

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 152**

51 Int. Cl.:

**B44D 7/00** (2006.01)

**C12R 1/01** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2014 PCT/IT2014/000246**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2015 WO15040647**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2014 E 14825192 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 3046779**

54 Título: **Procedimiento biotecnológico para la eliminación de depósitos coherentes de origen orgánico e inorgánico de materiales y obras de interés histórico artístico**

30 Prioridad:

**18.09.2013 IT RM20130519**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**14.03.2018**

73 Titular/es:

**ENEA-AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE  
TECNOLOGIE, L'ENERGIA E LO SVILUPPO  
ECONOMICO SOSTENIBILE (100.0%)  
Lungotevere G.A. Thaon di Revel 76  
00196 Roma (RM), IT**

72 Inventor/es:

**SPROCATI, ANNA ROSA;  
ALISI, CHIARA y  
TASSO, FLAVIA**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

ES 2 659 152 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento biotecnológico para la eliminación de depósitos coherentes de origen orgánico e inorgánico de materiales y obras de interés histórico artístico

5

**[0001]** La presente invención se refiere a un procedimiento de eliminación de diferentes depósitos coherentes, orgánicos e inorgánicos, también superpuestos, de obras de arte y/o pinturas murales. El procedimiento utiliza, sólo o en combinación, cepas bacterianas no patógenas específicas y no formadoras de esporas, con metabolismo aeróbico, inmovilizadas en una arcilla sintética gelificante, conocida con el nombre comercial de laponite. Al final del tratamiento, la composición biológica específica se puede eliminar con facilidad sin afectar a la pátina pictórica subyacente o al material constitutivo. El tratamiento ha demostrado ser seguro para el operador, el entorno y la obra de arte.

Antecedentes de la invención

15

**[0002]** El objetivo de la restauración es restablecer la completa funcionalidad de una obra de arte y prolongar su conservación. Es una forma de actividad desarrollada con el tiempo según los diferentes requisitos, dependiendo del momento histórico, y sigue siendo una cuestión en evolución, abierta al análisis científico y técnico cuidadoso y a debates culturales animados.

20

**[0003]** El campo de la restauración de las pinturas murales y material pétreo es de particular importancia.

**[0004]** La expresión pinturas murales comprende todas las obras de arte que, aunque realizadas por diferentes técnicas pictóricas, se realizan en un soporte mural, tal como frescos, medio fresco, tempera, graffiti. La restauración de estas obras de arte se realiza siempre en el sitio, a menos que, por motivos técnicos particulares, la eliminación de parte de la pintura del soporte original sea necesaria.

25

**[0005]** Con el fin de planificar una restauración adecuada, antes de iniciar cualquier intervención, tener pleno conocimiento de la obra de arte sobre la cual debería adoptarse las medidas, analizar los materiales constituyentes, las técnicas de ejecución, las causas de degradación y desarrollo de un análisis de diagnóstico del estado de la conservación, es fundamental. Los ensayos estratigráficos y las pruebas de limpieza de la pintura pueden llevarse a cabo para analizar las condiciones de la superficie pintada y comprobar si existen solapamientos. Además, análisis exhaustivos pueden llevarse a cabo a través de análisis químico-físicos por muestreo no destructivo o retirada de pequeñas muestras de la pintura que serán analizadas en el laboratorio o por instrumentos de campo específicos. Si la pintura se encuentra en condiciones muy precarias, especialmente a nivel estructural, adoptar medidas de seguridad antes de proceder a la limpieza de la superficie pintada resulta apropiado.

30

35

**[0006]** La limpieza de una pintura permite la eliminación preliminar de material extraño superficial (telarañas, partículas en la atmósfera, suciedad en la superficie depositada sobre la superficie de la obra con el tiempo, manchas, goteos, salpicaduras) que evita o restringe en gran medida la lectura correcta de la obra, y, posteriormente, la eliminación de diferentes depósitos coherentes de las superficies con frescos, incluyendo depósitos de caseína, carbonato, yeso y fosfato, sin estropear la superficie pintada. Puesto que los sustratos coherentes se adhieren fuertemente a la superficie de la obra, con el fin de asegurar los mejores resultados, la limpieza ha de ser selectiva y realizada a través de la eliminación de capas sucesivas, distinguiendo un nivel del otro, sin eliminar los materiales originales para prevenir el daño irreversible a la obra.

40

45

**[0007]** Las técnicas basadas en procedimientos químicos, en combinación a menudo con una acción mecánica, se utilizan normalmente para tratar las superficies de obras de arte y/o pinturas murales. Si bien en algunos casos tal asociación ha demostrado ser eficaz en la eliminación de alteraciones, se han observado algunas desventajas. En primer lugar, la limpieza por procedimientos químicos se lleva a cabo normalmente utilizando disolventes químicos y agentes solubilizantes que, en ocasiones, pueden conseguir resultados no satisfactorios, debido a la baja selectividad o alta agresión hacia los sustratos, causando potencialmente cambios en las propiedades del sustrato y volviéndose tóxicos, tanto para el medio ambiente como para el operador. Algunos procedimientos de limpieza tradicionales para obras de arte aún utilizan disolventes orgánicos tóxicos, tales como tolueno, xileno, dimetilformamida, diclorometano. Por otra parte, también la acción mecánica realizada por un bisturí requiere una ejecución particularmente delicada y precisa para evitar daños físicos irreparables a la superficie subyacente a la deposición, y tiempos de ejecución muy largos, que obligan a los operadores a una permanencia prolongada en entornos incómodos, tales como cuevas y tumbas.

50

55

**[0008]** Recientemente, en el campo de la biotecnología, procedimientos innovadores aplicables a la caracterización del deterioro biológico de los sustratos (biodeterioro) y la restauración (biorrestauración), se han desarrollado y aplicado a proyectos para la conservación/restauración de obras de arte.

5 **[0009]** Para la eliminación biológica de los depósitos, se utilizan dos estrategias: la aplicación de moléculas biológicas purificadas, tales como enzimas, y el uso de cepas bacterianas viables, seleccionadas por su acción selectiva hacia sustratos específicos.

10 **[0010]** El uso de enzimas purificadas es muy selectivo y rápido; permite acelerar las reacciones químicas hasta  $10^8$ - $10^{10}$ . El resultado de la limpieza enzimática depende de muchos factores, tales como la elección de la enzima adecuada, las condiciones operativas y el sistema de administración. El pH óptimo y la temperatura de la actividad enzimática han de ser compatibles con el material a tratar y requiere que las condiciones adecuadas se mantengan durante todo el periodo de tratamiento. Además, dada la alta especificidad de acción de las enzimas, a fin de lograr resultados satisfactorios, la combinación de diferentes preparaciones enzimáticas es a menudo  
15 necesaria. Las dificultades para mantener constantes las condiciones óptimas operativas durante la aplicación y los altos costos hacen que el procedimiento de limpieza enzimática sea crítico y no accesible a todos los restauradores.

20 **[0011]** Para superar estos inconvenientes, se han desarrollado estrategias basadas en el uso de células bacterianas viables. Las células viables, como productores enzimáticos, muestran un enorme potencial en la inducción de transformaciones químicas, ya que pueden acelerar las reacciones, utilizar el sustrato directamente como una fuente de carbono, y liberar enzimas activas en el entorno circundante. La aplicación de células bacterianas viables ha demostrado ser más eficaz en el ataque y en la degradación de diferentes tipos de sustratos que las enzimas directas. La experiencia ha confirmado que las bacterias son versátiles, tienen la capacidad para producir un amplio intervalo de enzimas, incluyendo enzimas inducibles, que son producidas por las células sólo en  
25 condiciones específicas o en presencia de ciertos sustratos.

30 **[0012]** La precaución principal a considerar cuando se aplican células bacterianas viables es el uso de microorganismos seguros, no patógenos o agresivos hacia el material constituyente y no formadores de esporas. Esto garantiza la seguridad de los operadores, la integridad de las obras de arte, y la eliminación correcta y completa de las células bacterianas puede ser obtenida después del tratamiento, sin dejar elementos biológicos quiescentes, que podrían revitalizarse cuando las condiciones se tornen de nuevo favorables.

35 **[0013]** La selección de microorganismos adecuados para una aplicación específica en el tratamiento de biolimpieza y biorremediación de artefactos requiere una caracterización metabólica cuidadosa de las cepas bacterianas.

40 **[0014]** Las fuentes de las cepas microbianas útiles son ubicuas, pero a menudo las situaciones ambientales más críticas ofrecen la posibilidad de aislar bacterias capaces de realizar con eficacia funciones específicas debido a la presión selectiva para la que fueron sometidas, es decir, bacterias aisladas de sitios contaminados, de ambientes extremos y materiales biodeteriorados de interés histórico y artístico son buenos biolimpiadores. Al producir y secretar moléculas tales como enzimas, ácidos orgánicos y agentes tensioactivos, los microorganismos son capaces de cambiar la estructura química de los sustratos orgánicos. Conocer el metabolismo de estos microorganismos permite entender cómo explotarlos, y el conocimiento del mecanismo responsable de la degradación de los materiales pétreos permite comprender cómo explotar favorablemente los microorganismos deteriorantes para  
45 aplicaciones de biolimpieza.

