

**BIODETERIORO
POR MICROALGAS
EN FUENTES DE
MÁRMOL**

TESIS DOCTORAL

YAIZA PERAZA ZURITA
DEPARTAMENTO DE PINTURA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

BIODETERIORO POR MICROALGAS EN FUENTES DE MÁRMOL

DESCRIPCIÓN Y FORMAS DE ALTERACIÓN RELACIONADAS
PROPUESTA DE MATERIAL DE INTERVENCIÓN
INTERACCIONES ENTRE MICROALGAS Y SUSTRATO: ESTUDIO DE
SUPERFICIES

Yaiza Peraza Zurita

Tesis Doctoral

dirigida por

Fernando C. Bolívar Galiano y Pedro M. Sánchez Castillo

2004

Universidad de Granada



BIODETERIORO POR MICROALGAS EN FUENTES DE MÁRMOL

ÍNDICE

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	i
INTRODUCCIÓN	1
BIODETERIORO POR MICROALGAS Y FORMAS DE ALTERACIÓN RELACIONADAS	2
CONCEPTOS	3
ALTERACIONES CROMÁTICAS	6
ALTERACIONES POR ACUMULACIÓN DE MATERIA	9
ALTERACIONES POR PÉRDIDA DE MATERIA	12
ESTADO ACTUAL DEL TEMA	14
MATERIALES DE INTERVENCIÓN PROPUESTOS	16
INTERACCIONES ENTRE MICROALGAS Y SUSTRATO	17
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	18

Parte I: DESCRIPCIÓN Y FORMAS DE ALTERACIÓN RELACIONADAS

I.I. MATERIALES Y MÉTODOS	25
MATERIAL ARTÍSTICO	25
ESTADO DE CONSERVACIÓN	32
MATERIAL BIOLÓGICO	34
MICROALGAS: TERMINOLOGÍA Y CONCEPTOS BÁSICOS	34
CIANOFITAS	37
BACILARIOFÍCEAS	38
CLOROFITAS	39
RECOLECCIÓN DE ESPECIES IMPLICADAS	40
CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMAS DE ALTERACIÓN RELACIONADAS	42
COLORIMETRÍA	42
ANÁLISIS MINERALÓGICO	45
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	46
I.II. RESULTADOS	47
AGENTES DE BIODETERIORO	47
FORMAS DE ALTERACIÓN RELACIONADAS	53
COLORIMETRÍA	54
ANÁLISIS MINERALÓGICO	56
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	56
DESCRIPCIÓN GENÉRICA	58
I.III. DISCUSIÓN	61
AGENTES DE DETERIORO: BIODETERIORO POR MICROALGAS EN LAS FUENTES ESTUDIADAS	61
BIOTIPOS	61
ALHAMBRA	62
BIBATAUÍN	62
REALES ALCÁZARES	63
GÉNEROS IDENTIFICADOS	64

CIANOFITAS	64
BACILARIOFÍCEAS	66
CLOROFITAS	67
FORMAS DE ALTERACIÓN RELACIONADAS	69
Parte II: PROPUESTA DE MATERIAL DE INTERVENCIÓN	
II.I. MATERIALES Y MÉTODOS	73
MÁRMOLES Y RESINAS SINTÉTICAS	73
RESINA DE POLIÉSTER	73
RESINA GEL-COAT	75
RESINA EPOXÍDICA	75
ELABORACIÓN DE LAS PROBETAS	77
ESTUDIOS FÍSICO-QUÍMICOS	78
ESTUDIO BIOLÓGICO	78
II.II. RESULTADOS	83
PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS COMPARADAS	83
SUSCEPTIBILIDAD ANTE LOS AGENTES DE BIODETERIORO	86
II.III. DISCUSIÓN	89
PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LOS MATERIALES COMPARADOS	89
SUSCEPTIBILIDAD AL BIODETERIORO POR MICROALGAS	90
MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS	94
Parte III: INTERACCIONES ENTRE MICROALGAS Y MATERIALES PÉTREOS: ESTUDIO DE SUPERFICIES	
III.I. MATERIALES Y MÉTODOS	99
PLANTEAMIENTOS TEÓRICOS	99

MEDIDA DE ÁNGULOS DE CONTACTO	101
ADHESIÓN DE MICROORGANISMOS HIDROCARBUROS	106
SUSTRATOS PÉTREOS ESTUDIADOS	107
MICROALGAS ESTUDIADAS	109
PROTOCOLOS DE TRABAJO	112
MEDIDA DE ÁNGULOS DE CONTACTO SOBRE SUSTRATOS PÉTREOS	112
MEDIDA DE ÁNGULOS DE CONTACTO SOBRE MICROALGAS	113
ADHESIÓN DE MICROORGANISMOS HIDROCARBUROS	117
III.II. RESULTADOS	119
MEDIDA DE ÁNGULOS DE CONTACTO	119
ADHESIÓN DE MICROORGANISMOS A HIDROCARBUROS	124
III.III. DISCUSIÓN	127
MÉTODOS DE ANÁLISIS EMPLEADOS	127
MEDIDA DE ÁNGULOS DE CONTACTO	127
ADHESIÓN DE MICROORGANISMOS A HIDROCARBUROS	133
CUALIDADES SUPERFICIALES, HIDROFOBICIDAD Y ADHESIÓN	136
MATERIALES PÉTREOS	136
MICROALGAS	140
INTERACCIONES	144
CONCLUSIONES	149
BIBLIOGRAFÍA	153
ANEXOS	173
ANEXO I- ESPECIES EN FUENTES	
ANEXO II- COLORIMETRÍA	
ANEXO III- DIFRACTOGRAMAS	
ANEXO IV- COLONIZACIÓN DE LAS PROBETAS	
ANEXO V- ESTUDIO DE SUPERFICIES DE MICROALGAS Y SUSTRATO: RESULTADOS	

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos, sobre todo, a mis padres, que tienen una paciencia...

Y a mis dos directores, Fernando y Pedro, por el mismo motivo, además de por muchos otros, y no precisamente porque Pedro haya nacido el mismo día que el ilustre B., ni porque Fernando sea, como su nombre indica, el excelentísimo fundador del Bolívar F.C. (no es broma, ya son 6 sin contar al perro, y el asunto promete). No sé qué hubiera sido de mí sin su ayuda y su apoyo. Bueno, creo que sí lo sé, y por eso les estoy tan agradecida.

Y al Gobierno de Canarias, que me ha financiado la investigación; dentro del personal del Gobierno, agradecimientos especiales a D. Cristo Mora, de infinita paciencia y eficiencia.

Y también gracias a otro Fernando, González Caballero; la cosa parece que va de nombres, y qué bien le sienta a este Fernando el suyo. Y también agradecimientos a Giuseppe, que no sólo es de Catania sino que también me ha ayudado muchísimo, siempre tan incoraggiante, igual que Eduardo Sebastián, su dire. Y a otro Eduardo, Linares, aunque se fuera del laboratorio dejándome sola ante el peligro... Y a José María, gracias por confiar en mí. Y a los físicos del zulo (Ceci, Julián & Co, ánimo, chicos). Y a la gente de Valencia. Y a Ana G. Yebra, qué amable y dispuesta a ayudar en todo momento. Así da gusto, de verdad. Y no están todos los que son: en cada uno de los departamentos a que pertenecen los aquí nombrados

(Pintura, Biología Vegetal, Física Aplicada, Mineralogía, Óptica) hay un montón de personas que se han mostrado cariñosas y me han ayudado mucho. Pero evitemos que esto parezca la guía de teléfonos...

Porque están también aquellos que, fuera de la Universidad, me han soportado cuando estaba insoportable (mamma mia), me han sostenido cuando las cosas se ponían difíciles, y, lo mejor, han celebrado los momentos buenos conmigo; por supuesto, les estoy muy, muy agradecida por todo eso. Especialmente a Chelo y sus hijos, y a Pepe y sus padres, que son mis familias adoptivas en Granada. Pero también a la Crispi (no está incluida entre los hijos de Chelo sólo porque no es su hija), a Sara (e sua madre, certo), a Kasia (qué divertidos son estos polacos), a Ingrid (aunque está en el laboratorio, casi la prefiero fuera, comentando lo que pasa dentro con su compi, qué risa). Y además están los que estaban, que en cierto modo siguen estando (esto se complica): Emmanuelle, Mikolaj (¿dije ya que los polacos son muy divertidos?), Eva, el danés, Oliver (actualmente en paradero desconocido, como casi siempre), Carolina, Elena. Y los que, aunque no hayan estado nunca, también están siempre: Agoney, Marco, Tanja, Remei (bueno, ellas dos sí estuvieron, pero sólo una semana), Rebeca, Pablo, Roberto,... Es más que probable que ninguno de ellos lea este agradecimiento en un futuro cercano, pero para mí es importante que salgan aquí, porque de verdad, les estoy muy agradecida.

Bien, si sigo con esto voy a caer en el sentimentalismo, y luego nadie tendrá energías para leer lo demás, que es lo que se supone que hay que leer. De modo que mejor paro ya. La última: gracias, sinceramente, muchas gracias a todos los que de una forma u otra me han ayudado.

