbiol Lett 181: 55-62.
- Heyrman, J. and Swings, J. 2001. 16S rDNA sequence analysis of bacterial isolates from biodeteriorated mural paintings in the Servilia tomb (Necropolis of Carmona, Seville, Spain). Syst. Appl. Microbiol. 24 (3), 417-422.
- Heyrman, J., Verbeeren, J., Schumann, P., Devos, J., Swing, J., De Vos, P., 2004. *Brevibacterium picturae* sp. nov. Isolated from a damaged mural painting at the Saint-Catherine chapel (Castle Herberstein, Austria). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 1537-1541.
- Heyrman, J., Logan, N.A., Rodríguez-Díaz, M., Scheldeman, P., Lebbe, L., Swings, J., Heyndrickx, M. and De Vos, P. 2005. Study of mural painting isolates, leading to the transfer of '*Bacillus maroccanus*' and '*Bacillus carotarum*' to *Bacillus simplex*, emended description of *Bacillus simplex*, re-examination of the strains previously attributed to '*Bacillus macroides*' and description of *Bacillus muralis* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55, 119-131.
- Holton, T. A., and Graham, M. W. 1991. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. Nucleic Acids Res. 19: 1156.
- Hong, S-B., Go, S-J., Shin, H-D., Frisvad, J., Samson, R.A. 2005. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. Mycologia. 97, 1316-1329.

- Hu, G. 1993. DNA polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucleotides to the 3' end of a DNA fragment. *DNA Cell Biol.* 12: 763-770.
- Hu, X. and Kawai, F. Plastic degrader screen and gene clone (Unpublished).
- Hueck, H.J. 1965. The biodeterioration of materials as part of mycobiology, *Mater Org.*, 1(1), 5-34
- Hueck, H.J. 1968. The biodeterioration of materials – an appraisal. In *Biodeterioration of Materials*. Eds. Walters, A.H. and Elphick, J.S. Elsevier, London, pp. 6-12.
- Hueck, H.J. 2001. The biodeterioration of materials: an appraisal, *Int. Biodeter. Biodegr.* 48, pp. 5-11.
- Hyvärinen A, Meklin T, Vepsäläinen A, Nevalainen A. 2002. Fungi and actinobacteria in moisture-damaged building materials – concentrations and diversity. *Int Biodeter Biodegrad* 49:27–37.
- Inoue, M. & Koyano, M. 1991. Fungal Contamination of Oil Paintings in Japan. *International Biodeterioration* 28, 23-35.
- Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W. and Reetz M.T. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structure and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 315- 351.
- Jang, M-S., Jung, B-G, Sung, N-C. and Lee, Y-C. 2007. Decolorization of textile plant effluent by *Citrobacter* sp. strain KCTC 18061P. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 53, 339–343.
- Jenings, D.H. and Lysek, G. 1996. *Fungal Biology: Understanding the Fungal Lifestyle*, BIOS Scientific Publisher, Oxford, 63–65.
- Jroundi, F., Fernández-Vivas, A., Rodríguez-Navarro, C., J. Bedmar, E. and González-Muñoz, M.T. 2010. Bioconservation of Deteriorated Monumental Calcarenite Stone and Identification of Bacteria with Carbonatogenic Activity. *Microbial Ecology* Volume 60, Number 1, 39-54.

- Juni, E. 1978. Genetics and physiology of *Acinetobacter*. *Annu. Rev. Microbiol.* 32:349-371.
- Kang H-W, Park D-S, Go S-J, Eun M-Y. 2002. Fingerprinting of diverse genomes using PCR with universal rice primers generated from repetitive sequence of Korean weedy rice. *Mol Cells* 13:281-287.
- Karamanos, Y. 1997. Endo-N-acetyl-beta-D-glucosaminidases and their potential substrates: structure/function relationships. *Res. Microbiol.*, 8, 661-71.
- Kay, M.J., McCabe, R.W. and Morton, L.H.G. 1993. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 31, 209.
- Klausmeier, R.E. and Andrews, C.C. 1981. *Plastic. Microbial biodeterioration. Academic press*, 431-474.
- Koestler, R.J. and Santoro, E.D. 1988. Assessment of the susceptibility to biodeterioration of selected polymers and resins. In: final report submitted to the Getty Conservation Institute.
- Kowalchuk, G.A., Gerards, S., Woldendorp, J.W., 1997. Detection and characterisation of fungal infections of *Ammophila arenaria* (marram grass) roots by denaturing gradient gel electrophoresis of specifically amplified 18S rDNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3858-3865.
- Kowalchuk, G.A., 1999. New perspectives towards analysing fungal communities in terrestrial environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 247-251.
- Kreader, C.A. 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (3), 1102-1106.
- Krumbein, W.E., Petersen, K., 1990. Mikroorganismen beschleunigen den Zerfall mittelalterlicher Wandgemälde. *Wandmalereischaden Arbeitshefte Denkmalpflege Niedersachsen* 8, 115-121.