50 **[0015]** Los protocolos de biolimpieza explotan tanto la acción "destructiva", debido a la actividad catabólica, que puede ser utilizada para la eliminación biológica de los revestimientos superficiales en las obras de arte, como la acción "constructiva" de ciertos microorganismos capaces de llevar a cabo el procedimiento de biomineralización, es decir, inducir la formación de precipitados de calcita en materiales a base de carbonato útiles para aplicaciones de bioconsolidación.

55 **[0016]** Ya que los materiales a eliminar están en contacto directo con la superficie de la obra a tratar, la limpieza tiene que ser llevada a cabo de una manera selectiva, a través de la eliminación de capas sucesivas de depósitos, diferenciando la acción entre áreas, aliviándolas o eliminándolas profundamente, sin causar daños irreversibles. La biolimpieza parece cumplir con estos criterios precisos, a medida que la investigación en los campos de la biología y la microbiología molecular ha permitido la selección de varias cepas bacterianas con aplicaciones potenciales en el campo de la eliminación de los depósitos coherentes de objetos artísticos y pinturas murales, así como el control de biocontaminantes de la degradación.

**[0017]** La aplicación de microorganismos o macromoléculas de los mismos, en las superficies, por medio de medios acuosos es una alternativa viable a los procedimientos tradicionales.

**[0018]** Los primeros ejemplos de aplicación bacteriana viable para los procedimientos de biolimpieza se realizaron en piedra para la eliminación de costras negras y sales. En 1970, Moncrieff y Hempel (Moncrieff A., Hempel K. Work on the degeneration of sculptural stone. Conservation of stone and wooden objects, Conferencia de Nueva York, 2ª edición, ICC, Ed., Londres, vol. 1, 103-114) han descrito el uso de un paño húmedo biológico y el papel de los microorganismos en el paño húmedo. Con el fin de eliminar las alteraciones de la superficie de frescos y obras de arte, debido a la nitrificación, sulfatación y costras negras, se ha propuesto el uso de microorganismos desnitrificantes y de desulfuración aplicados a las superficies a tratar.

**[0019]** Las primeras aplicaciones con éxito de las bacterias reductoras de sulfato anaeróbicas se notificaron en Atlas RM 1995. Bioremediation. Chem. News 73, 32-42, y Gauri y Chowdhury (KL Gauri, Chowdhury AN 1988 Experimental studies on conversion of gypsum to calcite by microbes: In Proceedings of the 6th International Congress on deterioration and Conservation of Stone. Ciabach J. ed., páginas 545-550, Nicholas Copernicus University) en el que el microorganismo *Desulfovibrio desulfuricans* se utilizó para la eliminación de sulfatos de costras negras, mientras que *Desulfovibrio vulgaris* se aplicó sobre costras de yeso (Heselmeyer K. y col. 1991, Application of *Desulfovibrio vulgaris* for the bioconservation of rock gypsum crusts into calcite. BIOforum 1, 89) para obtener, además de la eliminación de depósitos negros, la conversión de yeso en calcita. Según estas técnicas, las estatuas de mármol son tratadas por inmersión en un baño de bacterias desulfurantes a fin de eliminar los depósitos de yeso (Gauri y col, 1989 The sulphation of marble and the treatment of gypsum crust. Stud. Cons. 34:201-206). *Pseudomonas stutzeri* y *P. aeruginosa* son las bacterias desnitrificantes empleadas para la eliminación de los objetos artísticos, respectivamente sulfatos y nitratos (Ranalli y col. 1997. The use of microorganisms for the removal of sulphates on artistic stoneworks. International biodeterioration and biodegradation, 40:255-261). Sin embargo, debido generalmente al gran tamaño del objeto a tratar, este tipo de aplicación presenta desventajas asociadas con el volumen del baño de tratamiento. En consecuencia, este tratamiento no es adecuado para su aplicación en edificios y frescos, y requiere asimismo una fase de consolidación de la obra para evitar causar daños graves por el baño de inmersión.

**[0020]** Alternativamente, se ha propuesto el uso de una matriz de soporte, tal como sepiolita, para atrapar microorganismos y aplicar dicha matriz al objeto a tratar. Este procedimiento requiere una preparación larga y laboriosa, de al menos una semana para permitir el crecimiento bacteriano y la colonización de las partículas de sepiolita. Es más, el sistema no mantiene las condiciones favorables con el tiempo, a saber, la disponibilidad de agua, por lo que las bacterias atrapadas pueden realizar de manera eficiente su acción y se requiere una alta concentración de microorganismos para sobrevivir a las condiciones adversas.

**[0021]** El uso de medios orgánicos, tales como ácido poliacrílico, se ha propuesto para superar los problemas asociados con la colonización microbiana de los soportes inorgánicos. Durante la preparación del gel, los microorganismos están atrapados en el gel orgánico, el procedimiento dura aproximadamente 10 minutos, proporcionando una ventaja considerable en comparación con los soportes inorgánicos que requieren al menos 7 días para crecer y adherirse sobre las partículas de la matriz inorgánica. Sin embargo, soportes orgánicos, tales como ácido poliacrílico, tienen una capacidad limitada para adherirse a cualquier tipo de piedra o metal.

**[0022]** En la restauración de obras policromas, se han desarrollado varios protocolos que permiten modular el metabolismo microbiano y la acción de enzimas hidrolíticas. Recientemente, Sorlini y colaboradores han restaurado un fresco del Cementerio Monumental de Pisa, "Conversione di S. Efisio e battaglia". El fresco resultó quedar irreparablemente dañado por un tratamiento previo con formaldehído y pegamento. En esta última restauración, se han utilizado células bacterianas viables, combinadas con enzimas específicas que degradan la matriz orgánica del pegamento animal. A saber, la cepa A29 *Pseudomonas* *stutzeri* utilizada es capaz de degradar rápidamente el pegamento, con un riesgo mínimo de alteración de pigmentos, y una eficacia comprendida entre 80-90 %. La operación se realizó en diferentes áreas del fresco, manteniendo las bacterias en la superficie durante 10-12 horas a 28-30 °C. Las bacterias degradaron la mayor parte de la sustancia orgánica, mientras que el pegamento residual se eliminó por "proteasa tipo XIX". Al final del tratamiento, las bacterias tienen que ser eliminadas de la superficie para evitar el posible deterioro de los pigmentos.

**[0023]** Por encima y por debajo de la superficie con frescos, la difusión del agua o la absorción de los medios acuosos que administran los medios de biolimpieza puede dañar la obra, por lo tanto, un sistema de control para limitar la toma de agua en contacto con la capa superior de la obra tiene que ser desarrollado, y la acción sinérgica de la matriz de soporte para atrapar y aplicar microorganismos al objeto a tratar es un factor importante.