INTRODUCCIÓN

El deterioro de una roca comienza desde el momento en que se extrae de la cantera. Las alteraciones de los materiales pétreos expuestos a la intemperie se deben a procesos físicos, químicos y biológicos, entre los cuales figuran la disolución de carbonatos y sulfatos, la solubilización de silicatos, alteraciones por cristalización de sales y diferencias en las presiones de hidratación, y colonizaciones microbianas (Alvarez *et al.*, 1994; Viles y Moses, 1996), y el efecto es mayor cuando estos fenómenos se dan de forma conjunta (Yates y Butlin, 1996; Warke y Smith, 1998).

Cuando estos materiales se encuentran formando parte de obras de interés patrimonial, los efectos de las alteraciones tienen repercusiones desde el punto de vista histórico y cultural, pero también en términos económicos e incluso turísticos. Estos fenómenos y sus consecuencias han sido, desde hace décadas, objeto de numerosos estudios, de carácter cada vez más específico (Ramchandran, 1953; Stambolov y van Asperen de Boer, 1967; Plenderleith, 1968; Dukes, 1972; Schaffer, 1972; Sengupta, 1979; Martines, 1983; Ashurst y Ashurst, 1988; Griffin *et al.*, 1991; Caneva *et al.*, 1994; Groth y Saiz-Jiménez, 1999; Papida *et al.*, 2000, entre otros).

En el caso concreto de las fuentes monumentales, la piedra se encuentra en contacto con el agua de forma permanente o intermitente, lo que conlleva fenómenos de deterioro característicos. Pese a la relevancia de este tipo de monumentos dentro del panorama del Patrimonio Artístico general, el estudio en este campo es relativamente escaso, y únicamente en los últimos años encontramos trabajos que lo tratan en exclusiva (entre los pioneros, Foged, 1983; Giacobini y Giuliani, 1987; Bolívar Galiano y

García Rowe, 1994; Ricci y Pietrini, 1994). Estos trabajos ponen de manifiesto el importante papel de ciertos microorganismos en los procesos de deterioro de estos monumentos: son las microalgas las protagonistas en esos procesos.

Algunas microalgas presentan una gran tendencia a agruparse entre sí o adherirse a diversos sustratos, ya que su supervivencia depende de ello, lo que ha venido a llamarse “dependencia del anclaje” (*anchorage dependence*, Pierres *et al.*, 2002). Cuando se adhieren a un sustrato, se desencadena una serie de procesos múltiples que llevan a la formación de películas microbianas o biofilms. En la evolución de estos procesos pueden distinguirse varias fases (Boonaert *et al.*, 2001): en primer lugar, macromoléculas de distintos orígenes se fijan al sustrato por adsorción, acondicionándolo para una eventual colonización. Los microorganismos se aproximan al sustrato mediante movimientos propios y brownianos, y entonces se producen interacciones físico-químicas con las moléculas adsorbidas, que conducen a una adhesión primaria de las células. El posterior anclaje de los microorganismos se provoca mediante la excreción de productos poliméricos extracelulares (EPS). A partir de este punto la multiplicación celular lleva a la proliferación de las comunidades microbianas y la consiguiente colonización del sustrato.

BIODETERIORO POR MICROALGAS Y FORMAS DE ALTERACIÓN RELACIONADAS

Las microalgas provocan fenómenos de biodeterioro en las fuentes monumentales de forma directa, a causa de la colonización y los procesos metabólicos; esto, a su vez, da origen a un deterioro secundario, debido a los productos de alteración que generan, especialmente las costras carbonatadas. Además, la presencia de las microalgas activa otros tipos de deterioro, propiciando reacciones químicas y alteraciones físicas del sustrato (Griffin *et al.*, 1991). También se ve favorecido el desarrollo de otros organismos (Krumbein, 1991; Ascaso *et al.*, 1998; Tomaselli *et al.*, 2000-b), lo que hace del biodeterioro un complejo conjunto de procesos relacionados entre sí (Caneva *et al.*, 1994).

Las alteraciones más llamativas que provocan las microalgas están determinadas, principalmente, por la formación de biofilms en el sustrato.

A causa de estas películas, la superficie de la piedra pierde cohesión, pues se ve afectada por los cambios de dimensión (contracciones y dilataciones) de los mismos. La componente mucilaginoso de los biofilms, que tiene su origen en las vainas de polisacáridos que envuelven a las algas, conlleva la pérdida de materia, puesto que las partículas pétreas, una vez sueltas, se adhieren al biofilm y se desprenden del sustrato cuando la capa biológica cambia de volumen (Saiz-Jimenez, 1999). Mediante este mecanismo de fijación de materia inorgánica, y también mediante otros mecanismos exclusivamente biológicos, las microalgas forman costras minerales o estromatolitos (Golubic, 1973 y 1987; Borowitzka, 1989), en cuya composición hay mayoritariamente carbonato cálcico. No se deben confundir estas estructuras calcíticas con las producidas mediante silificación, un proceso propio de la fisiología de un tipo de microalgas, las diatomeas, pero que no lleva a la formación de estromatolitos (Darley, 1982).

Los efectos de las costras estromatolíticas sobre los sustratos artísticos son muy perjudiciales, ya que, debido a su diferente porosidad y, por consiguiente, diferente peso específico, sufren expansiones y contracciones térmicas en distinta medida que el sustrato, lo que ocasiona tensiones que lo debilitan (Brüggerhof *et al.*, 1999). La formación de estas pátinas biológicas, además, implica la presencia continua de agua, lo que se traduce en otros daños físicos potenciales, como los provocados por gelificación (Bolívar Galiano, 1994; Saiz-Jiménez, 1999). De la misma manera, no es desdeñable la contribución de estos microorganismos a procesos de deterioro químico, esencialmente a causa de la excreción de productos metabólicos (Sand, 1997), y a la acumulación y retención de agua, medio idóneo para que tengan lugar interacciones químicas diversas (May *et al.*, 1993).

CONCEPTOS

Cuando se habla de mecanismos de alteración de origen biológico suelen emplearse indistintamente o confundirse diversos términos que, si bien están incluidos en un mismo campo semántico, poseen matices en su significado que les distingue. Es importante conocer estos matices para

hacer un uso adecuado de ellos. Por este motivo, resultaría conveniente establecer las diferencias entre ellos antes de profundizar en este estudio. A continuación se expone un breve glosario que explica algunos términos que aparecen en este trabajo o están relacionados con el tema del mismo:

Degradación- proceso mediante el cual una sustancia compleja se transforma en otras más sencillas. Este término no implica que el cambio producido tenga resultados que puedan considerarse negativos.

Biodegradación- degradación desencadenada por seres vivos. El término se emplea para indicar procesos fisiológicos y ecológicos, a veces de aplicación industrial, como en el caso del reciclaje de residuos.

Deterioro- contrariamente a lo que ocurre en el caso de la degradación, en el proceso de deterioro de un objeto sí va implícito un cambio negativo en su estado. Comúnmente hace referencia a procesos que conllevan un perjuicio para la Industria o el Patrimonio.

Biodeterioro- será, pues, un deterioro producido por agentes biológicos, esto es, por organismos vivos. El biodeterioro normalmente se desencadena cuando los organismos colonizan un sustrato en avanzado estado de deterioro, mucho más vulnerable (fig. 0.1).

Colonización- ocupación de un sustrato por organismos vivos. El término no tiene connotaciones necesariamente negativas.

La colonización se produce mediante procesos de adhesión y adsorción al sustrato, que se ven influidos por las características del mismo y de los propios organismos.



Fig. 0.1- Efectos del biodeterioro en un león fenicio de Sòlunto, Sicilia.

Sustrato- desde el punto de vista del biodeterioro, se puede entender este término de dos maneras: a) como el espacio o superficie donde se desarrolla la actividad biológica, y b) como la fuente de energía que emplean los organismos para desarrollarse (Dornieden *et al.*, 2000; Gorbushina y Krumbein, 2000).

Adhesión- depósito estable de un material sobre otro (Boonaert *et al.*, 2002).

Adsorción- retención de moléculas de un material en la superficie de otro (Boonaert *et al.*, 2002).

Biorreceptividad- propensión de un sustrato a ser colonizado por microorganismos. Algunos autores prefieren incluir el humor en su trabajo y hablan de *biodyction*, “bioadicción” (Krumbein, 2003).

Hidrofobicidad- propiedad de repeler el agua, tendencia a no absorberla. Se relaciona con la polaridad de los compuestos, entre otros factores. Esta característica es definitoria en los procesos iniciales de colonización.

El desarrollo de la colonización por parte de los organismos da lugar a una serie de alteraciones cuya aparición está determinada por factores de distinta naturaleza: clima y condiciones ambientales, nivel de contaminación atmosférica, composición química del sustrato, etc. Pese a que, en ocasiones, la colonización puede resultar protectora para el sustrato (Krumbein, 2003; May, 2003), la mayoría de sus efectos y consecuencias son muy perjudiciales para la integridad de la obra que los sufre. Estos fenómenos raramente se dan aislados en la práctica, y sus efectos están interrelacionados. Aquí se recogen los más significativos; su agrupación en categorías diferenciadas tiene fines puramente expositivos.

ALTERACIONES CROMÁTICAS

Pátina- es uno de los términos que lleva consigo una polémica mayor y más antigua. La primera vez que aparece mencionado en una fuente literaria es en los escritos de M. Boschini, del año 1660; más tarde F. Baldinucci lo incluye en su Diccionario del Arte, de 1681 (en Krumbein, 2003); desde entonces, la delimitación de su significado ha suscitado discusiones. En la actualidad, la comunidad científica ha acordado denominar pátina al “conjunto de cambios superficiales de una obra de arte, dados por intercambios de materia y energía con el medio circundante” (Dornieden *et al.*, 2000).