- Krumbein, W.E., Urzi, C., Gehrmann, C., 1991. Biocorrosion and biodeterioration of antique and medieval glass. *Geomicrobiol. J.* 9, 139-165
- Krumbein, W. E., and M. Gross. 1992. Interactions of biocides with cultures of biodeteriorating microbiota in agar diffusion and rock tube tests, 501- 509. In J. D. Rodrigues, F. Henriques, and F. T. Jeremias (ed.), *Proceedings of the Fifth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*. Laboratorio Nacional de Engenharia Civil, Lisbon, Portugal.
- Kumar, R., Singh, D. and Kumar, A. Lipase production & culture optimization by response surface methodology by soil isolate RK 31 (Unpublished).
- Laiz, L., Hermosin, B., Caballero, B., and Saiz-Jimenez, C. 2002. Facultatively oligotrophic bacteria in Roman mural paintings. In *Protection and Conservation of the Cultural Heritage of the Mediterranean Cities*. Galan, E., and Zezza, F. (eds). Lisse: Balkema Publications, pp. 173-178.
- Laiz, L., Piñar, G., Lubitz, W., Saiz-Jimenez, C., 2003a. Monitoring the colonisation of monuments by bacteria: cultivation versus molecular methods. *Environmental Microbiology* 5, 72-74.
- Laiz, L., Piñar, G., Lubitz, W. and Saiz-Jimenez, C. 2003b. The colonisation of building materials by microorganisms as revealed by culturing and molecular methods. In: Saiz Jimenez C (ed) *Molecular biology and cultural heritage*. Swets & Zeitlinger BV, Lisse, 23-28.
- Lascaux Restauro. 1989. Lascaux® Acrylic Resin P 550-40 TB R113(1 July).
- Lazar, I. 1971. Investigations on the presence and role of bacteria in deteriorated zones of Cozia Monastery painting. *Rev. Roum. Biol. Ser. Bot.*16:437-444.
- Leznicka, S. 1992. Antimicrobial protection of stone monuments with phydroxybenzoic acid esters and silicone resin, 481-490. In J. D. Rodrigues, F. Henriques, and F. T. Jeremias (ed.), *Proceedings of the Seventh International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*. Laboratorio Nacional de Engenharia Civil, Lisbon, Portugal.

- Li-Chan, E.C.Y. 1996. *Trends Food Sci. Technol.*, 7, 361-370.
- Lindström, A., Albertsson A-C. and Hakkarainen, M. 2004. Development of a solid-phase extraction method for simultaneous extraction of adipic acid, succinic acid and 1, 4- butanediol formed during hydrolysis of poly(butylene adipate) and poly(butylene succinate), *J. Chromatogr. A* 1022 (1-2), 171-177.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H. and Forney, L.J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63:4516-4522.
- Lomax, S.Q. and S.L. Fisher. 1990. An Investigation of the removability of naturally aged synthetic picture varnishes. *Journal of the American Institute for Conservation* 29(2), 181-91.
- Lord, N.S., Kaplan, C.W., Shank, P., Kitts, C.L., Elrod, S.L., 2002. Assessment of fungal diversity using terminal restriction fragment pattern analysis: comparison of 18S and ITS ribosomal regions. *FEMS Microbiology Ecology* 42, 327-337.
- Lott, T. J., R. J. Kuykendall, and E. Reiss. 1993. Nucleotide sequence analysis of the 5.8S rDNA and adjacent ITS2 region of *Candida albicans* and related species. *Yeast* 9:1199-1206.
- Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F. and Nava-Saucedo, J.E. 2008. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques- A review. *Chemosphere Volume* 73, Issue 4, 429-442.
- Ludwig, W. and K.H. Schleifer. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 155- 173.
- Lugauskas, A., Levinskaite, L. and Peciulyte, D. 2003. Micromycetes as deterioration agents of polymeric materials, *Int. Biodeter. Biodegr.* 52, 233-242.
- Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A. and Collins, F. S. 1991. Construction of T- vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* 19: 1154.