- [0024]** Tal acción de control puede conseguirse por medio de una adición de sustancias, es decir, espesantes minerales u orgánicos o agentes gelificantes que aumentan la viscosidad de la solución. Una composición de ácido poliacrílico al 1-1,5 % (p/v), cuya formulación se conoce con el nombre comercial Carbopol, puede producir una viscosidad muy alta y es fácilmente extraíble. Sin embargo, es ácida y se convierte en un gel solamente después de la neutralización con una base, tal como trietanolamina, hidróxidos de sodio o amonio, por ende, impregna la superficie de la obra artística.
- [0025]** El uso de agentes gelificantes bien conocido en la industria alimentaria y el campo biomédico se ha ensayado recientemente para resolver este problema. Agar y agarosa se han utilizado como soporte en aplicaciones de limpieza y biolimpieza. Las propiedades gelificantes peculiares de tales moléculas les proporcionan la capacidad de retener grandes cantidades de agua en su malla. Al ponerse en contacto con materiales porosos, tales como superficies pintadas, estatuas o papel, estos geles rígidos pueden liberar gradualmente el agua y absorber depósitos disueltos a eliminar. La solidez del gel permite su fácil eliminación tras su uso, sin dejar residuos en la superficie. Otra característica significativa de agar y gel de agarosa es la reversibilidad, ya que se funden por calentamiento y se endurecen por enfriamiento. Esta característica también permite la aplicación de gel en superficies no planas, rígidas, tales como estatuas, modelos de escayola y estuco, aplicando el gel fundido y dejándolo que se enfríe, para que pueda adoptar la forma de la superficie del objeto. Para tareas de limpieza específicas, se puede añadir al gel una solución acuosa de agentes quelantes, tensioactivos o enzimas.
- [0026]** La publicación de patente WO 2007/119258 A2, reivindica la prioridad de la aplicación MI2006A000776, titulada:
- "Procedimiento de biolimpieza de las superficies de objetos de diversas naturalezas químicas y edificios" describe el uso de algunas cepas bacterianas del género *Desulfovibrio* para eliminar depósitos de sulfatos de superficies pétreas y cepas de bacterias desnitrificantes, seleccionadas entre las especies *Pseudomonas stutzeri*, para la limpieza de objetos de diversa naturaleza química y edificios, que implica un material inerte como un medio de soporte para el crecimiento de microorganismos, capaces de mantener las condiciones necesarias y suficientes para hacerles cumplir el papel biolimpiador. Según la invención, el material inerte de soporte es una matriz que comprende un compuesto orgánico polimérico que se dispersa en un compuesto inorgánico a base de sílice o silicato, tal como sepiolita, sobre la que crece la biopelícula bacteriana. La formulación se aplica a través de una espátula en una capa con un espesor de 0,5-3 cm. Con el fin de mejorar la retención del agua contenida en el polímero orgánico, y reducir la difusión de oxígeno, en el caso de microorganismos anaeróbicos, la formulación biológica puede estar cubierta con una película elástica de plástico para mejorar la acción de los microorganismos anaeróbicos. Después de la aplicación, la formulación orgánica se deja en una posición durante un tiempo comprendido entre 6 horas y 7 días, más preferentemente entre 8 y 72 horas, dependiendo del tipo de microorganismo o las condiciones químicas del objeto a tratar. Se pueden realizar varias aplicaciones sucesivamente.
- [0027]** El uso exitoso de gel rígido como soporte para las operaciones de limpieza ha dado lugar recientemente al desarrollo de nuevos tipos de gel, tales como hidrogeles magnéticos químicos reactivos, probados en murales (Bonini y col. 2008. Acrylamide-Based Magnetic Nanosponges: A new smart nano composite material: Langmuir 24, 12644-12650).
- [0028]** Sin embargo, en caso de condiciones ambientales desfavorables para la temperatura y en caso de lluvia, la aplicación de técnicas de biolimpieza puede requerir la adopción de expedientes simples, tales como la aplicación de una película de plástico negro, posiblemente en asociación con una lámpara de calentamiento para equilibrar cualquier caída de la temperatura. En los climas más secos, varios ciclos de aplicación repetidos permiten administrar capas recientes de formulación, mejorar la humectación y variar la cantidad de componente orgánico. Los objetos del exterior, dispositivos y soluciones que impiden la escorrentía causada por la lluvia y otros eventos adversos (viento, nieve, etc.), o cubierta fija (techos, porches portátiles o fijos, etc.) tienen que ser desarrollados e implementados.
- [0029]** Aunque estos dispositivos y soluciones caen en el ámbito de los conocimientos y habilidades de los expertos del sector, los mismos complican la aplicación de los procedimientos de biolimpieza.
- [0030]** Por lo tanto, la necesidad de desarrollar procedimientos de biolimpieza alternativos a través de cepas microbianas proporcionando diferentes modos de aplicación que los descritos anteriormente, permitiendo esencialmente una administración más simple, menos susceptible a variables ambientales, y asegurando también resultados más reproducibles en un intervalo más amplio de aplicaciones, está muy presente. Dicho grado superior

de reproducibilidad del resultado final también se debe a las cepas bacterianas seleccionadas particulares que en la presente invención actúan en una matriz de soporte particular, eliminando de una manera sinérgica depósitos coherentes de diferente naturaleza.

5 Resumen de la invención

**[0031]** En un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de eliminación de depósitos coherentes de diversa naturaleza, orgánica e inorgánica, de objetos artísticos y/o pinturas murales utilizando nuevas cepas bacterianas, no patógenas y no formadoras de esporas, inmovilizadas en un soporte inerte en forma de gel.  
10 Las nuevas cepas bacterianas se seleccionaron por su capacidad para degradar sustratos orgánicos específicos, tales como caseína, y solubilizar depósitos inorgánicos (tiza, carbonatos y fosfatos) en condiciones aeróbicas.

**[0032]** Un segundo aspecto de la invención está representado por las tres nuevas cepas bacterianas, aisladas de los suelos y entornos subterráneos, utilizadas en el procedimiento de eliminación de depósitos  
15 coherentes de diversa naturaleza.

**[0033]** Un tercer aspecto de la invención es la formulación original constituida por la asociación de las cepas bacterianas con la matriz de gel específico.

20 **[0034]** Un aspecto adicional de la invención consiste en el kit para la biolimpieza de objetos artísticos y/o pinturas murales de depósitos coherentes que comprenden la asociación de una o más cepas bacterianas con la matriz de gel específico.

Descripción detallada de la invención

25 **[0035]** La presente invención proporciona un procedimiento de eliminación de depósitos coherentes de diversa naturaleza, orgánica e inorgánica, de objetos artísticos y/o pinturas murales. El procedimiento utiliza tres nuevas cepas bacterianas inmovilizadas en una matriz gelificante específica.

30 **[0036]** Tal matriz gelificante es una arcilla sintética industrial perteneciente a la familia esmectita, el producto se conoce comercialmente como laponite. Es un silicato de magnesio hidratado en capas, sintetizado hidrotérmicamente mezclando sales de silicato, litio y magnesio, en presencia de agentes mineralizantes. La fórmula química que describe tal arcilla sintética, que da apoyo a las bacterias, es:  $\text{Na}_{0,7}[(\text{Si}_8\text{Mg}_{5,5}\text{Li}_{0,3})\text{O}_{20}(\text{OH})_4]$  (Daniel L.M. y col. J. Colloid Interface Sci. 2007, 316: 72-79).  
35

**[0037]** La interacción de moléculas orgánicas con la superficie de la arcilla ácida e hidrófila puede causar la desnaturalización de la enzima, por lo tanto, su uso en el campo de la biotecnología es problemático (Tietjen T, Wetzel RG. Extracellular enzyme-clay mineral complexes: Enzyme adsorption, alteration of enzyme activity and protection from photodegradation. Aquatic Ecology. 2003; 34(4):331-339). Tales limitaciones se pueden superar a  
40 través del procedimiento de pasivación de los sitios superficiales ácidos y la creación de una matriz de arcilla más organófila, con diferentes capacidades.

**[0038]** En la presente invención ningún procedimiento químico-físico tiene que ser aplicado a la composición de arcilla, a fin de hacerlo compatible con los sistemas biológicos que se van a incluir, ya que el uso de células  
45 bacterianas vivas supera las incompatibilidades conocidas por las biomoléculas.

**[0039]** La estrategia descrita en la presente invención representa una alternativa adicional posible para superar las limitaciones de las aplicaciones de esta arcilla sintética en el campo de la biotecnología.

50 **[0040]** Las cepas bacterianas utilizadas en esta invención fueron aisladas por el solicitante por primera vez del suelo y entornos subterráneos, y se seleccionaron en el laboratorio por su alta capacidad para degradar sustratos orgánicos específicos, tales como caseína, y para solubilizar depósitos inorgánicos, tales como tiza, carbonatos y fosfatos, en condiciones aeróbicas. Así pues, para fines del procedimiento de patente, en cumplimiento con las disposiciones según el Tratado de Budapest, el solicitante ha depositado las tres cepas bacterianas ante la  
55 colección general Deutsche Sammlung von und Mikroorganism und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania.

**[0041]** Una primera cepa bacteriana utilizada en el procedimiento según la invención, *Stenotrophomonas maltophilia* UI3E, fue depositada por el solicitante el 17 de mayo de 2013 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania, la cual ha sido asociada con el número de

identificación DSM 27225.

**[0042]** El género *Stenotrophomonas* comprende al menos ocho especies. Estas bacterias son ubicuas en ambientes acuosos, en suelo y, en particular, en asociación con las plantas. Las cepas de la especie predominante, *Stenotrophomonas maltophilia*, tienen un intervalo extraordinario de actividades que incluyen los efectos beneficiosos sobre el crecimiento y la salud de las plantas, la degradación de los contaminantes xenobióticos y naturales, importantes para las estrategias de remediación ambiental, y la producción de biomoléculas de valor económico. Por otra parte, hay efectos negativos, tales como resistencia a múltiples fármacos en cepas patógenas para seres humanos. (Robert P. Ryan, Sebastien Monchy, Massimiliano Cardinale, Safiyh Taghavi, Lisa Crossman, Matthew B. Avison, Gabriele Berg, Daniel van der Lelie y J. Maxwell Dow. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas* Nature Reviews Microbiology. 7 2009, 514-525).

**[0043]** *Stenotrophomonas maltophilia* es una bacteria aeróbica, no-fermentativa, Gram-negativa. Las células son ligeramente más pequeñas (0,7-1,8 x 0,4-0,7 µm) que otros miembros del género. Son móviles gracias a los flagelos polares y crecen bien en medio MacConkey, produciendo colonias pigmentadas. *S. maltophilia* es catalasa positiva, oxidasa-negativa, esta característica la distingue de otros miembros del género, y tiene una reacción positiva a la DNasa extracelular.

