

La Ciencia y el Arte IV

Ministerio de
Educación, Cultura
y Deporte

Ciencias experimentales
y conservación del patrimonio

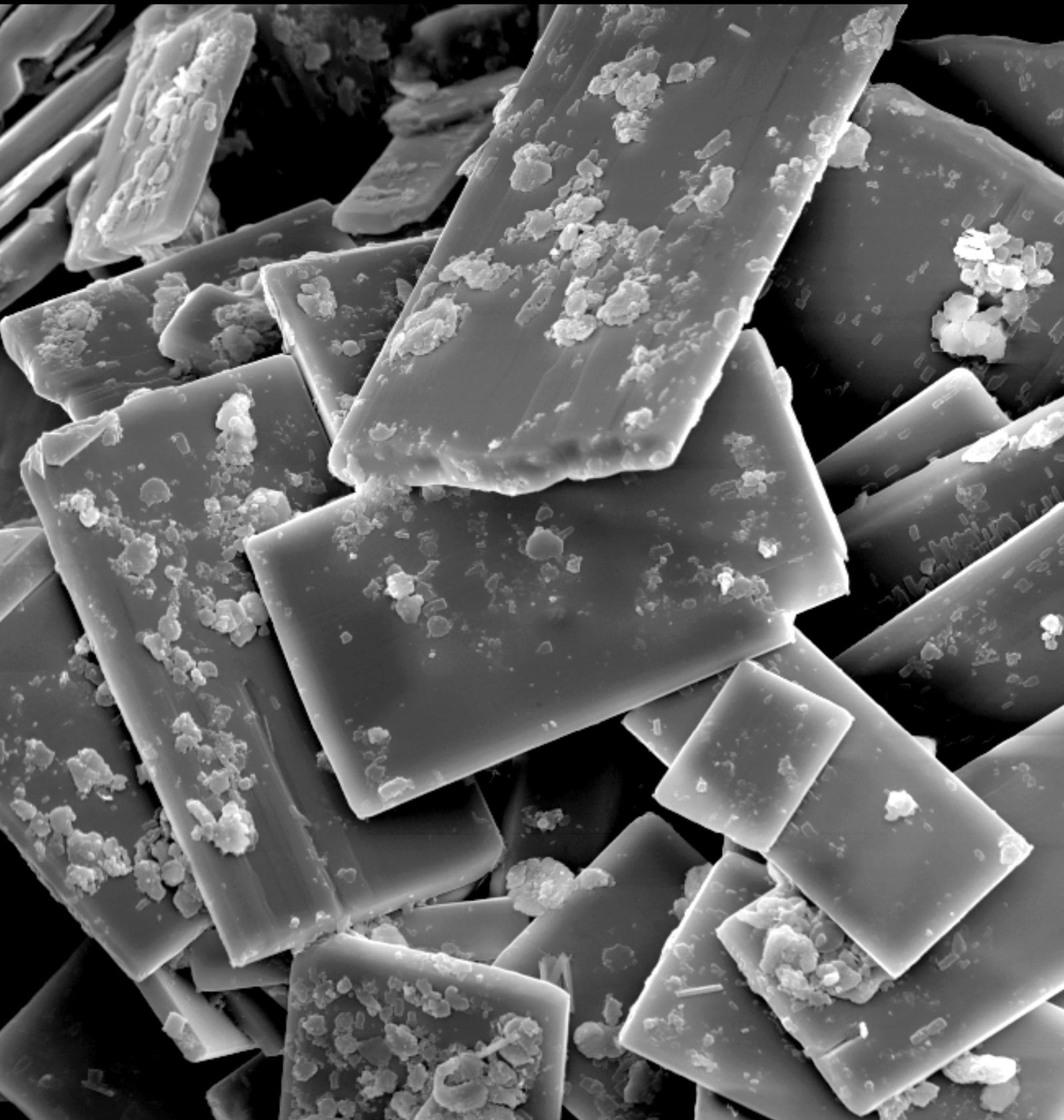


Imagen de cubierta

Imagen SEM-SE de las eflorescencias de singenita desarrolladas sobre latón en el Mausoleo de Gayarre (El Roncal, Navarra).
Fotografía: José V. Navarro.