- Marvasi, M., Vedovato, E., Balsamo, C., Macherelli, A., Dei, L., Mastromei, G., Perito, B. 2009. Bacterial community analysis on the Medieval stained glass window "Natività" in the Florence Cathedral. *Journal of Cultural Heritage*, 10; 124-133.
- Mas-Castella, J., Urmeneta, J., Lafuente, R., Navarrete, A., Guerrero, R., 1995. Biodegradation of poly- β -hydroxyalkanoates in anaerobic sediments. *International Biodeterioration & Biodegradation* 35, 155-174.
- Masschelein-Kleiner, L. 1992. *Liants, vernis et adhésifs anciens*. Institut Royal du Patrimoine Artistique, Bruxelles, 86-100.
- Mayer, R. 1985. *The artist's handbook of materials and techniques*. 1^a ed. Blume, Madrid, 156-185.
- Mead, D.A., Pey, N.K., Herrnstadt, C., Marcil, R.A. and Smith, L.M. 1991. A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. *Bio/Technology*. 9, 657-663.
- Mezei, L.M. and Stor ts, D.R. 1994. Cloning PCR products. In: *PCR Technology, Current Innovations*. H.G.Griffin y A.M.Griffin (Eds.) CRC Press, Florida, 21-27.
- Michaelsen, A., Pinzari, F., Ripka, K., Lubitz, W., Piñar, G., 2006. Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonising paper material. *International Biodeterioration and Biodegradation* 58, 133-141.
- Michaelsen, A., Piñar, G., Montanari, M., Pinzari, F. 2009. Biodeterioration and restoration of a 16th-century book using a combination of conventional and molecular techniques: A case study. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 63, 161- 168.
- Michaelsen, A., Piñar, G. and Pinzari, F. 2010. Molecular and Microscopical Investigation of the Microflora Inhabiting a Deteriorated Italian Manuscript Dated from the Thirteenth Century. *Microb Ecol.*, 60:69-80.
- Miller AZ, Laiz L, Gonzalez JM, Dionísio A, Macedo MF, Saiz-Jimenez C. 2008. Reproducing stone monument photosynthetic-based colonization under laboratory conditions. *Sci. Total Environ.* 405, 278-285.

- Mills, J., and R.White. 1987. The organic chemistry of museum objects. London: Butterworths. 99-101.
- Mills, J.S. and White, R. 1994. The Organic chemistry of museum objects. London: Butterworths.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695- 700.
- Muyzer, G. & Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 127-141.
- Myers, R. M., S. G. Fischer, L. S. Lerman, and T. Maniatis. 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC- clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 13:3131-3145.
- Nakajima-Kambe, T., Shigeno-Akutsu, Y., Nomura, N., Onuma, F. and Nakahara, T. 1999. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 134.
- Navas, N., Romero-Pastor, J., Manzanoa, E. and Cardell, C. 2008. Benefits of applying combined diffuse reflectance FTIR spectroscopy and principal component analysis for the study of blue tempera historical painting. *Analytica chimica acta* 630, 141- 149.
- Nevin, A., Cather, S., Anglos, D. and Fotakis, C. 2006. *Anal. Chim. Acta*, 573, 341-346.
- Nevin, A., Osticioli, I., Anglos, D., Burnstock, A., Cather, S. and Castellucci, E. 2007. Raman Spectra of Proteinaceous Materials Used in Paintings: A Multivariate Analytical Approach for Classification and Identification. *Anal. Chem.*, 79, 6143-6151.
- Nielsen, J. 2003. It is all about metabolic fluxes. *J. Bacteriol.*, 185, 7031- 7035
- Nugari, M.P. and Priori, G.F. 1985. Resistance of acrylic polymers to microorganisms- first part. Vth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone. Lausanne, 25-27 Sept. 685-693.