Biopátina- designa las formaciones de microorganismos sobre un sustrato, normalmente pigmentadas de diferente color que el sustrato

original (figs. 0.2a y b). Así, sus efectos van más allá de las alteraciones exclusivamente cromáticas, incluyendo fenómenos físico-químicos. Las pátinas biológicas pueden adoptar diversas estructuras: pústulas, películas, tapetes y costras estromatolíticas (Sánchez Castillo y Bolívar Galiano, 1997).

-**pústulas**- formaciones iniciales, de aspecto verrucoso.

-**películas**- también llamadas *biofilms*, son capas de células, junto con sus productos de excreción, que habitan sobre una superficie o sustrato (Ortega Calvo *et al.*, 1993; Dornieden *et al.*, 2000).

-**tapetes**- formaciones gruesas generadas por especies filamentosas (fig. 0.3).

-**costras estromatolíticas** o microestromatolitos- estructuras mixtas de algas y materia inorgánica cristalina, que suelen presentar varios estratos diferenciados.

Fouling- formación de una capa de material extraño sobre una estructura de factura humana, con consecuencias negativas para esta (Müller-Steinhagen *et al.*, 2000).

Biofouling- desarrollo y efecto de un *biofilm* sobre un objeto realizado por el Hombre, con consecuencias negativas para él (Ortega Calvo *et al.*, 1993; Boonaert *et al.*, 2002). Existe el calco español “bioensuciamiento”, pero raramente se encuentra en la bibliografía (un ejemplo, Sarrò *et al.*, 2004).

Biocorrosión- procesos de alteración química del sustrato por acción de metabolitos o por transferencia de iones (*biotransfer*). En el caso de la piedra, puede traducirse en cambios cromáticos en los metales presentes en la roca (fig. 0.4).

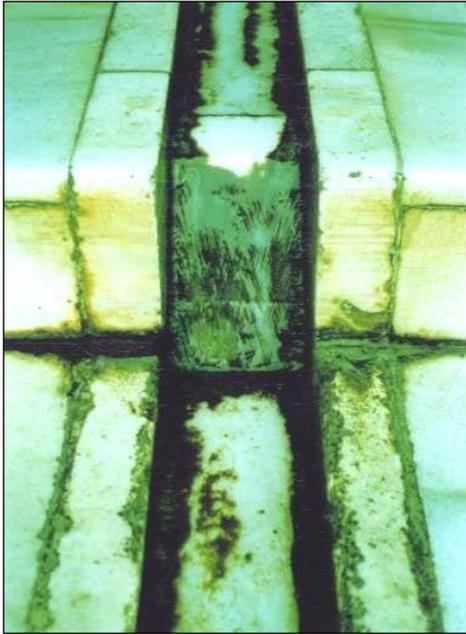


Fig. 0.2a y b- Biopátina en un arcaduz (izquierda) y una fuente (derecha) de los Palacios de la Alhambra.

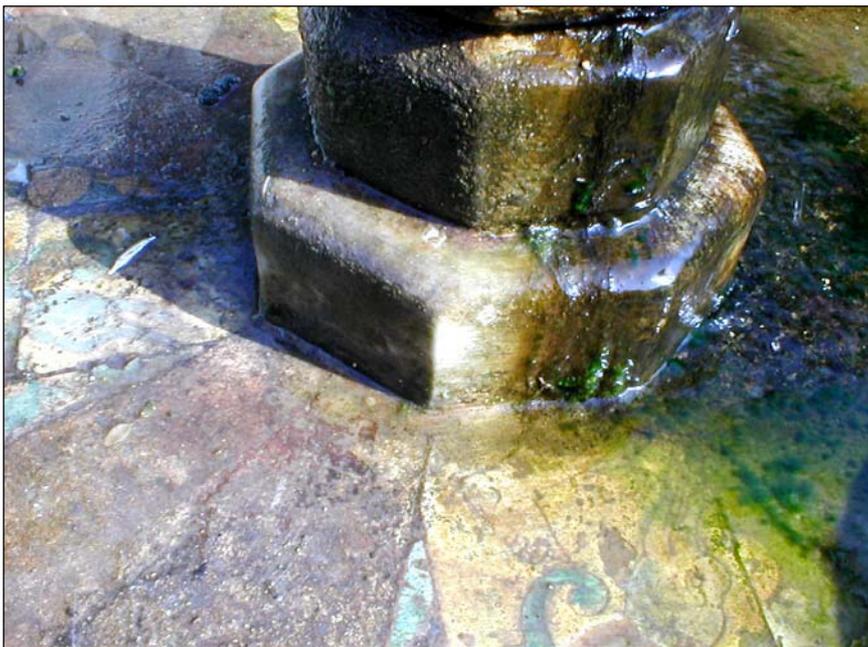


Fig. 0.3- Tapete de algas en una fuente del Alcázar de Sevilla.

ALTERACIONES POR ACUMULACIÓN DE MATERIA

Biomineralización- precipitación de materia mineral inducida por microorganismos; se relaciona con el último estadio de pátina biológica: las costras estromatolíticas. La biomineralización puede dar lugar a la formación de distintos productos (Bolívar y Sánchez-Castillo, 1997):

-**acrecciones**- costras sumergidas, se desarrollan extensamente y se amoldan a la superficie del sustrato (fig. 0.5).

-**concreciones**- costras puntuales fuertemente adheridas al sustrato.

-**incrustaciones**- costras embutidas en el sustrato.

Carbonatación- proceso de deterioro químico por el cual un mineral compuesto de calcio, magnesio, potasio, sodio y/o hierro se transforma, por reacción con dióxido de carbono, en carbonatos o bicarbonatos de esos metales, mucho más solubles que los compuestos originales y por tanto más susceptibles de sufrir daños. La presencia de microorganismos potencia el proceso, ya que todos los seres vivos excretan dióxido de carbono como metabolito (Sand, 1997) (no confundir con carbonatización, proceso mediante el que se forman compuestos sólidos a partir de materia orgánica).

Eflorescencia- cristalización superficial de sales que se encontraban disueltas en el interior de la roca. La presencia de colonias de microorganismos favorece la penetración de sales, y, por tanto, eventuales eflorescencias.



Fig. 0.4- Mármol manchado de una fuente de la Alhambra (Granada).



Fig. 0.5- Acreciones en un aljibe, Siena (Toscana).

EPS- siglas inglesas que se refieren a las sustancias poliméricas extracelulares generadas por microorganismos. Estas sustancias configuran una compleja matriz que protege y garantiza nutrientes a las células de los propios microorganismos. Su papel es crucial en la formación de *biofilms*. Las EPS también son determinantes en el desarrollo de costras negras (*black crusts*), ya que su carácter “pegajoso” propicia la adhesión de partículas extrañas de polución y polvo (fig. 0.6).



Fig. 0.6- Biofilm algal ennegrecido, en la fuente de la fachada del Perdón de la Catedral de Granada.

Soiling- se denomina así al deterioro funcional de una obra (Ortega Clavo *et al.*, 1993). En el caso de una fuente, puede estar causado por obturación de los surtidores debida a una acumulación de carbonatos o a un excesivo desarrollo de las comunidades algales.

ALTERACIONES POR PÉRDIDA DE MATERIA

Desintegración- pérdida de cohesión en el nivel superficial de la piedra. Puede deberse a la acción de los ácidos orgánicos excretados por los microorganismos.

Disgregación o desagregación- pérdida de cohesión interna causada por acciones mecánicas.

Exfoliación o descamación- separación de escamas pétreas provocada por la acción física de los organismos. En función del tamaño de las escamas, se habla de separación de “películas”, de “escamas” propiamente dichas, o de “placas”.

Gelifracción- ruptura y separación de fragmentos por causa de las tensiones provocadas por el aumento y disminución de volumen del agua en los ciclos de hielo y deshielo. La presencia de organismos endolíticos favorece la gelifracción, ya que llevan la humedad al interior de la roca.

Leaching- en español existe el término equivalente “lixiviación”, pero en ciertos ámbitos está más extendido el uso del término inglés. Significa la disolución y remoción de un material sólido mediante procesos químicos. En biodeterioro se relaciona con los productos metabólicos de los microorganismos, especialmente de bacterias heterótrofas.

Pitting- degradación puntiforme caracterizada por la formación de múltiples agujeros ciegos, cercanos entre sí y generalmente con forma cilíndrica. A veces aparece traducido al español como “punteado” o “picado”. Cuando el tamaño de los agujeros supera los pocos milímetros se habla de *cratering* (Caneva *et al.*, 1992).

Biopitting- pitting provocado por la acción físico-química de microorganismos. La frontera entre *pitting* y *biopitting* no está definida, puesto que los fenómenos aparecen normalmente relacionados.

El biodeterioro de una obra de arte, entonces, es el efecto de los cambios provocados por la acción de organismos y que tienen consecuencias negativas para la integridad de la obra. Los procesos de biodeterioro comienzan desde el momento en que la obra se concluye; esto es inevitable en condiciones normales. Para combatirlo o evitarlo se puede recurrir a:

Biocontrol- control del crecimiento de agentes causantes de biodeterioro.