La Ciencia y el Arte IV

Ciencias experimentales y conservación del patrimonio

Catálogo de publicaciones del Ministerio: www.mecd.gob.es
Catálogo general de publicaciones oficiales: publicacionesoficiales.boe.es

Edición 2013

Coordinación científica
Miriam Bueso

Coordinación de las jornadas
Daniel Vázquez
Universidad Complutense de Madrid
Marián del Egido
Instituto del Patrimonio Cultural de España
David Juanes
Instituto Valenciano de Conservación y Restauración

Consejo editorial del IPCE
Isabel Argerich Fernández
Félix Benito Martín
Ana Carrassón López de Letona
Soledad Díaz Martínez
María Domingo Fominaya
Guillermo Enríquez de Salamanca González
Adolfo García García
Lorenzo Martín Sánchez
Alfonso Muñoz Cosme
María Pía Timón Tiemblo

Corrección de textos
Educación y Patrimonio

Maquetación
Errata naturae



MINISTERIO DE EDUCACIÓN, CULTURA
Y DEPORTE

Edita:

© SECRETARÍA GENERAL TÉCNICA
Subdirección General
de Documentación y Publicaciones

© De los textos e imágenes: sus autores

NIPO: 030-13-241-5
DOI: 10.4438/030-13-241-5

ÍNDICE

Pág.

Consideraciones en torno a los estudios científicos aplicados a la conservación del patrimonio cultural	7
Marián del Egado, David Juanes y Miriam Bueso	
I. TÉCNICAS DE ANÁLISIS APLICADAS A BIENES CULTURALES	25
Estudio radiológico de las momias egipcias del Museo Arqueológico Nacional de Madrid	26
Esteban Llagostera Cuenca	
La Guardia Civil en la protección del patrimonio cultural subacuático: tecnología aplicada	48
Miguel Ángel Sanchidrián Ropero	
Arqueosismología: una nueva fuente de datos sísmicos y una herramienta para la protección del patrimonio	53
Miguel Ángel Rodríguez-Pascua, Raúl Pérez-López, Fidel Martín-González, Jorge Luis Giner-Robles y Pablo G. Silva	
La espectrometría de masas en tándem. Aplicación a la caracterización de las tintas en manuscritos del siglo xv al siglo xix	70
David Romera, Jose Sancenón, Miguel Gamón, Gemma Contreras, David Juanes y Gonzalo Fernández	
Termografía de infrarrojos aplicada a la conservación del patrimonio cultural	93
María Teresa Gil Muñoz y Juan Antonio Herráez Ferreiro	
II. CASOS DE APLICACIÓN	113
Últimas aportaciones de los láseres para la restauración de metales arqueológicos	114
Joaquín Barrio, M. ^a Cruz Medina, Juan P. Cid, A. I. Pardo, C. Escudero y E. Catalán	
Limpieza de pintura mural con bacterias	136
Pilar Bosch Roig, José Luis Regidor Ros y Rosa M. ^a Montes Estellés	
Extractos naturales para la desinfección y desinsectación de bienes culturales. Las plantas medicinales y el patrimonio histórico	148
Ramón Morales, Paloma Blanco, Paloma Lalana, Manuel Pardo de Santayana y Nieves Valentín	
La reflectografía infrarroja y la historia del arte	163
Ana González Mozo	
Estrategias aplicadas en el estudio del estado de conservación de la obra <i>Guernica</i> de Picasso	178
Jorge García Gómez-Tejedor	
Análisis de la microrugosidad mediante técnicas portátiles: aplicaciones y casos de estudio en patrimonio	198
Rafael Fort, Mónica Álvarez de Buergo, Carmen Vázquez-Calvo y Luz S. Gómez-Villalba	

III. PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	217
Conservación del patrimonio paleontológico. Criterios de intervención e innovaciones tecnológicas destinadas a su puesta en valor	218
Soledad Díaz, Manuel Blanco, Félix Pérez-Lorente, José Vicente Navarro, Josep Gisbert, Raquel Ferrer, Daniel Ayala y Pedro Pablo Pérez	
Efectos derivados de las intervenciones de conservación y restauración aplicados sobre material pétreo en el Conjunto Arqueológico de Mérida. Avance de investigación	227
Natalia Pérez Ema, Rosa Bustamante Montoro y Mónica Álvarez de Buergo	
Documentación, valorización y difusión del patrimonio hidráulico romano en el valle medio del Ebro	234
Jorge Angás Pajas y Paula Uribe Agudo	
Identificación de hongos causantes de pudrición en las bóvedas de las pinturas de la Sala de los Reyes de la Alhambra de Granada mediante técnicas de biología molecular	245
Víctor M. Menguiano Chaparro, José Román Pérez Castiñeira y Marta Sameño Puerto	
Reconocimiento y estudio de los efectos arqueosísmicos generados en el patrimonio durante el terremoto de Lorca: proyecto RESCATELO	251
Fidel Martín-González, Miguel Ángel Rodríguez-Pascua, Raúl Pérez-López y Jorge Luis Giner-Robles	
Nanomateriales para la conservación y preservación de obras mueble e inmueble. Posibles enfoques aplicados al patrimonio documental	259
Elena González, Carmen Peña y Emma Sánchez	
Conservación-restauración del patrimonio cultural metálico por técnicas electroquímicas: desarrollo de una metodología específica adaptada al diagnóstico y tratamiento (CREMEL)	268
Emilio Cano, Diana Lafuente, J. Pérez, M. ^a Llanos Flores, I. Martínez, Inmaculada Traver, Livio Ferrazza, Soledad Díaz, Emma García, E. Martín y P. Letardi	
La contaminación por compuestos orgánicos en museos y exposiciones: estudio, análisis y efectos sobre el patrimonio cultural metálico	273
Diana Lafuente y Emilio Cano	
Métodos de documentación, análisis y conservación no invasivos para el arte rupestre postpaleolítico: radiometría de campo e imágenes multiespectrales. Ensayos en la cueva del tío Garroso (Alacón, Teruel)	279
María Sebastián López, Marcos Palomo Arroyo, Joaquín A. Rincón Ramírez, Santiago Ormeño Villajos y Juan Manuel Vicent García	
Protocolo analítico científico aplicado a la identificación de microorganismos y al estudio del biodeterioro en bienes culturales. Análisis en pintura sobre lienzo	288
Fernando Poyatos Jiménez, Inés Martín Sánchez y Fernando Bolívar Galiano	
La conservación de materiales óseos: antiguos tratamientos y nuevas alternativas de intervención	298
Trinidad Pasíes Oviedo	
Preeminencia y complementariedad: reflexión sobre las relaciones interdisciplinarias en los estudios del patrimonio cultural. El caso de la serie de retratos de los condes de Flandes y los abades de Nuestra Señora de las Dunas de Koksijde, Bélgica	306
Francisco Mederos-Henry, Aline Genbrugge, Karen Bonne y Julia Kohl	

Identificación de hongos causantes de pudrición en las bóvedas de las pinturas de la Sala de los Reyes de la Alhambra de Granada mediante técnicas de biología molecular

Víctor M. Menguiano Chaparro

Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico
victorm.menguiano@juntadeandalucia.es

José Román Pérez Castiñeira

Universidad de Sevilla
jroman@us.es

Marta Sameño Puerto

Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico
marta.sameno@juntadeandalucia.es

Resumen: En este trabajo se presentan los resultados obtenidos tras aplicar técnicas de biología molecular, basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y amplificación de ADNr, para la identificación de hongos de pudrición de la madera, extrayendo ADN directamente de una muestra de madera con pudrición.

Palabras clave: Biología molecular, identificación, hongos de pudrición, ADN, PCR.

Abstract: This work presents the obtained results after applying molecular biology techniques, based on the polymerase chain reaction (PCR) and rDNA amplification, to identify wood decay fungi, extracting DNA directly from decay wood.

Keywords: Molecular biology, identification, decay fungi, DNA, PCR.

Introducción

El estudio previo para la conservación-restauración de las pinturas de la Sala de los Reyes de la Alhambra de Granada reveló que la madera soporte de las bóvedas (*Populus alba*), sobre las que se asientan las pinturas, sufría un proceso de biodeterioro causado por hongos de pudrición de la madera (fig. 1).



Figura 1. Vista del reverso de una de las bóvedas, donde se aprecian zonas con pudrición. Fotografía: Víctor M. Menguiano.

La detección e identificación precisa de los microorganismos involucrados en los procesos de biodeterioro de los bienes culturales es el primer paso necesario para su conservación, pero por sus características intrínsecas, los hongos de pudrición no pueden ser fácilmente detectados e identificados mediante técnicas microbiológicas tradicionales, basadas en aislamiento y cultivo en laboratorio para posterior caracterización de sus micelios y estructuras reproductoras.

La observación de varias muestras de madera con pudrición al microscopio óptico con luz polarizada, evidenció la presencia de hifas fúngicas que no pudieron ser identificadas, por lo que se recurrió a técnicas de biología molecular, aislando ADN fúngico directamente de las muestras de madera con pudrición.