- Nugari, M.P., Realini, M., Roccardi, A., 1993. Contamination of mural paintings by indoor airborne fungal spores. *Aerobiologia* 9, 131-139.
- Nuhoglu, Y., Oguz, E., Uslu, H., Ozbek, A., Ipekoglu, B., Ocak, I. and Hasenekoglu, I. 2006. The accelerating effects of the microorganisms on biodeterioration of stone monuments under air pollution and continental-cold climatic conditions in Erzurum, Turkey, *Sci. Total Environ.* 364, pp. 272-283.
- Nunes, I., Tiago, I., Pires, A.L., da Costa, M.S., and Verissimo, A. 2006. *Paucisalibacillus globulus* gen. nov., sp. nov., a Gram-positive bacterium isolated from potting soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:1841-1845.
- O'Grady, A., Dennis, D., Denvir, D., McGarvey, J. and Bell, S. 2001. *Anal. Chem.*, 73, 2058-2065.
- Oh, Y. S., Shih I. L., Tzeng, Y. M. and Wang, S. L. 2000. Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes. *Enzymes Microb. Technol.* 27, 3-10.
- Oliver, J. D. 1993. Formation of viable but nonculturable cells, In *Starvation in Bacteria*, ed. S. Kjelleberg. Plenum Press, New York, 239-272.
- Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J. and Pace, N.R. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal approach. *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 337-365.
- Osticioli, I., Zoppi, A. and Castelucci, E.M. 2006. *J. Raman Spectrosc.*, 37, 974-980.
- Palla, F., Anello, L., Pecorella, S., Russo, R. and Damian, F. 2003. Characterization of bacterial communities on stone monuments by molecular biology tools. In: Saiz-Jimenez C (ed) *Molecular biology and cultural heritage*. Swets & Zeitlinger BV, Lisse, pp 115-118.
- Palleroni, N.J. and Bradbury, J.F. 1993. *Stenotrophomonas*, a New Bacterial Genus for maltophilia (Hugh 1980) Swings et al. *Xanthomonas* 1983. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43, 606-609.

- Pankhurst, E.S., Davies, M.J. and Blake, H.M. 1972. The ability of polymers or materials containing polymers to provide a source of carbon for selected microorganisms. In: *Biodeterioration of material* 2, 76-90.
- Pemberton, J.M., Stephen P. Kidd, Radomir Schmidt. 1997. Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiology Letters*, 152, 1-10.
- Pepe, O., Sannino, L., Palomba, S., Anastasio, M., Blaiotta, G., Villania, F., Moschetti, G. 2010. Heterotrophic microorganisms in deteriorated medieval wall paintings in southern Italian churches. *Microbiological Research* 165, 21 – 32.
- Percival, S., Chalmers, R., Embrey, M., Hunter, P., Sellwood, J. and Wyn-Jones, P. 2004. *Acinetobacter*. *Microbiology of Waterborne Diseases*, 21-28.
- Petushkova, J. P. and Lyalikova, N.N. 1986. Microbiological degradation of lead- containing pigments in mural paintings. *Stud. Conserv.* 31:65–69.
- Piñar, G., Lubitz, W. 2004. *Molecular Techniques: Application to the Analysis of Microbial Communities Colonising Art Works and to the Monitoring of Changes. Case Study: Wall Paintings of the Castle of Herberstein*. In: M. Drdác (ed.), *European Research on Cultural Heritage. State-of-the-Art Studies*. 2, 421-432; Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague; ISBN 80-86246-23-X
- Piñar G, Gurtner C, Lubitz W, Rölleke S. 2001a. Identification of archaea in objects of art by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and shotgun cloning. *Methods Enzymol.*
- Piñar, G., C. Saiz-Jimenez, C. Schabereiter-Gurtner, M.T. Blanco-Varela, W. Lubitz, and S. Rölleke. 2001b. Archaeal communities in two disparate deteriorated ancient wall paintings: detection, identification and temporal monitoring by denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 37, 45-54.
- Piñar, G., C. Ramos, S. Rölleke, C. Schabereiter-Gurtner, D. Vybiral, W. Lubitz and E. B. M. Denner. 2001c. Detection of indigenous *Halobacillus* populations in damaged ancient wall paintings and building materials: molecular monitoring and cultivation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4891-4895.