Biocidas- productos de acción tóxica contra determinados organismos. El término sustituye a “pesticida”, cuya etimología indica que hace referencia a la eliminación de organismos infecciosos o “peste”. Ante la subjetividad de este concepto se ha optado por emplear la palabra “biocida”, cuyo significado es más objetivo y preciso (Caneva *et al.*, 1994).

ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Desde la Antigüedad se ha hecho referencia a los fenómenos relacionados con el biodeterioro, en la medida en que afectaban más o menos gravemente a monumentos y obras de arte (Ortega Calvo *et al.*, 1993). Ya en la Biblia aparece el concepto de deterioro biogénico (Levítico, 14: 37-41), y personajes clásicos como Herodoto o Leonardo da Vinci mencionan en sus escritos estos problemas (en Bolívar Galiano, 1994). Con el avance de la ciencia, los conocimientos relativos a este tema fueron haciéndose más precisos. Sin embargo, el estudio del biodeterioro de obras de arte no se hace sistemático hasta fechas muy recientes: es sólo a partir de la década de 1950 cuando comienza a profundizarse en este campo (Keller y Frederickson, 1952; Webley *et al.*, 1963; Fusey e Hyvert, 1964 y 1966; Hueck-van der Plas, 1965 y 1968; Pochon y Jatón, 1967; Ionita, 1971; Winkler, 1975). El número creciente de estudios publicados desde entonces demuestra el interés que viene suscitado el tema en los últimos años (Strzelczyk, 1981; Ciarallo *et al.*, 1985; Koestler *et al.*, 1985; Giacobini *et al.*, 1986; Tiano, 1986, 1987; Caneva y Altieri, 1988; Caneva y Salvadori, 1988; Griffin *et al.*, 1991; Warscheid *et al.*, 1992; Jain *et al.*, 1993; May *et al.*, 1993; Caneva *et al.*, 1994; Mishra *et al.*, 1995; Saiz-Jiménez, 1999; Zanardini *et al.* 2000).

Más recientemente se están publicando trabajos muy especializados, que tratan con más precisión el biodeterioro de monumentos pétreos por microorganismos. La producción es muy numerosa; entre los muchos estudios que componen esta abundante literatura, cabría citar, por ejemplo, los trabajos de Monte Sila y Tarantino (1981), Bock *et al.* (1987), Krumbein y Urzi (1993), Groth y Saiz-Jimenez (1999), Petushkova y Kandyba (1999), Urzi y de Leo (2001), Urzi *et al.* (2001-a) y Gorbushina *et al.* (2002), sobre biodeterioro de monumentos por bacterias; los de Ascaso *et al.* (1982, 1998), Ciarallo *et al.* (1985), del Monte *et al.* (1987), Gehrmann *et al.* (1989), García Rowe y Saiz Jiménez (1991) y Wendler y Prasartset (1999) sobre la acción de los líquenes; los de Giacobini *et al.* (1987), Leznicka *et al.* (1988), de la Torre *et al.* (1991),

Urzi y Krumbein (1994), Wollenien *et al.* (1995), Urzi *et al.* (2001-b) y Burford *et al.* (2003) sobre el biodeterioro por hongos y actinomicetos. La aparición de estudios específicos sobre la acción de las microalgas en monumentos ha ido paralela a la de estos trabajos citados, aunque ha tenido menor desarrollo. Entre las primeras investigaciones publicadas, cabe destacar los trabajos de Giaccone *et al.* (1976), Richardson (1976), Frediani *et al.* (1978), Giacobini *et al.* (1979), Tomaselli *et al.* (1979), Danin (1983), Tiano (1986, 1987) y Atlas *et al.* (1988).

Por otra parte, el interés por controlar y prevenir la colonización microbiana sobre sustratos de factura humana es también origen de multitud de estudios e investigaciones. En los últimos años se vienen desarrollando distintas técnicas con este propósito, habiéndose extendido con mayor amplitud el empleo de diversos biocidas, permeabilizadores e inhibidores de procesos metabólicos (Alakomi *et al.*, 2004). El estudio del biodeterioro aplicado a estos productos está siendo objeto de numerosos estudios (Koestler y Santoro, 1988; Takamura *et al.*, 1989 y 1990; May *et al.*, 1993; Bolívar y Sánchez Castillo, 1996; Koestler, 2000), y se puede decir que, en general, los resultados obtenidos no son enteramente satisfactorios (Krumbein *et al.*, 1993, Tiano *et al.*, 1993; May, 2003). La causa principal del fracaso de biocidas y permeabilizadores es que la formación de biofilms dificulta la penetración, y por tanto la efectividad, de estos productos (Morton *et al.*, 1998). Por este motivo, algunos autores sugieren que la mejor manera de garantizar la prevención del deterioro biológico (además del originado por factores físicos o químicos) es el control de las condiciones ambientales en que se encuentran las obras de arte (Cappitelli *et al.*, 2004).

La protección de fuentes ornamentales requiere un enfoque particular de la cuestión, ya que las condiciones ambientales a que están sujetas son difíciles de modificar, y son especialmente favorables al desarrollo de microorganismos fotosintéticos (Sánchez-Castillo y Bolívar, 1997). Además, el uso de sustancias químicas biocidas o similares podría alterar el ecosistema que genera una fuente, por lo que recurrir a ellas resulta poco recomendable. Es por esto que se ha propuesto el empleo de materiales sintéticos, diseñados a propósito, para actuaciones de reintegración y para la fabricación de réplicas de piezas de importancia

singular con el fin de emplazar los originales en ambientes controlables, tal y como se viene haciendo para intervenir en obras escultóricas, (Weber y Zinsmeister, 1991; Roig Salom, 1995).

MATERIALES DE INTERVENCIÓN PROPUESTOS

El uso de materiales sintéticos en intervenciones de restauración y consolidación de monumentos pétreos está muy extendido desde hace décadas (Amoroso y Fascina, 1983; Domasłowski y Strezelczyk, 1986; Selwitz, 1992), aunque paulatinamente se está cuestionando más la adecuación de estos materiales a ese fin, debido a que su envejecimiento influye muy negativamente en sus características originales (Raynal, 1999), y su resistencia al biodeterioro no es siempre la deseable (Salvadori y Nugari, 1988; Leznicka *et al.*, 1991; Koestler, 2000). Las distintas instituciones nacionales e internacionales que regulan y orientan en asuntos de conservación y restauración desaconsejan su empleo en la medida de lo posible, recomendándolo tan sólo en casos muy concretos (Martínez Justicia, 1990). Con todo, la investigación en este campo continúa, diseñándose nuevos materiales mejorados (Melo *et al.*, 1999; Cardiano, 2003; Mazzola *et al.*, 2003).

El problema que se plantea aquí, sin embargo, conduce a otros planteamientos, ya que lo que se propone es el empleo de estos materiales para elaborar réplicas y partes faltantes, no como consolidantes estructurales. Los resultados obtenidos en estudios relacionados con el empleo de materiales sintéticos en ambientes acuosos (Peraza-Zurita *et al.*, 2004), exige una profundización del problema del biodeterioro desde una perspectiva físico-química. Esta aproximación debe enfocarse, concretamente, al estudio de los fenómenos de adhesión de las microalgas. En los fenómenos de adhesión influyen factores como la composición química de las partes implicadas, el peso atómico del material que compone el sustrato al que se adhieren los microorganismos, la naturaleza de sus enlaces moleculares (Gu, 2003), sus propiedades eléctricas (Boonaert *et al.*, 2002) o su rugosidad (aunque algunos autores le restan importancia, como Bos *et al.*, 1999).

INTERACCIONES ENTRE MICROALGAS Y SUSTRATO

Los procesos de adhesión pueden describirse en términos de fuerzas de interacción de diferente naturaleza, a saber, de Lifshitz - van der Waals, electrostáticas y de interacciones ácido-base. Todas estas fuerzas están presentes a la vez, en mayor o menor medida, y condicionan las distintas fases del proceso (Boonaert *et al.*, 2002). Su presencia cobra importancia cuando la distancia entre el sustrato y el cuerpo (en este caso, las células de las microalgas) es inferior al tamaño del propio cuerpo. Por tanto, cuando se aproxima el momento de toma de contacto entre dos superficies, las fuerzas macroscópicas generales dejan de ser protagonistas y las microscópicas pasan a serlo.

Para estudiar los fenómenos implicados en la adhesión la comunidad científica ha adoptado dos acercamientos teóricos diferentes: una visión termodinámica, derivada principalmente de los planteamientos de Thomas Young, y una visión basada en la intervención de fuerzas de Lifshitz - van der Waals y electrostáticas, llamada aproximación DLVO por los científicos que la formularon: Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek (Strevett y Chen, 2003). Ambas visiones han resultado válidas para explicar ciertos aspectos del problema, aunque ninguna ofrece la posibilidad de describir la cuestión de forma global (Bos *et al.*, 1999).