Materiales y métodos

Muestras

Se utilizaron tres pequeñas muestras de madera con pudrición tomadas del reverso de una de las bóvedas. Dichas muestras se mantuvieron previamente en una cámara húmeda (90% HR) a temperatura ambiente.

Extracción del ADN

Para la extracción de ADN, primero las muestras de madera con pudrición se pulverizaron en un mortero de porcelana, con ayuda de nitrógeno líquido.

Posteriormente, se utilizó el kit comercial de extracción de ADN *Zymo Research Fungal/Bacterial DNA Kit*, siguiendo el protocolo del fabricante, excepto que se utilizó agua Milli-Q

(*Sigma W4502*) en lugar del tampón de elución del fabricante. De esta forma, se obtuvieron soluciones de 100 μ l.

La extracción de ADN fue verificada mediante electroforesis, de 18 μ l de cada solución obtenida, en gel de agarosa al 0,7% en tampón TBE $\frac{1}{2}$ y teñido con bromuro de etidio. La electroforesis se realizó a 120V, durante 30 minutos, y se usó como patrón ADN de fago λ (*Promega*) digerido con las endonucleasas de restricción HindIII y EcoRI con un patrón de bandas en un rango de 564 a 21226 pb.

Amplificación por PCR

El ADN extraído se utilizó como molde para la amplificación mediante PCR de un fragmento del gen que codifica la subunidad 28S del ARN ribosómico de eucariotas. Para ello se utilizaron como cebadores dos oligonucleótidos correspondientes a sendas secuencias consenso utilizados convencionalmente para la amplificación y secuenciación de dicho fragmento. Los oligonucleótidos, cuyas secuencias son 5'-ACCCGCTGAATTTAAGCAT-3' (FW) y 5'-TCCGTGTTTCAAGACGG-3' (REV), fueron sintetizados por la empresa Eurofins MWG *Operon*. Estos cebadores amplifican una sola banda de ADN de unas 600 pares de bases (pb) de longitud.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 μ l y contenían: 1 μ l de ADN molde, 5 μ l de tampón Taq DNA polimerasa, 1 μ l de Taq DNA polimerasa (5 U), 2 μ l de mezcla de dNTPs 10 mM cada uno, 50 pmol de cada cebador, completando con agua Milli-Q (*Sigma W4502*).

El termociclador (*MyCyclerTM* de *Bio-Rad*) se programó con las siguientes condiciones: dos minutos a 95° C para la desnaturalización del ADN molde, seguido de 40 ciclos de un minuto de desnaturalización a 95° C, un minuto de hibridación de cebadores a 55° C y un minuto de elongación a 72° C, con un paso de extensión final de 10 minutos a 72° C.

Para comprobar la efectiva amplificación del fragmento de DNA, de aproximadamente 600 pb, una muestra de 25 μ l del producto resultante de la PCR se corrió mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en 150 ml de tampón TBE $\frac{1}{2}$ teñido con bromuro de etidio, a 120 V, durante 30 minutos.

Purificación y cuantificación del ADN

Las bandas de ADN incluidas en el gel de agarosa se recuperaron y purificaron mediante el kit comercial de purificación *Bioline Isolate PCR and Gel Kit*, siguiendo las instrucciones del fabricante (excepto que se utilizó agua Milli-Q en lugar del tampón de elución del fabricante), obteniéndose una solución de 30 μ l de ADN puro.

La cuantificación del ADN purificado se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa y comparación frente a un marcador de pesos moleculares, y mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (A260) con un espectrofotómetro *NanoDrop*.

Secuenciación

Una vez cuantificadas las muestras de ADN, éstas se prepararon y enviaron para su secuenciación al Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (CSIC) de Granada, donde la se-

cuenciación de ADN se realiza mediante el procedimiento de secuenciación cíclica utilizando la química *BigDye Terminator v3.1* y electroforesis en sistema multicapilar automático.

Análisis Blast

Con el fin de determinar a qué especies corresponden las secuencias de ADN obtenidas a partir de las muestras, se realizó una comparación mediante análisis Blast de éstas con las existentes en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA), utilizando el programa «nucleotide blast»¹.

Resultados y discusión

La observación bajo luz ultravioleta de la electroforesis de verificación de extracción revela bandas de ADN, pero muy tenues, es decir, se obtuvo poco ADN. Esto es lógico si tenemos en cuenta que no partimos de cultivos fúngicos, sino directamente de muestras de madera con pudrición, cuyo tamaño era reducido (unos 5 cm³). No obstante, la cantidad obtenida fue suficiente para amplificar por PCR.