- Piñar, G., Ripka, K., Weber, J., Sterflinger, K. 2009. The micro-biota of a sub-surface monument the medieval chapel of St. Virgil (Vienna, Austria). *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, 851–859.
- Piñar, G. and Sterflinger, K. 2009. Microbes and buildings materials. *Building Materials*, chapter 4, ISBN 978-1-60741-082-9.
- Piñar, G., Jimenez-Lopez, G., Sterflinger, K., Ettenauer, J., Jroundi, F., Fernandez-Vivas, A. and Gonzalez-Muñoz, M.T. 2010. Bacterial Community Dynamics During the Application of a *Myxococcus xanthus*-Inoculated Culture Medium Used for Consolidation of Ornamental Limestone. *Microb Ecol*, 60: 15– 28.
- Portillo, M.C., Gonzalez, J.M., Saiz-Jimenez, C. 2008. Metabolically active microbial communities of yellow and grey colonizations on the walls of Altamira Cave, Spain. *J. Appl. Microbiol.* 104, 681-691.
- Priest, F.G. 1977. Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus*. *Bacteriological reviews*, Vol. 41, No. 3, 711-753.
- Radaelli, A., Paganini, M., Basavecchia, V., Elli, V., Neri, M., Zanotto, C. 2004. Identification, molecular biotyping and ultrastructural studies of bacterial communities isolated from two damaged frescoes of St Damian's Monastery in Assisi. *Lett. Appl. Microbiol.*, 38: 447-53.
- Rangel-Vázquez, N.A, Salgado-Delgado, R., García-Hernández, E. and Mendoza-Martínez, A.M. 2009. Characterization of Copolymer Based in Polyurethane and Polyaniline (PU/PANI). *J. Mex. Chem. Soc.*, 53(4), 248-252.
- Ripka, K., Denner, E.B.M., Michaelsen, A., Lubitz, W. and Piñar, G. 2006. Molecular characterisation of *Halobacillus* strains isolated from different medieval wall paintings and building materials in Austria. *Int. Biodeter. Biodegr.* 58, 124–132.
- Ripka, K., Michaelsen, A., Lubitz, W. and Pinar, G. Screening of bacterial and fungal diversity with DGGE on mural paintings under controlled climate conditions in the Castle of Schoenbrunn (Unpublished data).

- Rölleke, S., Muyzer, G., Wawer, C., Wanner, G., Lubitz, W. 1996. Identification of Bacteria in a Biodegraded Wall Painting by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments Coding for 16S rRNA.
- Rölleke, S., A. Witte, G. Wanner, and W. Lubitz. 1998. Medieval wall paintings-a habitat for archaea: identification of archaea by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR- amplified gene fragments coding for 16S rRNA in a medieval wall painting. *Int. Biodeterior. and Biodegrad.* 41, 85-92.
- Rölleke, S., Gurtner, C., Drewello, U., Drewello, R., Lubitz, W. 1999. Analysis of bacterial communities on historical glass by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Journal of Microbiological Methods* 36, 107-114.
- Romero-Noguera, J. 2007. Biodeterioro fúngico y bacteriano de las resinas terpénicas utilizadas en pintura y otras artes plásticas. Tesis doctoral.
- Romero-Noguera, J., Martín-Sánchez, I, López-Miras, M.M., Ramos-López, J.M. and Bolívar Galiano, F. 2010. Biodeterioration patterns found in dammar resin used as art material. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458. Vol.13 No.3, Issue of May 15.
- Roy, A. 1994. (Ed.), *Artists' Pigments*, Vol. 2, Oxford University Press, pp. 11-21.
- Ross, R. T. 1969. Biodeterioration of paint and paint films. *J. Paint Technol.* 41, 266-74.
- Roszak, D.B., and Colwell, R.R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environments. *Microbiol Rev* 51, 365-379.
- Salwan,R. and Kasana,R.C. Isolation and identification of protease producing psychrotropic bacteria from cold environments (Unpublished).
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA.