A partir de estos planteamientos teóricos se han desarrollado una serie de métodos de análisis. Entre los más comúnmente empleados para el estudio físico-químico de superficies se encuentran los siguientes: espectroscopia infrarroja, espectroscopia fotoeléctrica de rayos X (XPS), estudio de movilidad electroforética, microscopía electrónica, distintos métodos cromatográficos, adhesión a materiales inertes (método de Wilhelmy), adhesión microbiana a hidrocarburos (MATH), y medida de ángulos de contacto (Busscher, 1985; Speranza *et al.*, 2004). En los últimos años se está extendiendo también el estudio de la adhesión por microscopía de fuerza atómica (Bowen *et al.*, 1999; Boonaert *et al.*, 2000, 2001; Dufrêne *et al.*, 2001). Cada uno de estos métodos proporciona una información parcial del conjunto de fenómenos implicados en la adhesión, y cada uno presenta inconvenientes y ventajas sobre los demás (Pembrey *et al.*, 1999).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En todos los casos, las intervenciones relacionadas con la salvaguardia de obras de arte exige, por su complejidad y delicadeza, un enfoque multidisciplinar. Para afrontar una intervención de restauración será preciso, por tanto, realizar estudios pertenecientes a campos muy diversos, que abarcan desde los propiamente artísticos hasta los relacionados con las ciencias experimentales, con el fin de conocer y describir no sólo la obra a tratar, sino también la intervención a realizar y los materiales a emplear.

Al afrontar una intervención de conservación o restauración de una obra de las características de una fuente monumental, expuesta a los factores medioambientales, es esencial enfocar la cuestión desde el punto de vista del biodeterioro, lo que requiere un estudio biológico. Conocer las características de los microorganismos implicados, y los procesos que se suceden en su desarrollo, es primordial. En la primera parte de esta investigación se analizaron las comunidades de microalgas presentes en los monumentos estudiados, y se investigaron los fenómenos de biodeterioro provocados por ellas, prestando especial atención a los productos biogénicos relacionados con su presencia, ya que son ellos los que prolongan y acentúan los efectos dañinos de las microalgas sobre el sustrato.

Con el objetivo de frenar o disminuir el efecto de las microalgas en monumentos como los aquí considerados, se han realizado recientemente una serie de estudios para conocer la efectividad de productos biocidas (Bolívar y Sánchez-Castillo, 1995; Sánchez-Castillo y Bolívar, 1997). Los resultados obtenidos demuestran que, debido a las condiciones inherentes a estos monumentos, los problemas existentes son de muy difícil solución. Esto conduce, como se dijo anteriormente, a plantear la conveniente posibilidad de sustituir los elementos pétreos originales, cuando se encontraran en avanzado estado de deterioro, por réplicas. De esta forma los originales dañados podrían conservarse adecuadamente en un espacio con condiciones ambientales controladas, como por ejemplo un museo. El

empleo de materiales artificiales para la realización de estas réplicas, así como para su uso en intervenciones de reintegración, supondría una ventaja, en el sentido de que éstos son más fácilmente manejables y de menor coste económico. Además, introduciendo pequeñas variaciones en su composición, se puede ampliar enormemente el campo de aplicación: desde réplicas de bienes móviles, por ejemplo material arqueológico, hasta intervenciones arquitectónicas de gran envergadura.

En la segunda parte de este trabajo se investigaron distintos materiales, con el fin de caracterizar aquel cuya resistencia al deterioro fuera mayor. Los materiales se escogieron en función de los presentes en los monumentos en que se centró el estudio, y sus cualidades se confrontaron a las de aquellos. Se diseñaron y realizaron experimentos con probetas hechas de morteros artificiales, constituidos por resinas sintéticas y polvo de piedra natural, sometiéndolas a una serie de pruebas, con el fin de establecer sus respuestas ante los distintos factores de alteración.

Aunque los morteros estudiados mostraron excelentes propiedades físico-químicas con respecto a las de los materiales constituyentes originales, en términos de biodeterioro la respuesta obtenida distó mucho de ser satisfactoria. Esto llevó a plantear una tercera parte de la investigación, en la que se analizan en profundidad los factores que intervienen en la adhesión y el desarrollo de las comunidades microalgales en las distintas superficies. El conocer el proceso de colonización de estos microorganismos sobre los sustratos monumentales representa, así, el punto de partida para una posible revisión de los objetivos iniciales de este trabajo.

Por todo ello, los objetivos concretos que se plantearon en este trabajo fueron:

Parte I: Biodeterioro y formas de alteración relacionadas.

- Caracterizar los géneros de microalgas identificadas en los distintos análisis.

- Definir las características propias de los géneros localizados: comunidades que forman, biotipos.
 - Describir los procesos fisiológicos básicos de estos organismos.
- Caracterizar las principales formas de alteración relacionadas a la presencia de microalgas (costras minerales biogénicas).
- Realizar estudio descriptivo, complementado con microscopía y microfotografía.
 - Realizar estudio colorimétrico.
 - Realizar estudio mineralógico.

Parte II: Material de intervención propuesto.

- Elaborar morteros artificiales para su utilización en reposiciones y réplicas de fuentes monumentales.
- Caracterizar los materiales pétreos naturales propuestos para la elaboración de los morteros.
 - Caracterizar los morteros artificiales.
 - Realizar, a partir de los morteros diseñados, probetas sobre las cuales efectuar los ensayos pertinentes.
- Determinar el comportamiento de los morteros elaborados frente a los factores de deterioro presentes y posibles en las obras estudiadas.
- Conocer la resistencia de los morteros frente a los agentes de deterioro físicos y químicos habituales en monumentos, reproducidos en laboratorio.
 - Conocer la respuesta de los morteros a condiciones de degradación física y química extremas.
 - Conocer su susceptibilidad a agentes biológicos.

**Parte III: Interacciones entre microalgas y materiales pétreos:
estudio de superficies.**

- Estudiar las propiedades de superficie de los morteros creados.
 - Elaborar nuevas probetas, variando la proporción de los componentes para obtener distintas texturas.
 - Medir la tensión superficial en las probetas de los diferentes materiales, tanto naturales como artificiales.

- Estudiar las propiedades de las microalgas implicadas.
 - Obtener cultivos monoalgales de las especies algales más representativas.
 - Medir la tensión superficial de dichas especies.

- Determinar los factores que influyen en la adhesión y colonización de microalgas sobre los sustratos pétreos.

PARTE I

DESCRIPCIÓN Y FORMAS DE ALTERACIÓN RELACIONADAS

I.1 MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL ARTÍSTICO

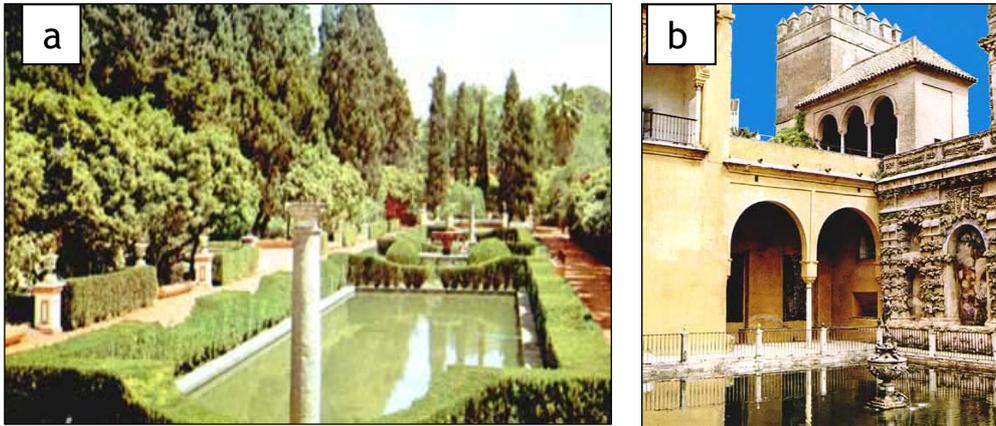
En este trabajo se han estudiado los fenómenos de biodeterioro por microalgas en varias fuentes de estilo hispanomusulmán de las ciudades de Granada y Sevilla. En Granada se estudiaron en primer lugar, entre los años 2000-2002, las fuentes del complejo histórico-artístico de la Alhambra (fig. 1.1.1), y más adelante (2002-2004) la fuente de Bibatauín (fig. 1.1.2), situada en la céntrica plaza del mismo nombre; en Sevilla, por otra parte, se trataron las fuentes de los Reales Alcázares (figs. 1.1.3a y b), simultáneamente a las de la Alhambra.



Fig. 1.1.1- Vista general de La Alhambra desde el Albaicín.

Fig. 1.1.2- Fuente de Bibatauín.





Figs. 1.1.3a y b- Dos rincones del extenso recinto de los Reales Alcázares de Sevilla.

La elección de estas fuentes responde a varios motivos. En primer lugar, el hecho de que tanto la Alhambra y el Generalife como los Reales Alcázares sean recintos monumentales de notable importancia, los convierte en objetivos de gran interés. Las fuentes de ambos recintos están relacionadas estilísticamente, al igual que la de Bibatauín, pero fueron construidas en diferentes momentos históricos y han sufrido tratamientos distintos, lo que permite hacer una comparación del grado de deterioro en función del tiempo y de la historia en cada caso. Además, los materiales de construcción de estas fuentes son muy parecidos desde el punto de vista mineralógico, lo que permite contrastar las diferentes manifestaciones del deterioro según el clima y las condiciones ambientales.

Las fuentes que han sido objeto de este estudio datan, como se dijo, de épocas muy distintas. En la Alhambra y el Generalife, la mayoría pertenecen a los siglos XIII y XIV, en que reinaba la dinastía Nazarí. La gran prosperidad que vivió la ciudad en estos siglos quedó plasmada en la riqueza de las últimas intervenciones arquitectónicas que los musulmanes realizaran en la Alhambra. En cuanto a los Alcázares de Sevilla, su evolución histórica fue más irregular que la de la Alhambra. Este hecho, unido a que hasta hace muy poco el recinto se empleó como residencia de

monarcas y gobernantes, hace que los distintos elementos que pueden encontrarse sean muy heterogéneos (Marín Fidalgo, 1992; Lobato Domínguez y Martín Esteban, 1999). La edad de las fuentes consideradas va de los siglos XIV y XV hasta el XIX y XX (fig. 1.1.4).