**[0044]** *S. maltophilia* es ubicua en ambientes acuosos, en suelo y en plantas, pero también se ha utilizado en aplicaciones biotecnológicas (G. Berg y col. 1999. "Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*." J Clin Microbiol 37: 3594-600), y en agricultura para el control biológico de hongos patógenos en plantas (G. Berg y col., *Stenotrophomonas maltophilia* in the rhizosphere of oilseed rape-occurrence, characterization and interaction with phytopathogenic fungi. Microbiol Res. 1996; 151: 19-27), en la biorremediación (X. Wang y col. A three-component enzyme system catalyzes the demethylation of the herbicide dicamba in *Pseudomonas maltophilia* DI-6. Appl Environ Microbiol. 1997; 63: 1623-1626). Al ser un patógeno oportunista en pacientes inmunodeprimidos, *S. maltophilia* puede originar infecciones nosocomiales.

**[0045]** La nueva cepa de la presente invención, *Stenotrophomonas maltophilia UI3E*, se aisló de la rizosfera de un emplazamiento minero ubicado en Ingurtosu, Cerdeña, Italia. El análisis morfológico muestra una célula en bastón de 2 a 2,5 µm de longitud, y 0,35 µm de anchura. La identificación y la clasificación de la cepa se realizó por análisis de la secuencia parcial (1.242 pares de bases) del gen ARNr 16S en comparación con las secuencias depositadas en la base de datos del CNIB (GenBank) con un índice de similitud de 99 %, y a través de la caracterización metabólica por el sistema Biolog™. Como se describe a continuación, esta cepa ha demostrado *in vitro* la capacidad de degradar sustratos orgánicos específicos, tales como caseína.

**[0046]** Una segunda cepa bacteriana utilizada en el procedimiento según la invención pertenece al género *Cellulomonas* (actualmente *Cellulosimicrobium*). El género *Cellulosimicrobium* comprende bacilos gram-positivos, filamentosos y ramificados. Una de las características específicas de las bacterias que pertenecen a este género es su capacidad para degradar celulosa, utilizando enzimas específicas, tales como endoglucanasas y esoglucanasas.

**[0047]** La nueva cepa de la invención, *Cellulomonas sp. TBF11E* fue depositada por el solicitante el 17 de mayo de 2013 ante la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania, la cual se ha asociado con el número de identificación DSM 27224.

**[0048]** La nueva cepa *Cellulomonas sp. TBF11E*, fue aislada y seleccionada de entre más de cien cepas obtenidas de las paredes de la cámara interior de una tumba etrusca, situada en Tarquinia, Lazio, Italia.

**[0049]** Es una bacteria Gram-positiva tipo forma de bastón que oscila de 1 a 3 µm de longitud y 0,4 µm de anchura. La identificación y la clasificación de la cepa se realizó por análisis de la secuencia parcial (1.282 pares de bases) del gen ARNr 16S en comparación con las secuencias depositadas en la base de datos del CNIB (GenBank) y a través de la caracterización metabólica por el sistema Biolog™.

**[0050]** Como se demuestra a continuación, esta cepa muestra tener una alta capacidad para solubilizar depósitos inorgánicos, tales como yeso y carbonatos, en condiciones ambientales normales.

**[0051]** Un tercer objeto de la presente invención es la cepa bacteriana *Pseudomonas koreensis UT30E*, también depositada por el solicitante el 17 de mayo de 2013 ante la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania, identificada con el número DSM 27226.

**[0052]** *Pseudomonas* es un género de bacterias que tiene la mayor diversidad, y su taxonomía ha sufrido varios cambios desde sus primeras descripciones (Palleroni, Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view 2003 Microbiology 149: 1-7). Es más, el número de especies afiliadas al género *Pseudomonas* aumenta cada año, eran 102 en 2006, 109 en 2007, 114 en 2008, 118 en 2009, 5 contando 205 en 2013 (<http://www.bacterio.cict.fr/> y <http://www.dsmz.de/>). Las bacterias *Pseudomonas* son bacterias Gram-negativas, no formadoras de esporas, aerobias obligadas, oxidasa positiva, catalasa positiva y tienen flagelos polares que les permiten moverse. Se encuentran en el suelo y el agua, pero también en las plantas. Algunas cepas son productoras de sustancias antibióticas naturales y se utilizan en la agricultura para el control de fitopatógenos (*Ps. Aurantica*), otras cepas, capaces de degradar hidrocarburos, se han utilizado para limpiar ambientes 10 contaminados (*Ps. putida*).

**[0053]** La cepa original de la presente invención se aisló de la rizosfera del emplazamiento minero de Trezbonka, Polonia. El análisis morfológico celular ha revelado una forma típica de bastón de 1-2 µm de longitud y 0,33 µm de ancho. La cepa es capaz de solubilizar los depósitos a base de fosfatos en condiciones aeróbicas. 15

**[0054]** La identificación y la clasificación de la cepa se realizaron y se confirmaron por un análisis de la secuencia de gen ADNr 16S (1.399 pb) en comparación con las secuencias depositadas en la base de datos del CNIB (GenBank) con un índice de similitud de 99 %, y a través de la caracterización metabólica por el sistema Biolog™. 20

**[0055]** La propagación de las tres cepas puede llevarse a cabo mediante un cultivo en condiciones estándar y en los medios convencionales que se utilizan para el crecimiento de células bacterianas. Varios medios de cultivo son bien conocidos por ser adecuados para el uso según la invención. A saber, y sin quedar limitado a esto, las tres cepas se cultivan en cultivos líquidos en medios aeróbicos que contienen fuentes de carbono, nitrógeno y sales 25 inorgánicas. La fuente de carbono preferida son carbohidratos, pero otras fuentes incluyen glicerol, aminoácidos, xilosa, etc... Muchos materiales inorgánicos y proteínas se pueden utilizar como una fuente de nitrógeno en el proceso de crecimiento. La fuente preferida de nitrógeno son aminoácidos y urea, pero también incluye sales inorgánicas de nitrato y amonio; otras fuentes de metabolitos son vitaminas, purinas, pirimidinas, extracto de levadura, peptona, harina de soja, caseína hidrolizada, y similares. Los minerales inorgánicos que se pueden 30 incorporar en el medio de crecimiento incluyen calcio, cinc, hierro, manganeso, magnesio, cobre, cobalto, potasio, sodio, molibdato, fosfato, sulfato, cloruro, borato, así como en su forma iónica.

**[0056]** Del mismo modo, los valores de pH y temperatura son variables, y las condiciones óptimas pueden variar dependiendo del tipo particular de bacterias. Sin embargo, el crecimiento de las células según la invención 35 puede realizarse a temperaturas entre 6 y 37 °C, el intervalo de temperatura preferido es de 25 a 30 °C.

**[0057]** El valor de pH en el medio de cultivo puede variar entre 4 y 9, pero el intervalo óptimo es 6-8. Las bacterias han de ser cultivadas en condiciones aeróbicas, preferentemente bajo agitación. El tiempo de recogida depende de la cepa y las condiciones de crecimiento, en particular del medio de cultivo, temperatura y aireación. 40 Para fines ilustrativos y sin ser limitante, los cultivos de las cepas bacterianas se recogen normalmente 72 horas después de la inoculación, cuando se cultivan a 25 °C, pero pueden recogerse a partir de 20 a 24 horas, especialmente cuando se cultivan bajo condiciones que determinan un crecimiento más rápido, tal como una mayor temperatura (26-30 °C) o en algún medio que contiene ingredientes que se metabolizan más rápidamente.

**[0058]** En una realización particularmente preferida de la invención, las cepas bacterianas crecen en un medio de cultivo CTS (caldo tríptico de soja) o en una placa de medio sólido en AST (agar de soja tríptica) a la temperatura óptima de 28 °C durante 24-48 horas. 45

**[0059]** Los cultivos resultantes se recuperan para su uso posterior en el procedimiento según la invención 50 para formar una composición que incluye una matriz que proporciona un soporte a los microorganismos.

**[0060]** Según la presente invención, el soporte para las cepas bacterianas que metabolizan los depósitos es proporcionado por el uso de una arcilla coloidal sintética, conocida por el nombre comercial de laponite y por lo general se utiliza como aditivo en diversos productos con el fin de modificar la reología y como un estimulador de la 55 película para crear barreras antiestáticas. Dicha arcilla aparece como un polvo blanco fino; si se dispersa en el agua del grifo se hincha y forma en menos de una hora un gel altamente tixotrópico, mientras que, con la misma concentración en agua destilada, sólo proporciona una viscosidad limitada. La viscosidad de las dispersiones de laponite depende del contenido de electrolitos presentes en el agua.