- Sampò, S., and A. M. Luppi Mosca. 1989. A study of the fungi occurring on 15th century frescoes in Florence, Italy. *Int. Biodeterior.* 25:343-353.
- Santos, A., Cerrada, A., García, S., San Andrés, M., Abrusci, C., Marquina, D. 2009. Application of Molecular Techniques to the Elucidation of the Microbial Community Structure of Antique Paintings. *Microb Ecol.*, 58:692-702.
- Schabereiter-Gurtner, C., Piñar, G., Lubitz, W. and Rölleke, S., 2001a. An advanced strategy to identify bacterial communities on art objects. *J. Microbiol. Meth.* 45, 77-87.
- Schabereiter-Gurtner, C., Piñar, G., Lubitz, W., Rölleke, S. 2001b. Analysis of fungal communities on historical church window glass by denaturing gradient gel electrophoresis and phylogenetic 18S rDNA sequence analysis. *Journal of Microbiological Methods* 47, 345-354.
- Schabereiter-Gurtner, C., G. Piñar, D. Vybiral, W. Lubitz and S. Rölleke. 2001c. *Rubrobacter*-related bacteria associated with rosy discoloration of masonry and lime wall paintings. *Arch. Microbiol.* 176:347-354.
- Schäfer, J., Jäeckel, U. and Kämpfer, P. 2010. Analysis of Actinobacteria from mould-colonized water damaged building material. *Systematic and applied microbiology*, 33 (5), 260-268.
- Scheerer, S., Ortega-Morales, O. and Gaylarde, C. 2009. Microbial deterioration of stone monuments – An updated overview. *Advances in Applied Microbiology* 66, 97-139.
- Schmid, R.D. and Verger, R. 1998. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37, 1608- 1633.
- Schwieger, F. and Tebbe, C.C. 1998. A New Approach To Utilize PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 64, No. 12, 4870-4876.
- Seal, K.J. 1998. *Biodeterior. Abstr.*, 2, 295.
- Sert, H.B. & Sterflinger, K. 2009. A new *Coniosporium* species from historical marble monuments. *Mycol Progress* DOI 10.1007/s11557-009-0643-z.

- Sheffield, V. C., D. R. Cox, L. S. Lerman, and R. M. Myers. 1989. Attachment of a 40-base pair G+C-rich sequence (GCclamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 232-236.
- Smith, G. and Clark, R. 2002. *Reviews in Conservation*, 2, 92-106.
- Sprocati, A.R., Alisi, C., Tasso, F., Vedovato, E. and Barbabietola, N. 2007. Exploitation of microorganisms isolated from the Etruscan tomb of Mercareccia (Tarquinia, Italy) as a biotechnological source for conservation and restoration of artistic heritage (Unpublished).
- Sterflinger, K. 2010. Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal biology reviews* 24, 47 - 55.
- Stern, M., Da Silva, C. & Halbe, H. W. 1956. Growth of contaminating fungi in bidistilled water. *Hospital Rio de Janeiro*, 49, 501-2.
- Stomeo, F., Saiz-Jimenez, C. and Gonzalez, J.M. Cultured bacterial communities in a cave containing paintings and engravings in Ardales, Malaga, Spain (Unpublished data).
- Strzelczyk, A. B. 1981. Paintings and sculptures, In *Microbial Deterioration*, ed. A. H. Rose, Academic Press, London, 203- 234.
- Suihko, M-L., Alakomi, H.L., Gorbushina, A., Fortune, I., Marquardt, J., Saarela, M. 2007. Characterization of aerobic bacterial and fungal microbiota on surfaces of historic Scottish monuments. *Systematic and Applied Microbiology* 30, 494-508.
- Susi, H. and Byler, D. 1988. *Appl. Spectrosc.*, 42, 819-826.
- Trinh Tan, F., Cooper, D.G., Marié, M., Nicell, J.A., 2008. Biodegradation of a synthetic co-polyester by aerobic mesophilic microorganisms. *Polym. Degrad. Stab.*, doi:10.1016/j.polymdegradstab.2008.05.005.
- Tsai, Y.L., Olson, B.H., 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1070-1074.