Fig. 1.1.4- Fuente de realización moderna en los Reales Alcázares.

La fuente de Bibatauín, por último, es de principios del s. XX, aunque su estilo, a grandes rasgos, se asemeja al de las anteriores.

Las fuentes islámicas de la Alhambra de Granada y de los Reales Alcázares de Sevilla han sido, desde tiempos remotos, objeto de numerosas catalogaciones y análisis de tipo estilístico. Entre los estudios más significativos cabe mencionar los de Seco de Lucena (1919), Martín Fidalgo (1992), Gómez Moreno (1994), Lobato Domínguez y Martín Esteban (1999), Caro Yusta (2001), y, especialmente, Bermúdez Pareja (1972-77), Grabar (1986), González Ramírez (1995) y Gallego y Burín (1996).

La clasificación de las fuentes de la Alhambra hecha por Bermúdez Pareja sigue siendo una referencia en la actualidad; pese a la localización geográficamente limitada de su trabajo, sus criterios de catalogación se pueden considerar perfectamente aplicables a la mayoría de las fuentes de inspiración islámica (Bolívar Galiano, 1994), y por tanto también a las fuentes del Alcázar de Sevilla.

Todas estas fuentes responden al mismo esquema estilístico que rige el diseño de este tipo de obras en otros ejemplos del arte islámico, esencialmente distinto del europeo: la mayoría de ellas son piezas bajas, colocadas a ras del suelo o incluso por debajo de su nivel, formando láminas de agua calma (fig. 1.1.5). En algunos casos encontramos fuentes levantadas (célebre es el ejemplo de la fuente del Patio de los Leones), pero también en ellas es patente la diferencia que las distingue de las fuentes propias de la llamada cultura occidental: el efecto de serenidad y quietud que ofrecen las primeras es casi opuesto al que proporcionan las últimas, donde el agua es móvil, inquieta, sonora.

En cuanto a la fuente de Bibatauín, su realización data de la década de 1930 (Gallego y Burín, 1996), lo que la aleja cronológicamente de la mayoría de las otras fuentes estudiadas. No obstante, fue diseñada bajo la influencia del eclecticismo propio de aquellos años, por lo que en términos estilísticos sí tiene vínculos con las fuentes más antiguas de la Alhambra y los Reales Alcázares. Sin embargo, aunque conserve las líneas esenciales de la forma hispanomusulmana, no conserva la quietud y la calma de las fuentes de ese período, sino que supone una fusión de estilos entre aquel y el europeo.

Esta fusión es también perceptible en algunas fuentes de la Alhambra, cuya turbulenta historia ha conducido en más de una ocasión a su modificación o traslado parcial (Gallego y Burín, 1996). Tanto en ese recinto como en los Alcázares sevillanos, las fuentes exentas (es decir, las que no están integradas en la arquitectura y pueden por ello cambiarse de lugar) han sufrido todo tipo de transformaciones y recolocaciones en nuevos emplazamientos, con las consiguientes alteraciones que eso conlleva. Las que se encuentran formando parte de la arquitectura, aunque están situadas en sus lugares originales, a menudo se han visto modificadas, se les han añadido nuevos elementos, o han sido recubiertas por nuevas estructuras (fig. 1.1.6).



Fig. 1.1.5- Fuente esquemática de los Palacios de la Alhambra.



Fig. 1.1.6- Fuente gallonada de factura antigua, alzada sobre una base moderna, en los Reales Alcázares.

Mientras que los documentos sobre estos recintos monumentales son abundantes, la fuente de Bibatauín ha pasado prácticamente desapercibida para muchos autores, de forma que la información referente a su historia es relativamente escasa (Gallego y Burín, 1996).

Exponer en detalle las variaciones sufridas a lo largo de la historia por las fuentes aquí estudiadas ocuparía de por sí todo el espacio de este trabajo. Además, este aspecto de su estado de conservación no se encuentra directamente relacionado con las cuestiones que se plantean en el presente estudio. En efecto, la acción de los agentes de biodeterioro, y los daños que provocan con ella, no responden al emplazamiento ni al estilo de las obras. Por tanto, en este estudio no se considerarán los factores relacionados con las intervenciones del Hombre.

Por cuanto se refiere a los materiales de construcción, la mayoría de las fuentes de la Alhambra y los Reales Alcázares, a excepción de los ejemplares más modernos, están realizadas en mármol, ya se trate de fuentes de la época musulmana o cristiana.

En las fuentes de la Alhambra el mármol empleado proviene, principalmente, de las canteras de Macael, en la provincia de Almería. Es de la variedad denominada “blanco de Macael”, también conocido como “blanco de la Atalaya” y “de las Casas”; es un tipo de roca muy frecuente en los monumentos de esa ciudad (Zezza y Sebastián Pardo, 1992).

El mármol que se encuentra con más abundancia en las fuentes sevillanas, en cambio, es originario de Italia (no se deben olvidar las importantes reestructuraciones de los jardines que obrara el maestro Resta en época manierista). En este estudio se centrará la atención en la variedad de mármol blanco de Carrara, por ser el más representativo de los presentes, y una de las rocas más empleadas en la realización de obras de arte pétreas en el ámbito del Mediterráneo occidental.

Los tipos de mármoles constituyentes de estos monumentos son, por sus características mecánicas y estéticas, variedades muy apreciadas por arquitectos y artistas de todos los tiempos, y su uso en este sentido se encuentra extendido a un sinnúmero de monumentos. Desde el punto de vista geológico, son materiales que presentan unas características muy

similares: ambos son pétreos metamórficos, compuestos mayoritariamente por calcita; la diferencia más apreciable entre ellos es la dimensión original de sus cristales, mayor en el mármol de Macael.

Por su parte, la fuente de Bibatauín, al igual que las fuentes de factura más reciente del recinto de la Alhambra, está realizada en piedra de Sierra Elvira, una caliza muy apreciada y de uso muy extendido en Granada. Aunque su calidad (y su precio) es menor que la del mármol, sus características morfológicas son parecidas, así como sus cualidades.

ESTADO DE CONSERVACIÓN

En todos los casos, el estado de conservación que muestran las fuentes consideradas no es, en líneas generales, el deseable. Las rocas constitutivas de las distintas obras sufren alteraciones de tipo físico, químico y estético, en su mayoría por desconocimiento de las causas profundas de su deterioro y como consecuencia de una política de conservación inadecuada.

Teniendo en cuenta sólo los aspectos no humanos de la cuestión, hay que señalar varios elementos que contribuyen al deterioro de estos monumentos. Por ejemplo, la exposición a la luz solar durante el día, con el inherente aumento de temperatura, y el cambio brusco al frío de la noche, ocasionan daños debidos a las continuas dilataciones y contracciones que sufre la piedra, llegándose a veces, en combinación con el agua, a la rotura por heladas o gelifracción. También el efecto del agua afecta enormemente por erosión directa las superficies, penetrando por los poros y favoreciendo el desarrollo de microorganismos.

Las alteraciones más destacadas de este tipo de obras vienen dadas por la presencia de varias tipologías de pátinas biológicas, que afectan tanto a aspectos estéticos como estructurales. Estas pátinas cubren la superficie mojada y húmeda de las fuentes, impidiendo su correcta lectura y disfrute, y a veces incluso su correcto funcionamiento (deterioro funcional o soiling, Ortega Clavo et al., 1993). Pueden dar lugar a la formación de costras carbonatadas (Golubic, 1969, 1973, 1987), que llegan a constituir incrustaciones, concreciones y acreciones (Bolívar Galiano, 1994). Estas costras pueden llegar a ser muy perjudiciales para la roca

(Krumbein, 1991; Brüggerhof et al., 1999). En el caso de las fuentes estudiadas, el fenómeno representa la causa más importante de deterioro (Bolívar Galiano, 1994). Los organismos relacionados con pátinas son, principalmente, microalgas (fig. 1.1.7).

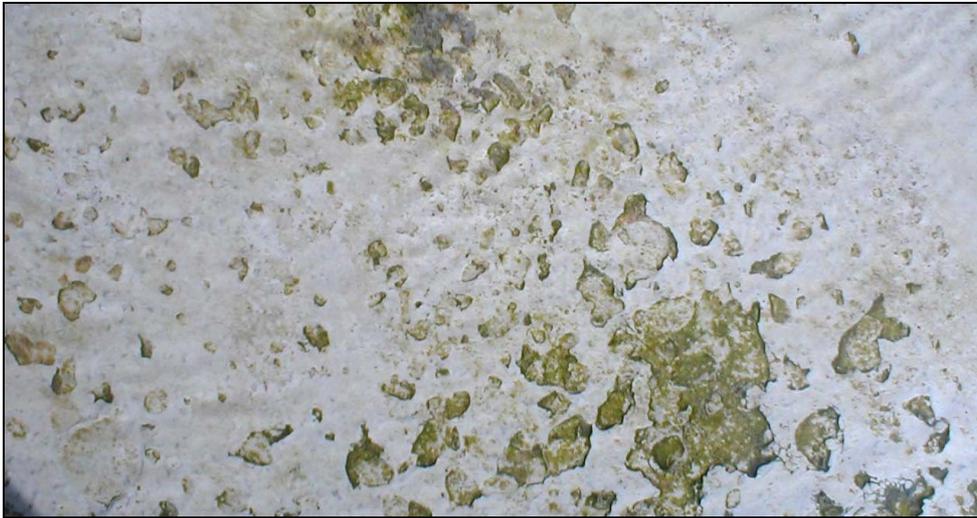


Fig. 1.1.7- Efectos del biodeterioro por microalgas en la base de la fuente guitarra de los jardines bajos del Partal, en la Alhambra.