**[0061]** La arcilla sintética comercial utilizada en la presente invención se obtiene por la combinación de sales de sodio, litio y magnesio con silicato de sodio a temperaturas controladas. Las células que la componen tienen una forma de disco característica. Una célula está constituida por una capa de iones magnesio intercalada entre dos capas de silicio, equilibrada por átomos de oxígeno y grupos hidroxilo. Durante el procedimiento de dispersión, los cristales forman agregados unidos por enlaces electrostáticos, por ende, forman una capa doble eléctrica. En presencia de la sal, los cristales adquieren una estructura similar a un "castillo de naipes", responsable de las características del gel tixotrópico.

**[0062]** De hecho, en la restauración se explota la gran capacidad de retención de laponite hacia el agua, lo que permite un mayor tiempo de contacto con una absorción limitada por el soporte, una circunstancia deseable especialmente cuando es poroso, higroscópico, soluble o de otra manera materiales/superficies sensibles a la acción del agua, como un fresco, tiene que ser tratada. En la restauración, laponite se utiliza para eliminar o hacer menos visible las manchas de óxido y depósitos de hierro de frescos, en ocasiones en combinación con ácido cítrico y citrato de sodio, pero a menudo sólo con agua, para evitar daños adicionales a los sustratos particularmente comprometidos.

**[0063]** Por primera vez en la presente invención se propone la combinación de cepas bacterianas específicas y la arcilla sintética, correspondiente a la fórmula química  $\text{Na}_{0,7}[(\text{Si}_8\text{Mg}_{5,5}\text{Li}_{0,3})\text{O}_{20}(\text{OH})_4]$ , conocida como laponite y la suspensión de laponite en una solución que no sea agua.

**[0064]** De hecho, el procedimiento de eliminación de objetos artísticos y/o pinturas murales de diferentes tipos de depósitos coherentes, tanto orgánicos como inorgánicos, materia objeto de la presente invención, según el procedimiento que se describe a continuación implica el uso de las cepas bacterianas en asociación con una matriz de laponite, seguido de un cuidadoso análisis adaptado para identificar el tipo de depósitos a eliminar:

Etapa A: Las cepas bacterianas se cultivan en un medio de cultivo rico (CTS) con agitación constante (150 rpm) a 28 °C, hasta alcanzar el valor de densidad óptica máximo. (Fase de meseta).

Etapa B: Los cultivos líquidos son sometidos a centrifugación (6.000 rpm durante 20 minutos) para separar las células del medio de cultivo.

Etapa C: Las células se vuelven a suspender en un medio líquido con una composición variable según la cepa y el tipo de aplicación a la que se destina:

C1) para la eliminación de depósitos de caseína, las células de la cepa *Stenotrophomonas maltophilia UI3E* (DSM 27225) se vuelven a suspender en una solución de pirofosfato de sodio al 0,5 % en (p/v).

C2) para la eliminación de depósitos de carbonato y yeso, las células de la cepa *Cellulomonas sp. TBF11E* (DSM 27224) se vuelven a suspender en medio CTS diluido en agua desionizada (1:10 v/v).

C3) para la eliminación de depósitos a base de fosfato, las células de la cepa *Pseudomonas koreensis UT30E* (DSM 27226) se vuelven a suspender en medio CTS diluido en agua desionizada (1:10 v/v).

Etapa D: A la suspensión celular obtenida de este modo la arcilla sintética  $\text{Na}_{0,7}[(\text{Si}_8\text{Mg}_{5,5}\text{Li}_{0,3})\text{O}_{20}(\text{OH})_4]$ , es decir, Laponite®RD comercial (Rockwood Additives, n.º CAS 53320-86-8), se añade una concentración de 5 a 15 % en (p/v), preferentemente entre 7 y 11 % en (p/v), incluso más preferentemente se añade laponite a una concentración de 9 % en (p/v).

Etapa E: El gel que contiene las células bacterianas se deja reposar a una temperatura de 4 °C durante 16-20 horas, para permitir la hinchazón completa de la arcilla, irreversible cuando regresa a temperatura ambiente.

Etapa F: El gel con células bacterianas se aplica utilizando una espátula sobre las superficies a tratar, a saber, incluso en las superficies murales verticales o techos debido a su perfecta adhesividad. Según la invención, la capa de gel, que comprende células de la cepa bacteriana y laponite, se aplica de manera uniforme, con un espesor que varía de 0,3 a 1,0 cm. El gel se deja que actúe durante al menos 24 horas a temperatura ambiente.

Etapa G: Al final del tratamiento, el gel se elimina con una espátula.

**[0065]** En el caso de la eliminación de depósitos orgánicos, como se describe en la etapa C1, la etapa E sirve para llevar las células de *Stenotrophomonas maltophilia UI3E* (DSM 27225) a un estado de inanición caracterizado por un estado de escasez de fuente de energía, nutrientes y vitaminas, que es una condición fisiológica que predispone el organismo para atacar la materia orgánica a eliminar, como la única fuente de carbono y energía disponible, después de haber agotado durante la inanición las reservas celulares endógenas. De lo contrario, cualquier reserva de fuentes de carbono y nutrientes resultantes del medio de crecimiento, o acumulada en las células, supone un inconveniente para un ataque inmediato del sustrato a eliminar, tras la depleción de las reservas.

**[0066]** Por el contrario, la cepa *Cellulomonas sp. TBF11E* (DSM 27224) utilizada para la eliminación de depósitos de carbonato y yeso (C2), y la cepa *Pseudomonas koreensis* UT30E (DSM 27226) utilizada para la eliminación de depósitos de fosfato (C3) tienen que ser añadidas en esta etapa con un medio diluido para sostener el metabolismo bacteriano y permitir la solubilización de los depósitos inorgánicos.

5

**[0067]** En una realización preferida de la invención, con el fin de evitar una desecación demasiado rápida del gel de laponite que comprende la suspensión bacteriana, especialmente en condiciones ambientales particularmente calientes y secas, el gel una vez aplicado en el sitio que se va a tratar puede estar recubierto con una película de plástico. Sin embargo, se ha demostrado la eficacia del procedimiento según la invención a temperaturas entre 6 y 10 37 °C. Las células inmovilizadas en 9 % en (p/v) de laponite eran viables hasta 4 días después de la formación del gel.

**[0068]** Al final del tratamiento, el gel se elimina fácilmente con una espátula, o un instrumento similar, sin la operación de dañar la pátina pictórica subyacente, teniendo la precaución de recoger los fragmentos de gel en un 15 recipiente que se puede disponer con una esterilización simple y eliminación subsiguiente como residuo doméstico.

**[0069]** Una vez que se elimina el gel, el depósito coherente parece haberse reducido y ablandado de manera que se puede eliminar fácilmente con una esponja humedecida con agua y un cepillo.

20 **[0070]** La principal ventaja de la presente invención en comparación con composiciones similares del estado de la técnica útiles para la biolimpieza de las obras de arte murales consiste en utilizar cepas bacterianas aeróbicas, no formadoras de esporas, y de este modo, formas latentes que no se quedan como esporas sobre sustratos, además, no son patógenas y se emplean en soluciones acuosas no tóxicas.

25 **[0071]** Otra ventaja del procedimiento de la presente invención consiste en ser capaz de aplicarse a la eliminación de diferentes tipos de depósitos. Esta característica se logra mediante el uso de tres tipos de cepas bacterianas con diferentes competencias metabólicas, que pueden ser utilizadas individualmente o en diferentes combinaciones entre sí en función del tipo de acción requerida (solubilización o degradación) para realizar la mejor 30 eliminación de los depósitos, los cuales a menudo están formados por acumulaciones y estratificación de diferente naturaleza. Alternativamente, y en cualquier caso siempre en función del tipo de acción requerida, los tratamientos con las cepas bacterianas se pueden repetir sucesivamente. De esta manera, el procedimiento es una herramienta muy versátil que se puede utilizar para adaptarse a la condición real de la superficie a tratar. Por lo tanto, con el fin de obtener los mejores resultados, el análisis químico de los depósitos presentes en la superficie a tratar es muy importante puesto que permite al operador tomar decisiones y seleccionar el ataque metabólico adecuado.

35

**[0072]** En comparación con otros procedimientos conocidos de biolimpieza de obras de arte, la presente invención hace uso de cepas bacterianas aeróbicas. Esta característica proporciona el efecto técnico ventajoso de que no requiere precauciones especiales en la preparación y aplicación de bacterias, debido a que la presencia de 40 oxígeno, y por lo tanto de aire, no inhibe la acción de las mismas. A diferencia de las bacterias anaeróbicas hasta ahora utilizadas en la biolimpieza, la capacidad de trabajar en condiciones ambientales normales es una importante simplificación del procedimiento que hace que sea accesible a los operadores no especializados.

**[0073]** Los microorganismos se pueden almacenar a -80 °C en un medio de almacenamiento adecuado que comprende glicerol o a temperatura ambiente en forma liofilizada. Antes de su uso, se rehidratan y reconstituyen en 45 una solución acuosa, capaz de restaurar la vitalidad. Según la invención, en el momento del uso, el gel que se va a aplicar sobre la superficie se obtiene mediante la adición de laponite, preferentemente a una concentración de 9 % en p/v.