- Valentin, N. 2003. Microbial contamination and insect infestation in organic materials. COALITION: a concerted action from the European Commission (EVK4-CT-1999- 2001) on molecular microbiology as an innovative conservation strategy for indoor and outdoor cultural assets Newsletters 6, 2-5.
- Van Aarssen, B. G. K., Cox H. C., Hoogendoorn, P. and De Leeuw, J.W. 1990. A cadinene biopolymer present in fossil and extant dammar resins as a source for cadinanes and bicadinanes in crude oils from Southeast Asia. *Geochim. Cosmochim. Acta* 54, 3021- 3031.
- Vandenabeele, P., Wehling, B., Moens, L., Dekeyzer, B., Cardon, B., von Bohlen, A. and Klockenkämper, R. 1999. *Analyst* 124, 169.
- Vandenabeele, P., Wehling, B., Moens, L., Edwards, H., De Reu, G. and Van Hooydonk, G. 2000. Analysis with micro-Raman spectroscopy of natural organic binding media and varnishes used in art. *Analytica Chimica Acta* 407, 261-274.
- Vandenabeele, P., Ortega-Avilès, M., Tenorio Castelleros, D. and Moensa, L. 2007. Raman spectroscopic analysis of Mexican natural artists' materials. *Spectrochimica Acta Part A*, 68, 1085-1088.
- Van der Doelen G.A., Van den Berg, K.J. and Boon, J.J. 1998a. Comparative chromatographic and mass-spectrometric studies of triterpenoids varnishes: fresh materials and aged samples from paintings. *Studies in Conservation*, 43: 249- 264.
- Van der Doelen, G.A., Van den Berg, K.J., Boon, J.J., Shibayama, N., de la Rie, E.R. and Genuit, W.J.L. 1998b. Analysis of fresh triterpenoid resins and aged triterpenoid varnishes by high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation (tandem) mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 809, 21-37.
- Van der Doelen, G.A. 1999. Molecular studies of fresh and aged triterpenoids varnishes. PhD thesis. University of Amsterdam, Amsterdam.
- Van der Doelen G.A. and Boon, J.J. 2000. Artificial ageing of varnish triterpenoids in solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, 134, 45-57.

- Villarquide, A. 2005. In: La pintura sobre tela II. Ed. Nerea.
- Vukojević, J. and Ljaljević Grbić, M. 2010. Moulds on paintings in Serbian fine art museums. *African Journal of Microbiology Research* Vol.4 (13), 1453-1456.
- Wainwright, M., Tasneem Adam Ali and Barakah, F. 1993. A Review of the Role of Oligotrophic Micro-organisms in Biodeterioration. *International Biodeterioration & Biodegradation* 31, 1-13.
- Walsh, J.H. 2001. Ecological considerations of biodeterioration. *Int.Biodeter. Biodegr.* 48, pp. 16-25.
- Ward, D.M., R. Weller and M.M. Bateson. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature.* 345, 63-65.
- Warscheid, T. 2000. Integrated concepts for the protection of cultural artifacts against biodeterioration, 185-202. In O. Ciferri, P. Tiano, G. Mastromei (ed.), *Of microbes and art: the role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Warscheid, TH., Braams, J., 2000. Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46 (4), 343-368.
- Welsh, J., McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18, 7213-7218.
- Wen, A., Fegan, M., Hayward, C., Chakraborty, S. and Sly, L.I. 1999. Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tarnaoka et al. 1987) gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 567-576.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications.* Academic Press, New York, pp. 315-322.

- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18, 6531– 6535.
- Wilson, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741–3751.
- Willey, J.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J., 2008. Prescott, Harley and Klein's *Microbiology*, seventh edition.
- Zanardini, E., Abbruscato, P., Ghedini, N., Realini, M. and Sorlini, C. 2000. Influence of atmospheric pollutants on the biodeterioration of stone, *Int. Biodeter. Biodegr.* 45, 35–42.
- Zotti, M. and Ferroni, A. 2008. Microfungal biodeterioration of historic paper: Preliminary FTIR and microbiological analyses. *Int Biodeterior Biodegrad* 62(2), 186–194.
- Zhou, M.Y., and Gomez-Sanchez, C.E. 2000. Universal TA Cloning. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2, 1-7.
- Zyska, B. 1997. Fungi isolated from library materials: a review of the literature. *Int Biodeterior Biodegrad* 40, 43–51.