MATERIAL BIOLÓGICO

MICROALGAS: TERMINOLOGÍA Y CONCEPTOS BÁSICOS

Los organismos que hoy están englobados dentro de la denominación de algas, en un principio eran considerados como plantas, puesto que todos realizan la fotosíntesis, aunque carecen de hojas, tallo, raíces y órganos reproductores desarrollados. Estudios más avanzados permitieron establecer similitudes entre sus características y las de algunos animales. Posteriormente, se decidió inaugurar una categoría para ellas exclusivamente. En la actualidad conviven varios sistemas o clasificaciones de los seres vivos, que siguen criterios distintos, aunque el más extendido y aceptado es el sistema de Margullis (Van den Hoek et al., 1995). Esta clasificación separa a los seres vivos en cinco reinos diferenciados:

- Reino **Monera** - Eubacterias + Archeobacterias
- Reino **Protocista** - Algas eucarióticas + Protozoos + algunos Hongos
- Reino **Fungi** - Hongos
- Reino **Animalia** - Animales multicelulares
- Reino **Plantae** - Musgos, plantas hepáticas y plantas vasculares

Con todo, el asunto sigue suscitando polémica, debido a que los organismos que se consideran algas pueden llegar a ser muy distintos entre sí, en términos formales, fisiológicos o filogenéticos.

El hecho que genera más confusión a la hora de establecer una clasificación válida es que las células de las algas pueden ser, según su estructura interna, de dos tipos: procariotas y eucariotas. En las células **procariotas** el núcleo no está diferenciado del resto de los orgánulos, mientras que en las **eucariotas** una membrana mantiene sus elementos agrupados. Son algas de células procariotas las cianofíceas y las proclorofíceas. Todas las demás son de células eucariotas.

La mayoría de las algas de agua dulce son microscópicas, salvo algunas excepciones, como las carofíceas, que pueden alcanzar hasta 20

cm de tamaño. Hay algas unicelulares y pluricelulares. Las **unicelulares** suelen encontrarse agrupadas formando masas irregulares y amorfas; las **pluricelulares**, en cambio, se agrupan de forma organizada, constituyendo estructuras parenquimáticas o pseudo-parenquimáticas (a modo de paquetes) de un cierto número de individuos, o filamentos, ramificados o no, de una o más series de células. Estas estructuras pluricelulares pueden, a su vez, encontrarse aisladas o agrupadas. En función del tipo de comunidad que generen las algas, Sánchez Castillo y Bolívar Galiano (1997) distinguen seis biotipos diferentes: I- algas unicelulares aisladas, II- agregados gelatinosos, grupos de algas envueltas en productos metabólicos, como polisacáridos y proteínas, III- agregados no gelatinosos, IV- estructuras pseudo-parenquimáticas, algas agrupadas en estructuras más o menos definidas, V- filamentos sin vaina, y VI- filamentos con vaina.

La **reproducción** de las algas se puede desarrollar de manera tanto sexual como asexual, dependiendo del tipo de organismo de que se trate y de las condiciones ambientales en que viva. La reproducción asexual implica la segregación de una parte del individuo, bien por mecanismos inespecíficos (fragmentación), bien mediante estructuras más especializadas (esporangios). La reproducción sexual es un mecanismo más complejo, que implica un proceso de formación de gametos y el desarrollo de cigotos; por lo general tiene lugar bajo condiciones ambientales desfavorables.

En función del **ambiente** en que vivan, se distinguen algas terrestres y acuáticas:

-**Terrestres**: sólo unos pocos tipos de algas, como las chlorococcales y ciertas clorofitas, se desarrollan en ambientes terrestres. Algunas son en realidad algas de agua dulce, y viven gracias a la humedad del suelo. Otras han evolucionado y se han adaptado a medios rocosos. Según la zona de la roca en que vivan, se denominan, en la nomenclatura de Friedmann y Gallum (en Lee, 1989):

-Algas epilíticas, cuando viven sobre la roca, en su parte externa.

- Algas sublíticas, cuando viven en la superficie interna, en contacto con el suelo, de rocas translúcidas.
- Algas endolíticas, cuando viven dentro de la roca. Dentro de este grupo se distinguen:
 - Algas casmoendolíticas, cuando se desarrollan en fisuras y grietas del sustrato.
 - Algas criptoendolíticas, cuando viven en cavidades estructurales y poros internos.

Otros autores diferencian además un quinto grupo, el de las algas euendolíticas, que también viven en el interior de la roca, pero acceden a él penetrando activamente (Golubic et al., 1981).

-Acuáticas: son la mayoría. Pueden ser, en función de la zona acuática en que viven:

- Algas bentónicas, cuando viven adheridas al fondo o los laterales:
 - Algas epipélicas, cuando viven sobre lodos o arena.
 - Algas litofíticas, cuando viven en la superficie de rocas sumergidas.
 - Algas endolíticas, cuando viven en el interior de las rocas sumergidas.
- Algas planctónicas, cuando viven suspendidas en el agua.
- Algas perifíticas, cuando viven adosadas a organismos vegetales sumergidos.

Dentro de este grupo, y dependiendo de la naturaleza de las aguas, se diferencian:

- Algas de agua dulce.
 - lénticas, en aguas estancadas.
 - lóticas, en aguas corrientes.
- Algas marinas.
- Algas de estuario. Son las que presentan más tolerancia a distintas temperaturas y grados de salinidad; esto es, son euritéricas y eurihalinas.

Las algas que afectan a las obras aquí estudiadas son de agua dulce, y, dentro de ellas, encontramos varios biotipos de algas de distintos tipos: epilíticas y endolíticas, lénticas y lólicas.

Aparte de estas clasificaciones generales de tipo ecológico, las algas se dividen en grandes grupos taxonómicos o phyla. Las algas que nos interesan pertenecen a los phyla de las **cianofitas**, **clorofitas** y las **heterokontofitas**, y, dentro de este último, más concretamente a la clase **bacilariofíceas**. A continuación haremos una revisión de las principales características de cada grupo.

Cianofitas.

Las cianofitas, también llamadas cianobacterias, cianoprocariotas y algas verde-azuladas, constituyen el grupo más primitivo de algas. Pertenecen, según el sistema de Margullis antes expuesto, al grupo de las Eubacterias del Reino Monera, puesto que en sus células el ADN se encuentra libre y sin cromosomas, no englobado en una membrana nuclear. Son las únicas algas de células procariotas. Carecen también, por tanto, de cloroplastos, de modo que los sáculos de granas, o tilacoides, están igualmente libres en el citoplasma. Este hecho conduce, como se adelantó anteriormente, a discrepancias respecto a su integración en ciertos grupos taxonómicos y a la nomenclatura para designarlas.

El grupo de las cianofitas contiene una sola clase, las cianofíceas, que incluye a unos 150 géneros y 2.000 especies. Sus características comunes más destacables son:

- Los organismos existen en formas unicelulares, coloniales, filamentosas, y parenquimáticas sencillas. En ningún caso las células están dotadas de flagelos.
- Al igual que en el caso de las bacterias, en el citoplasma de las algas cianofitas no hay un núcleo definido. Carecen también de mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplasmático.

- Los pigmentos fotosintéticos se encuentran en tilacoides libres, como ocurre en algas de otros grupos, como las Rodófitas y las Glaucófitas. Contienen clorofila a, pero no b y c.
- Además de la clorofila, tienen otros pigmentos: ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina. Estos pigmentos les confieren, en función del que predomine en cada especie y en cada etapa vital, una coloración que puede variar del verde al azul, pasando por el violeta e incluso el rojo.
- Entre los tilacoides se localizan pequeños gránulos que contienen reservas de polisacáridos.
- La pared celular está formada por varias capas, y sólo las dos más internas son iguales en todas las cianofitas. Las demás dependen del ambiente, de la cantidad de mucílago que segrega la célula, etc. Están compuestas de peptidoglucanos (polisacáridos unidos por péptidos). A menudo se encuentran envueltas en mucílagos (mucopolisacáridos hidratados).
- La reproducción de las cianofitas es asexual, pero la existencia de procesos parasexuales de transformación y conjugación permite el intercambio genético.
- Las cianofitas pueden vivir en agua dulce, salada, y en ambientes terrestres. Las hay planctónicas y bentónicas.

Bacilariofíceas.

Las bacilariofíceas, más comúnmente llamadas diatomeas, pertenecen a las Heterokonfitas, junto con ocho clases más. Son las algas más extendidas en nuestro planeta, ocupando hasta un 70% de su superficie. Las diatomeas desempeñan un papel principal en los ciclos geológicos del Silicio y el Carbono. El grupo incluye a unos 250 géneros y 100.000 especies. Sus características principales son:

- Existen normalmente en forma unicelular; a veces se agrupan en fascículos, filamentos o pústulas gelatinosas.
- Cada célula está recubierta de una pared de silicatos ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), exclusiva de este tipo de algas, recubierta de polisacáridos,

llamada frústulo. El frústulo está formado por dos mitades o valvas, ligadas por un cinturón o cíngulo.