Las soluciones de ADN obtenidas presentaban una ligera pigmentación, mayor cuanto más podrida estaba la muestra de madera, debida a subproductos de la descomposición de la madera (por ejemplo ácidos húmicos) que co-precipitan con el ADN. Estas sustancias podrían inhibir la posterior reacción de amplificación por PCR, aunque no fue el caso.

La electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos (fig. 2), muestra una amplificación satisfactoria, tanto en cantidad, como en el tamaño del fragmento amplificado, de aproximadamente 600 pb de longitud.

Se intentó una cuantificación del ADN purificado mediante electroforesis en gel de agarosa y comparación frente a un marcador de pesos moleculares, pero dada la poca cantidad de ADN purificado, no fue posible.

Por ello la cuantificación se realizó mediante espectrofotometría. Las concentraciones de ADN obtenidas para las muestras 1, 2 y 3 fueron, respectivamente, 4,4, 6,1 y 4,7 ng/μl.

Una vez obtenidas las secuencias de los fragmentos amplificados, se comprobó que és-

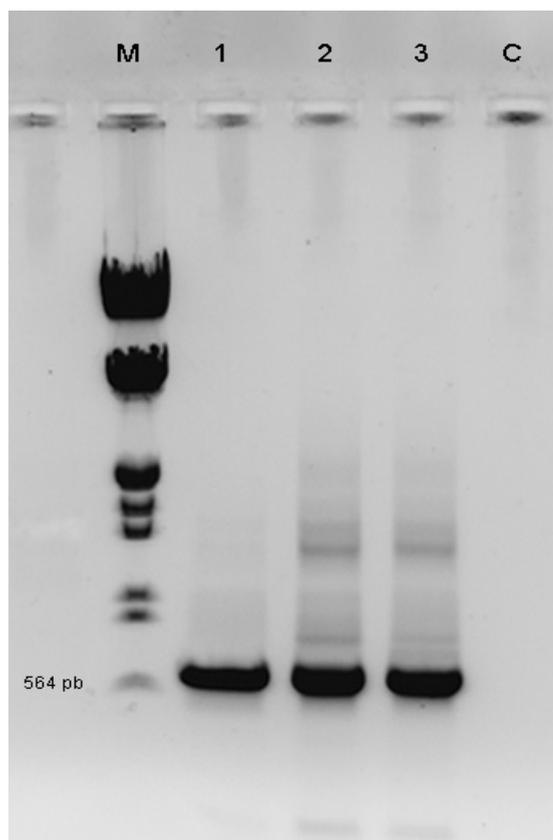


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando los productos amplificados por PCR. M=marcador molecular, C=control sin ADN molde. Fotografía: José Román Pérez Castiñeira.

¹ Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

tas no eran buenas en el caso de las muestras 1 y 3, debido probablemente a que la cantidad de ADN presente en la muestra fuera inferior a la necesaria para la correcta secuenciación.

El análisis comparativo Blast de la secuencia de la muestra 2 con las secuencias de referencia (fig. 3) mostró que este fragmento amplificado presenta una homología del 99 % con la secuencia de referencia de *Petriella setifera*, un ascomiceto causante de pudrición blanda de la madera.

Conclusiones

Este trabajo demuestra que es posible la detección e identificación de los hongos xilófagos directamente a partir de la muestra de madera podrida, evitando la necesidad de cultivo previo, por lo que dicha detección e identificación no estaría limitada por la capacidad de cultivo de las especies fúngicas.