**[0074]** Un objeto adicional de la invención es un kit para la biolimpieza de objetos artísticos y/o pinturas 50 murales de los depósitos coherentes que comprenden material suficiente para una aplicación en una determinada unidad de superficie:

- Tubos de ensayo que contienen cada uno una cepa bacteriana en una suspensión estabilizada, por ejemplo, en AST, o en forma liofilizada, como se describió previamente;

55 - Los viales que contienen alícuotas del medio de cultivo para el crecimiento óptimo de cada una de las tres cepas (es decir, CTS) liofilizadas en una cantidad suficiente para una aplicación;

- Los viales que contienen alícuotas de agua desionizada esterilizada en una cantidad apropiada para disolver el contenido de un vial del medio de cultivo;

- Sobres que contienen laponite de uso individual, como se describe previamente, en una cantidad suficiente para

una aplicación.

- Medios de aplicación de la suspensión de microorganismos en laponite en la superficie a tratar;
- Un folleto explicativo con instrucciones para utilizar el kit.

5 **[0075]** Los medios de aplicación según la invención son espátulas, pequeños cepillos y esponjas.

**[0076]** Otros aspectos y realizaciones de la invención se ilustrarán ahora mediante los siguientes ejemplos proporcionados para fines no limitativos.

## 10 Parte experimental

### **EJEMPLO 1**

Aislamiento de cepas bacterianas

15

**[0077]** Los emplazamientos subterráneos, tales como iglesias excavadas en la roca y lugares de culto subterráneo, representan nichos ecológicos específicos en los que las condiciones ambientales tales como la luz, la humedad, la temperatura, la aportación de materias nutritivas y la naturaleza porosa del sustrato se convierten en factores favorables y determinantes para la colonización microbiana, a menudo responsable de los fenómenos de biodeterioro que se producen en las obras de arte (Saiz-Jimenez C., "Biodeterioration vs Biodegradation: the role of microorganisms in the removal of pollutants deposited on historic buildings" in "International biodeterioration and biodegradation", 1997, 225-232. Webster A., May E., "Bioremediation of weathered-building stone surfaces", in "TRENDS in Biotechnology", 2006, 255-260).

20

25 **[0078]** Tras la inspección de los emplazamientos, se han identificado visualmente algunas características de los muros y techos de interés a causa del recubrimiento o suciedad observado, se han identificado de esta manera, las áreas en las que se realizó el muestreo, según el protocolo NORMAL 3/80 (1980). El muestreo se realizó frotando cinco hisopos estériles sobre áreas de 10x15 cm para cada área de muestreo. Las muestras, en una caja refrigerada a 4 °C, se transportaron al laboratorio y se procesaron el mismo día.

30

**[0079]** Desde el emplazamiento de una tumba etrusca situada en Tarquinia, Italia, se muestrearon un total de 10 áreas. Otros muestreos se llevaron a cabo a partir de 10 muestras de suelo del emplazamiento minero de Ingurtosu, Italia, y 10 muestras de suelo del emplazamiento minero de Trezbionka, Polonia. Estos emplazamientos albergan microorganismos con funciones metabólicas específicas de interés biotecnológico, desarrollados como una respuesta adaptativa a condiciones de estrés crónico.

35

**[0080]** La selección de cepas microbianas capaces de solubilizar el carbonato de calcio se realizó en medio de agar AST en el que se distribuyó una suspensión de CaCO<sub>3</sub> al 1 % a pH 8,4. El ensayo de solubilización, realizado según el procedimiento NORMAL 9/82, 1982 - Microflora autotrofa e eterotrofa: técnica de aislamiento en

40

coltura. CNR-ICR, Comas Graphics, Roma, ha permitido identificar microorganismos capaces de formar un halo de clarificación de carbonato.

**[0081]** Un procedimiento similar fue considerado válido para evaluar la capacidad de las bacterias para solubilizar yeso.

45

**[0082]** Se prepararon las placas Petri que contenían AST y la superficie acristalada con una suspensión de 5 % de [CaSO<sub>4</sub>•2(H<sub>2</sub>O)]. Tras la siembra en el lugar, las placas se dejaron a temperatura ambiente (22-25 °C) hasta la formación de un halo de clarificación de tiza.

50

**[0083]** La selección de cepas microbianas capaces de solubilizar sales de fosfato se llevó a cabo en un medio Pikovskaya. El ensayo de solubilización, realizado según el procedimiento Pikovskaya RI ((Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya, 1948, 17: 362-370) ha permitido identificar microorganismos capaces de formar un halo después de incubaciones hasta 14 días.

55

**[0084]** La selección de las bacterias capaces de eliminar los depósitos de caseína se hizo mediante el ensayo de la producción de proteasas extracelulares de las cepas aisladas; para este fin, se hace referencia al procedimiento descrito por Vermelho y col. (1996) con modificaciones.

**[0085]** Brevemente, se prepararon las placas de Petri que contenían AST suplementadas con 1 % en p/v de

gelatina (colágeno bovino). Las placas se incubaron a 28 °C en un termostato y se observaron cada 24 horas durante 7 días. Después de este periodo de incubación, las placas se tiñeron con una solución de 0,1 % de almidón negro en metanol-ácido acético-agua, en la relación 30:10:60 (v/v/v), y se incubaron a 28 °C durante aproximadamente 2 horas, posteriormente el exceso de solución se eliminó y se vertió una solución de decoloración de metanol-ácido acético-agua, en la relación 30:10:60 (v/v/v). La acción proteolítica se evalúa sobre la base de la formación de un halo no coloreado alrededor de la colonia.

## EJEMPLO 2

### 10 *Condiciones de crecimiento*

**[0086]** Se han identificado condiciones óptimas de crecimiento de cada cepa seleccionada.

**[0087]** En particular, *Stenotrophomonas maltophilia UI3E* (DSM 27225) y *Pseudomonas koreensis* UT30E (DSM 27226) crecen en medio sólido (AST) o líquido (CTS) a una temperatura óptima de 28 °C durante 24 horas.

**[0088]** *Cellulomonas sp. TBF11E* (DSM 27224) crece en las mismas condiciones de temperatura y nutrientes, pero requiere tiempos de incubación más largos, de hasta 48 horas.

## 20 EJEMPLO 3

### *Extracción de ADN y amplificación por PCR*

**[0089]** La identificación de las cepas se llevó a cabo mediante la extracción de ADN genómico a partir de colonias individuales, según protocolos estándar, y amplificación del gen ARNr 16S por PCR (Gradient Euroclone One thermocycler-Euroclone, Milán, Italia) utilizando los cebadores universales para eubacterias:

P0 (5'-GAG AGT TTG ATC CGT GCT CAG-3'), y  
P6 (5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3').

30

**[0090]** Todos los cebadores se adquirieron en PRIMM (Milán, Italia).

**[0091]** Las alícuotas de 2 µl de lisados celulares (obtenidas a partir de una única colonia), 25 µl de 2x mezcla maestra (Bioline, Londres, R.U.), y 0,5 µM de cada cebador se utilizaron en la reacción por PCR (50 µl). El programa de PCR consiste en:

35

1 min a 95 °C, seguido de 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, 4 min a 72 °C (5 ciclos); posteriormente 30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C, 4 min a 72 °C (5 ciclos); posteriormente 30 s a 95 °C, 30 s a 50 °C, 4 min a 72 °C (25 ciclos), seguido de un ciclo final a 72 °C (10 min) y 60 °C (10 min).

40

**[0092]** Los productos de amplificación se separaron sobre gel de agarosa al 1,0 %, se tiñeron con GelRed (Biotium, Hayward, CA) y se visualizaron con un analizador de imagen BioRad Gel Doc 2000. Todos los fragmentos de ADN se purificaron y se concentraron en Sepharose CL6B200 (Sigma, St. Louis, MO).

## 45 EJEMPLO 4

### *Secuenciación*

**[0093]** La secuenciación del gen ARNr 16S se realizó por Genechron (ENEA-Casaccia, Roma, Italia) utilizando los mismos cebadores utilizados para la amplificación. El análisis de la secuencia y la comparación con las presentes en la base de datos GeneBank permite la afiliación taxonómica de las nuevas cepas indicadas como DSM 27224, DSM 27225 y DSM 27226, respectivamente, con respecto a las especies *Cellulomonas sp.*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Pseudomonas koreensis* con un nivel de homología del 99 % para todas las cepas.

## 55 EJEMPLO 5

### *Caracterización metabólica*

**[0094]** La caracterización metabólica de las tres cepas se realizó mediante la inoculación de microplacas

## ES 2 659 152 T3

apropiadas Biolog® (Microstation System 4.2, Biolog Inc., CA) (GN2 para las cepas Gram-negativas, GP2 para las Gram-positivas) y el seguimiento del desarrollo de la reacción cada 4-24-48 horas por el espectrofotómetro lector de microplacas (fecha de longitud de onda doble: OD590-OD750).