Sin embargo, la identificación no resulta sencilla cuando aparecen varias especies de hongos xilófagos en una misma muestra de madera, algo habitual en muestras biológicas naturales, de gran diversidad. En estos casos es más difícil la identificación de todos los microorganismos, pues los fragmentos amplificados pertenecen a distintas especies y se obtiene una superposición de secuencias. Se está salvando este inconveniente mediante clonación de los fragmentos amplificados y análisis de restricción enzimática de los fragmentos de ADN clonados.

```
>gb|DQ470969.1| Petriella setifera isolate AFTOL-ID 956 28S large subunit ribosomal
RNA gene, partial sequence
Length=1297

Score = 1009 bits (1118), Expect = 0.0
Identities = 568/574 (99%), Gaps = 0/574 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 18  TGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGGCCTCTGG 77
Sbjct 1  TGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGGCCTCTGG 60

Query 78  GCCGTCGAGTTGTAATTTGAAGAGGATGCTTTTGGCGAGGCGCCTTCGAGTGCCCTGG 137
Sbjct 61  GCCGTCGAGTTGTAATTTGAAGAGGATGCTTTTGGCGAGGCGCCTTCGAGTGCCCTGG 120

Query 138  AACGGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCGTATGGTTGGACGCCGAGCCTCTGTAAAGCT 197
Sbjct 121  AACGGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCGTATGGTTGGACGCCGAGCCTCTGTAAAGCT 180

Query 198  CCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAATGGGAGGTAACCCCTTCTAA 257
Sbjct 181  CCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAATGGGAGGTAACCCCTTCTAA 240

Query 258  AGCTAAATACTGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCA 317
Sbjct 241  AGCTAAATACTGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCA 300

Query 318  CTTTGAAAAGAGAGTTAAATAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGGAAAGCGCTTGCGACCAGA 377
Sbjct 301  CTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGGAAAGCGCTTGCGACCAGA 360

Query 378  CTTGTGCCCGTCGAATCAGCCGCGCTCGCCGGCGGCGCACTTCGGCGGGCTCAGGCCAG 437
Sbjct 361  CTTGTGCCCGTCGAATCAGCCGCGCTCGTCGGCGGCGCACTTCGGCGGGCTCAGGCCAG 420

Query 438  CATCATTTGCTGCAGGGGGAGAAAGCGGCGGGAATGTGGCTCTTCGGAGTGTTATAGC 497
Sbjct 421  CATCAGTTGCTGCAGGGGGAGAAAGCGATGGGAATGTGGCTCTTCGGAGTGTTATAGC 480

Query 498  CCGCCGCGCAATACCCCTCGGCGGACTGAGGACCGCGCATCTGCAAGGATGCTGGCGTAA 557
Sbjct 481  CCGCCGCGCAATACCCCTCGGCGGACTGAGGACCGCGCATCTGCAAGGATGCTGGCGTAA 540

Query 558  TGGTCGTCAGCGACCCGTCCTTGAAACACGGAACA 591
Sbjct 541  TGGTCGTCAGCGACCCGTCCTTGAAACACGGAACA 574
```

Figura 3. Alineamiento mediante análisis Blast de la secuencia obtenida de la muestra 2 con la aparecida en la base de datos.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto Andaluz del Patrimonio Hist́rico, y se enmarca dentro del Convenio Específico de Colaboración entre el Patronato de la Alhambra y Generalife y el Instituto Andaluz del Patrimonio Hist́rico para el desarrollo del Proyecto de conservaci3n de las pinturas de la Sala de los Reyes de la Alhambra.

Bibliograf́a

- GONZÁLEZ, J. M., y SAIZ-JIMÉNEZ, C. (2005): «Application of molecular nucleic acid-based techniques for the study of microbial communities in monuments and artworks», en *International Microbiology*, 8(3), pp. 189-194.
- GUGLIELMO, F.; BERGEMANN, S. E.; GONTHIER, P.; NICOLOTTI, G., y GARBELOTTO, M. (2007): «A multiplex PCR-based method for the detection and early identification of wood rotting fungi in standing trees», en *Journal of Applied Microbiology*, 103, pp. 1490-1507.
- HOGBERG, N., y LAND, C. J. (2004): «Identification of *Serpula lacrymans* and other decay fungi in construction timber by sequencing of ribosomal DNA: A practical approach», en *Holzforschung*, 58, pp. 199-204.
- JASALAVICH, C. A.; OSTROFSKY, A., y JELLISON, J. (2000): «Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified genes encoding rRNA», en *Applied and Environmental Microbiology*, 66, pp. 4725-4734.
- JELLISON, J., y JASALAVICH, C. A. (2000): «A review of selected methods for the detection of degradative fungi», en *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46, pp. 241-244.
- MORETH, U., y SCHMIDT, O. (2001): «Identification of indoor rot fungi by taxon-specific priming polymerase chain reaction», en *Holzforschung*, 54, pp. 1-8.
- NICOLOTTI, G.; GONTHIER, P.; GUGLIELMO, F., y GARBELOTTO, M. (2009): «A Biomolecular Method for the Detection of Wood Decay Fungi: A Focus on Tree Stability Assessment», en *Arboriculture & Urban Forestry*, 35(1), pp.14-19.
- SARRÓ, M. I., y ARROYO, I. (2008): «Microbiología y biología molecular aplicada al patrimonio en el IPHE», en *Revista Bienes Culturales*, 8, pp. 197-210.
- WARD, D. M.; WELLER, R., y BATESON, M. M. (1990): «16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community», en *Nature*, 345, pp. 63-65.