### 5 Resultados:

**[0095]** Cepa *Pseudomonas koreensis* UT30E (DSM 27226): perfil metabólico

Microplaca GN2		Reacción	(DO)
Sustrato			
Agua		-	0
a-ciclodextrina		-	-11
Dextrina		-	96
Glucógeno		-	29
Tween 40		+	199
Tween 80		B	171
N-acetil-D-galactosamina		-	6
N-acetil-D-glucosamina		-	30
Adonitol		-	1
L-arabinosa		+	555
D-arabitol		+	264
D-celobiosa		-	3
i-eritritol		-	-5
D-fructosa		+	180
L-fucosa		-	4
D-galactosa		+	390
Gentiobiosa		-	4
a-D-glucosa		+	364
m-inositol		-	-2
a-D-lactosa		-	3
Lactulosa		-	1
Maltosa		-	1
D-manitol		+	289
D-manosa		+	211
D-melibiosa		-	1
b-metil-D-glucósido		-	1
D-psicosa		-	48
D-rafinosa		-	-2
L-ramnosa		-	5
D-sorbitol		-	5
Sacarosa		-	1
D-trehalosa		-	0
Turanosa		-	3
Xilitol		-	4
Éster metílico del ácido pirúvico		+	188
Éster monometílico del ácido succínico		+	209
Ácido acético		+	307
Ácido Cis-aconítico		+	592
Ácido cítrico		+	799
Ácido fórmico		-	62
Ácido D-galactónico lactona		+	211
Ácido D-galacturónico		-	6
Ácido D-glucónico		+	317
Ácido D-glucosamínico		-	13
Ácido D-glucurónico		-	8
Ácido a-hidroxi-butírico		B	140
Ácido β-hidroxi-butírico		+	329
Ácido γ-hidroxi-butírico		-	9
Ácido p-hidroxi-fenil-acético		-	-10

ES 2 659 152 T3

ácido itacónico	-	-8
Ácido $\alpha$ -cetobutírico	-	77
Ácido $\alpha$ -cetoglutárico	+	534
Ácido $\alpha$ -cetovalérico	B	106
Ácido D,L-láctico	+	383
Ácido malónico	+	223
Ácido propiónico	+	221
Ácido quínico	+	227
Ácido D-sacárico	+	549
Ácido sebácico	-	5
Ácido succínico	+	416
Ácido bromosuccínico	+	435
Ácido succinámico	B	114
Glucuronamida	-	1
L-alaninamida	B	132
D-alanina	+	232
L-alanina	+	210
L-alanil-glicina	+	247
L-asparagina	+	426
L-ácido aspártico	+	415
L-ácido glutámico	+	319
Ácido glicil-L-aspártico	-	-1
Ácido glicil-L-glutámico	+	267
L-histidina	-	6
Hidroxi-L-prolina	+	296
L-leucina	B	161
L-ornitina	-	52
L-fenilalanina	-	14
L-prolina	+	208
Ácido L-piroglutámico	+	207
D-serina	-	45
L-serina	+	240
L-treonina	-	85
D,L-carnitina	+	209
Ácido $\gamma$ -aminobutírico	+	231
Ácido urocánico	+	334
Inosina	+	324
Uridina	-	60
Timidina	-	-1
Feniletilamina	-	4
Putrescina	B	98
2-aminoetanol	B	161
2,3-butanodiol	-	-1
Glicerol	+	185
D,L- $\alpha$ -glicerol fosfato	+	204
$\alpha$ -D-glucosa-1-fosfato	-	-3
D-glucosa-6-fosfato	-	-3

[0096] Cepa *Cellulosimicrobium cellulans* TBF11E (DSM 27224): perfil metabólico

Microplaca GP2		Reacción	(DO)
Sustrato			
Agua		-	0
$\alpha$ -ciclodextrina		+	1126
$\beta$ -ciclodextrina		+	881
Dextrina		+	1494
Glucógeno		+	1578
Inulina		-	107
Manano		+	1391

ES 2 659 152 T3

Tween 40	+	1023
Tween 80	-	360
N-acetil-D-glucosamina	+	855
N-acetil-β-D-manosamina	+	820
Amigdalina	+	1102
Arabinosa	+	1413
Arabitol	+	864
Arbutina	+	1110
Celobiosa	+	1511
Fructosa	+	1127
Fucosa	-	244
Galactosa	+	1597
Ácido galacturónico	+	1219
Gentiobiosa	+	1558
Ácido glucónico	+	1236
Glucosa	+	1569
Inositol	+	540
Lactosa	+	1336
Lactulosa	+	1184
Maltosa	+	1531
Maltotriosa	+	1544
Manitol	-	188
Manosa	+	1613
Melecitosa	+	1066
Melibiosa	+	1224
Metil D-galactósido	+	661
Metil D-galactósido	+	752
Metil-D-glucosa	+	1195
Metil-D-glucósido	+	1277
Metil-D-glucósido	+	1202
Metil-D-manósido	+	1396
Palatinosa	+	1508
Psicosa	+	1301
Rafinosa	+	1048
Ramnosa	+	851
Ribosa	+	898
Salicina	+	1493
Sedoheptulosano	+	1107
Sorbitol	+	1226
Estaquiosa	+	863
Sacarosa	+	1507
Tagatosa	+	1637
Trehalosa	+	1511
Turanosa	+	1439
Xilitol	+	1431
Xilosa	+	1595
Ácido acético	-	224
Ácido hidroxibutírico	+	1435
Ácido hidroxibutírico	+	1042
Ácido hidroxibutírico	-	243
Ácido hidroxifenil-acético	-	-197
Ácido cetoglutárico	+	1035
Ácido cetoaléxico	+	434
Lactamida	+	885
Éster metílico del ácido láctico	+	1313
Ácido láctico	+	1478
Ácido málico	+	1108
Ácido málico	+	824
Éster metílico del ácido pirúvico	+	1221

ES 2 659 152 T3

Éster monometílico del ácido succínico	+	1187
Ácido propiónico	+	370
Ácido pirúvico	+	1232
Ácido succinámico	+	1178
Ácido succínico	+	509
Ácido acetil-L-glutámico	+	1320
Alaninamida	+	1420
Alanina	-	-10
Alanina	-	286
Alanil-glicina	+	725
Asparagina	+	1080
Ácido glutámico	+	1113
Ácido glicil-L-glutámico	+	1035
Ácido piroglutámico	+	1229
Serina	+	1273
Putrescina	+	1065
Butanodiol	-	348
Glicerol	+	1294
Adenosina	+	1180
Desoxiadenosina	+	1011
Inosina	+	1492
Timidina	+	1141
Uridina	+	1165
Adenosina-5'-monofosfato	+	1112
Timidina-5'-monofosfato	+	1029
Uridina-5'-monofosfato	+	1085
Fructosa-6-fosfato	+	1066
Glucosa-1-fosfato	+	1375
Glucosa-6-fosfato	+	1368
Glicerol fosfato	+	1339

[0097] Cepa *Stenotrophomonas maltophilia* UI3E (DSM 27225): perfil metabólico

Sustrato	Microplaca GN2	Reacción	(DO)
Agua		-	0
$\alpha$ -ciclodextrina		-	3
Dextrina		+	392
Glucógeno		-	11
Tween 40		+	245
Tween 80		+	206
N-acetil-D-galactosamina		+	520
N-acetil-D-glucosamina		+	496
Adonitol		-	5
L-arabinosa		-	26
D-arabitol		-	-1
D-celobiosa		+	493
i-eritritol		-	0
D-fructosa		+	492
L-fucosa		-	4
D-galactosa		+	584
Gentiobiosa		+	487
$\alpha$ -D-glucosa		+	460
m-inositol		-	1
$\alpha$ -D-lactosa		+	405
Lactulosa		+	483
Maltosa		+	501
D-Manitol		-	2
D-manosa		+	549

ES 2 659 152 T3

D-melibiosa	+	369
$\beta$ -metil-D-glucósido	+	462
D-psicosa	+	297
D-rafinosa	-	12
L-ramnosa	-	3
D-sorbitol	-	3
Sacarosa	+	489
D-trehalosa	+	458
Turanosa	+	503
Xilitol	-	3
Éster metílico del ácido pirúvico	+	370
Éster monometílico del ácido succínico	+	437
Ácido acético	+	463
Ácido Cis-aconítico	+	397
Ácido cítrico	+	410
Ácido fórmico	B	67
Ácido D-galactónico lactona	-	4
Ácido D-galacturónico	-	8
Ácido D-glucónico	-	6
Ácido D-glucosamínico	-	1
Ácido D-glucurónico	-	7
Ácido $\alpha$ -hidroxibutírico	+	355
Ácido $\beta$ -hidroxibutírico	+	432
Ácido $\gamma$ -hidroxibutírico	-	8
Ácido p-hidroxifenil-acético		4
Ácido itacónico	-	1
Ácido $\alpha$ -cetobutírico	+	356
Ácido $\alpha$ -cetoglutárico	+	421
Ácido $\alpha$ -cetovalérico	+	289
Ácido D,L-láctico	+	395
Ácido malónico	+	379
Ácido propiónico	+	374
Ácido quínico	-	2
Ácido D-sacárico	-	3
Ácido sebácico	-	5
Ácido succínico	+	457
Ácido bromosuccínico	+	487
Ácido succinámico	-	9
Glucuronamida	-	3
L-alaninamida	+	205
D-alanina	+	260
L-alanina	+	248
L-alanil-glicina	+	274
L-asparagina	B	86
Ácido L-aspártico	B	113
Ácido L-glutámico	-	19
Ácido glicil-L-aspártico	+	338
Ácido glicil-L-glutámico	+	369
L-histidina	B	83
Hidroxi-L-prolina	-	3
L-leucina	+	216
L-ornitina	-	8
L-fenilalanina	-	3
L-prolina	+	301
Ácido L-piroglutámico	-	-4
D-serina	-	0
L-serina	+	382
L-treonina	+	290
D,L-carnitina	-	-1

## ES 2 659 152 T3

Ácido g-aminobutírico	-	1
Ácido urocánico	-	17
Inosina	+	250
Uridina	+	319
Timidina	-	0
Feniletilamina	-	-2
Putrescina	-	-2
2-aminoetanol	-	0
2,3-butanodiol	-	1
Glicerol	-	1
D,L- $\alpha$ -glicerol fosfato	-	2
$\alpha$ -D-glucosa-1-fosfato	-	6
D-glucosa-6-fosfato	-	10

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de eliminación de depósitos coherentes de diversa naturaleza, tanto orgánica como inorgánica, también superpuestos, de obras de arte y/o pinturas murales, **caracterizado porque** comprende las 5 siguientes etapas:

- a) la utilización de una o más cepas bacterianas no formadoras de esporas originales, aeróbicas, seleccionadas entre: *Stenotrophomonas maltophilia UI3E* DSM 27225, *Cellulomonas sp. THF11E* DSM 27224, *Pseudomonas koreensis UT30E* DSM 27226, inmovilizadas en un soporte inerte de arcilla sintética gelificante que tiene la fórmula  $\text{Na}_{0.7}[(\text{Si}_8\text{Mg}_{5.5}\text{Li}_{0.3})\text{O}_{20}(\text{OH})_4]$ , conocido con el nombre comercial de laponite (Laponite® RD Rockwood Additives, n.º CAS 53320-86-8);
- 10 b) la aplicación de una capa uniforme de dicho gel de laponite que contiene una o más de dichas cepas bacterianas sobre la superficie a tratar y dejar reaccionar durante al menos 24 horas a temperatura ambiente;
- c) la eliminación del gel de la superficie tratada;
- 15 d) la eliminación de los depósitos coherentes, reducidos y ablandados por el gel, con una esponja humedecida con agua y un cepillo.

2. Procedimiento de eliminación de depósitos coherentes de diversa naturaleza, tanto orgánica como inorgánica, también superpuestos, de obras de arte y/o pinturas murales, **caracterizado porque** comprende las 20 siguientes etapas:

- Etapa A: el análisis detallado de la composición química de los depósitos presentes en la superficie a tratar.
- Etapa B: la incubación de una o más de las cepas bacterianas seleccionadas en función del tipo de acción metabólica necesaria para realizar la mejor eliminación de depósitos, incluyendo: *Stenotrophomonas maltophilia UI3E* DSM 27225, *Cellulomonas sp. TBF11E* DSM 27224, *Pseudomonas koreensis UT30E* DSM 27226 en el 25 medio de cultivo CTS en agitación constante a 150 rpm a 28 °C, hasta alcanzar el valor de densidad óptica máximo.
- Etapa C: la centrifugación de cultivos bacterianos líquidos.
- Etapa D: la resuspensión de las células contenidas en los gránulos en un medio líquido con una composición variable en función de la cepa y del tipo de aplicación a la que se destina, según el siguiente esquema:
- 30 D1) para la eliminación de depósitos orgánicos, a saber, caseína, la cepa *Stenotrophomonas maltophilia UI3E* DSM 27225 se vuelve a suspender en una solución de pirofosfato de sodio al 0,5 % en p/v;
- D2) para la eliminación de depósitos de carbonato y yeso, la cepa *Cellulomonas sp. TBF11E* DSM 27224 se 35 vuelve a suspender en un medio de cultivo CTS diluido a 1:10 en v/v con agua desionizada.
- D3) para la eliminación de depósitos de fosfato, la cepa *Pseudomonas koreensis UT30E* DSM 27226 se vuelve a suspender en un medio de cultivo CTS diluido a 1:10 en v/v con agua desionizada.
- Etapa E: la adición de laponite a las suspensiones celulares a una concentración que oscila entre 5 y 15 % en 40 p/v.
- Etapa F: la incubación del gel que contiene las células bacterianas a una temperatura de 4 °C durante 16-20 horas.
- Etapa G: la aplicación, utilizando una espátula, del gel obtenido en las superficies a tratar durante al menos 24 45 horas a una temperatura entre 6 y 37 °C.
- Etapa H: la eliminación del gel mediante una espátula.
- Etapa I: la eliminación de los depósitos coherentes, reducidos y ablandados por el gel, con una esponja humedecida con agua y un cepillo.

3. Procedimiento de eliminación de depósitos coherentes de diversa naturaleza de obras de arte y/o 50 pinturas murales según la reivindicación 2, **caracterizado porque** en la etapa E se añade laponite a la suspensión celular a una concentración entre 7 y 11 % en p/v.

4. Procedimiento de eliminación de depósitos coherentes de diversa naturaleza de obras de arte y/o pinturas murales según la reivindicación 2, **caracterizado porque** en la etapa E se añade laponite a la suspensión 55 celular a una concentración de 9 % en p/v.

5. Uso de cepas bacterianas *Stenotrophomonas maltophilia UI3E* DSM 27225, *Cellulomonas sp. TBF11E* DSM 27224, *Pseudomonas koreensis UT30E* DSM 27226, de forma individual o en combinación, inmovilizadas en un soporte inerte de gel de laponite para la eliminación de depósitos coherentes de diversa naturaleza de obras de

arte y/o pinturas murales.

6. Uso de la cepa bacteriana *Stenotrophomonas maltophilia* UI3E DSM 27225 según la reivindicación 5 para la eliminación de depósitos orgánicos, específicamente caseína, de obras de arte y/o pinturas murales, en un estado de inanición fisiológica.
7. Uso de la cepa bacteriana *Cellulomonas sp. THF11E* DSM 27224 según la reivindicación 5 para la eliminación de depósitos de carbonato y yeso de obras de arte y/o pinturas murales.
- 10 8. Uso de la cepa bacteriana *Pseudomonas koreensis* UT30E DSM 27226 según la reivindicación 5 para la eliminación de depósitos a base de fosfato de obras de arte y/o pinturas murales.
9. Un cultivo biológico de uno o más microorganismos eficaces en un procedimiento de eliminación de depósitos coherentes de diversa naturaleza, orgánica e inorgánica, de obras de arte y/o pinturas murales,  
15 **caracterizado porque** dichos microorganismos se seleccionan de entre el grupo que consiste en: *Stenotrophomonas maltophilia* UI3E depositada ante la Deutsche Sammlung von Mikroorganism Und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania, con el número de identificación DSM 27225, *Cellulomonas sp. TBF11E* depositada ante la Deutsche Sammlung von Mikroorganism Und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania, con el número de  
20 identificación DSM 27224, *Pseudomonas koreensis* UT30E depositada ante la Deutsche Sammlung von Mikroorganism Und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania, identificada con el número DSM 27226.
10. Composición biológica constituida por la asociación de las cepas bacterianas según la reivindicación 9, individualmente o en combinación unas con otras, con una matriz inerte en forma de gel de laponite.
- 25 11. Kit para la biolimpieza de depósitos coherentes de obras de arte y/o murales que comprende:
- i) tubos que contienen cada uno una cepa bacteriana pura seleccionada entre: *Stenotrophomonas maltophilia* UI3E DSM 27225, *Cellulomonas sp. TBF11E* DSM 27224, *Pseudomonas koreensis* UT30E DSM 27226, liofilizada;
  - 30 ii) viales que contienen alícuotas del medio de cultivo para el crecimiento óptimo de las tres cepas liofilizadas individuales en una cantidad suficiente para una aplicación;
  - iii) viales que contienen alícuotas de agua desionizada esterilizada en una cantidad adecuada para disolver el contenido de un vial del medio de cultivo;
  - iv) sobres que contienen laponite, en una cantidad suficiente para una aplicación;
  - 35 v) medios para aplicar y eliminar la suspensión de microorganismos y laponite en la superficie a tratar;
  - vi) un manual de usuario con kit explicativo.