- En función de la configuración del frústulo, distinguimos dos órdenes principales: a) diatomeas céntricas, cuando la estructura silíceo forma una imagen radial, y b) pennadas o ráficas, cuando la disposición del frústulo es a partir de una línea o eje. Cada elemento del frústulo se forma en el citoplasma, en una vesícula que funciona como depósito de sílice.
- En las diatomeas céntricas, las únicas células móviles o zoidios son los gametos masculinos.
- Los cloroplastos aparecen de color dorado o marrón, debido a la presencia de ficoxantina. Contienen también clorofilas a y c.
- Viven en aguas marinas y dulces, formando parte del plancton o del bentos. Las diatomeas céntricas son principalmente marinas planctónicas, mientras que las pennadas se encuentran tanto en agua dulce como salada.

Clorofitas.

Las clorofitas, o algas verdes, forman un grupo muy extenso, que se considera como el más evolucionado entre las algas. Tienen características que las distinguen de las demás algas, y las acerca a los briofitos y las plantas vasculares, como por ejemplo la composición de los polisacáridos que producen, o la presencia de clorofilas a y b. El phylum engloba varias clases, subdivididas en unos 500 géneros y 8000 especies. Sus características principales son:

- Aunque algunas son macroscópicas, la mayoría son microscópicas. Muchas son planctónicas, y viven suspendidas en el medio como organismos unicelulares aislados o agrupados en colonias, o en forma multicelular. Otras son bentónicas, y pueden ser epilíticas o perifíticas.
- Las células pueden realizar movimientos fototácticos, mediante secreción de mucílagos o por la presencia de flagelos (zoidios). Las células flageladas son isocontas, esto es, tienen los flagelos con

estructuras iguales pero que difieren en su longitud. Normalmente hay dos flagelos por cada célula.

- En los cloroplastos coexisten varios pigmentos, además de las clorofilas: xantofila, luteína, zeaxantina. Pero estos pigmentos no enmascaran a la clorofila, por lo que el color predominante es el que les da el nombre de algas verdes.
- En algunos casos las células tienen pirenoides, que se encuentran dentro del cloroplasto, y a menudo penetrados por los tilacoides.
- Las reservas de polisacáridos de las células están en forma de gránulos que pueden encontrarse alrededor del pirenoide, cuando lo hay, o dispersos en el estroma del cloroplasto, pero no libres en el citoplasma como ocurre en las demás algas.
- Su pared celular está compuesta, principalmente, de celulosa.
- La mayoría son de agua dulce, pero las hay también terrestres y marinas.

Para la redacción de este apartado se consideraron los siguientes trabajos: Canter-Lund y Lund (1995), Bourrely (1966-70), Desikachary (1980), Lee (1989), Round et al. (1990) y van den Hoek et al. (1995).

RECOLECCIÓN DE ESPECIES IMPLICADAS

El estudio de las especies algales presentes en las fuentes consideradas se realizó mediante toma de muestras y análisis en laboratorio. Los puntos de muestreo se determinaron, en el caso de los Reales Alcázares de Sevilla y de la fuente de Bibatauín, por observación directa, y, en la Alhambra, además, por referencia a los resultados obtenidos en anteriores trabajos de la misma línea (Bolívar Galiano, 1994).

Los diferentes muestreos se realizaron, una vez obtenida la autorización necesaria de parte de los responsables en cada caso, mediante bisturí y pinzas. Las muestras se conservaron en recipientes apropiados (eppendorf) y se fijaron con formaldehído al 4%, antes o después de su análisis. En total se hicieron 5 muestreos, obteniéndose un total de 74 muestras destinadas a su observación y estudio: 2 muestreos en el Alcázar Real, con 25 muestras finales, 2 en la Alhambra, con 24

muestras, y 1 en Bibatauín, con 25 muestras. Los muestreos se realizaron en la época de mayor proliferación algal, cuando su presencia es más evidente. Para la Alhambra y los Alcázares, los muestreos se realizaron con pocos días de diferencia cada uno entre un monumento y otro, y con un mes de intervalo entre el primero y el segundo en un mismo monumento. En la fuente de Bibatauín, como se indicó anteriormente, el estudio se desarrolló posteriormente, realizándose el muestreo en un único día.

Las muestras tomadas son exclusivamente de algas y sus productos de alteración (costras minerales: acreciones y concreciones). En ningún caso se tomaron muestras de materiales constitutivos originales.

Las muestras obtenidas se observaron a la lupa binocular para su caracterización en términos macroscópicos. Se realizó una descripción de cada muestra, completada en algunos casos con fotografías o esquemas con lápices de colores. La identificación de las especies presentes se hizo por observación al microscopio óptico. El estudio taxonómico se acompañó en algunos casos de fotomicrografías. Se empleó para este estudio un microscopio convencional o invertido, y para la documentación fotográfica un Tesovar, ambos de la casa Zeiss.

Las especies halladas se catalogaron, y se cuantificaron según el modelo propuesto en Bolívar Galiano (1994), esto es, mediante la asignación de un índice del 1 al 5 cuando constituían más del 1% de la muestra. Si una especie se encontraba en menor proporción, se marcó con un signo +. Los porcentajes que corresponden a las cifras son los siguientes:

1: del 1 al 10%
2: del 10 al 25%
3: del 25 al 50%
4: del 50 al 75%
5: del 75 al 100%

CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMAS DE ALTERACIÓN RELACIONADAS

Las muestras recogidas en la fuente de Bibatauín y las de los recintos de la Alhambra y los Alcázares ejemplificaban, como se mencionó anteriormente, algunas de las formas de alteración típicas de las microalgas: las costras estromatolíticas de carbonatos, denominadas también concreciones o acreciones (dependiendo de su situación en la fuente; Bolívar Galiano, 1994). Estas costras son el estadio final de la colonización algal, y representan una de las formas de alteración más dañinas y persistentes de las originadas por microalgas.

Para completar el estudio sobre el biodeterioro en estos monumentos, se realizó una caracterización de estas formaciones. Se observaron las costras más representativas a la lupa binocular y se efectuaron dibujos descriptivos. Además, se realizaron análisis colorimétricos y mineralógicos, que se completaron con la observación al microscopio electrónico de barrido de las muestras más significativas.

Colorimetría.

El análisis colorimétrico tiene como fin caracterizar cuantitativamente el color de una superficie. En nuestro caso, el interés de este análisis residía en la obtención de datos cuantitativos que complementasen los cualitativos, obtenidos por observación directa y a la lupa de las muestras recogidas.

El análisis se basa en la teoría tricromática de la visión en color, derivada de las observaciones de Isaac Newton, y formulada por separado por Young y Helmholtz. El fundamento de la teoría es que cualquier color puede obtenerse mezclando tres estímulos de color primarios. La elección de estos estímulos es muy amplia, pero no arbitraria, puesto que ninguno de los tres estímulos debe ser mezcla de los otros dos.

A raíz de esta teoría tricromática, la Comisión Internationale de l'Éclairage (CIE) estableció en 1931 un sistema de colorimetría por comparación, que consistía en obtener un determinado color partiendo de la combinación de rojo (700 nm de longitud de onda), azul (435,8 nm) y verde (546,1 nm), para poder así definirlo mediante tres vectores situados

en un espacio tridimensional, llamado espacio triestímulo. En este sistema, la ecuación que describe el color es la ecuación triestímulo (Attridge, 2002):

$$Q = rR + vV + aA \qquad \text{ec. 3est. I}$$

donde Q es el color a definir y R, V y A, llamados valores triestímulo, corresponden, respectivamente, al rojo, verde y azul. Cada letra, o sea, cada color, está precedida por su minúscula, que indica la “cantidad” del mismo. Según la ecuación, entonces, un color cualquiera puede definirse en función de la “cantidad” de rojo, azul y verde que contenga.

El sistema de 1931 se demostró poco acertado, por lo que posteriormente se efectuaron ciertas modificaciones, de tal forma que la ecuación triestímulo se redefinió en función de los parámetros X, Y y Z:

$$Q = xX + yY + zZ \qquad \text{ec.3est. II}$$

donde x, y y z se definen como:

$$x = X / X+Y+Z \qquad y = Y / X+Y+Z \qquad z = Z / X+Y+Z$$

de modo que $x + y + z = 1$.

Esta formulación es adecuada para describir colores luz, pero resulta poco apropiada para definir el color de un objeto. Por este motivo, en 1976 la CIE introdujo un nuevo modelo colorimétrico, conocido como CIELAB, que consiste en localizar un color en un sistema tridimensional (L^* a^* b^*), donde L^* representa la luminosidad, y a^* y b^* forman un plano circular donde se pueden situar el tono y el croma. El croma está relacionado con la saturación del estímulo, y el tono indica la zona cromática en que se encuentra el color.

Estas coordenadas se definen como:

$$a^* = 500 \cdot \left[\left(\frac{X}{X_0} \right)^{1/3} - \left(\frac{Y}{Y_0} \right)^{1/3} \right]$$

$$b^* = 200 \cdot \left[\left(\frac{Y}{Y_0} \right)^{1/3} - \left(\frac{Z}{Z_0} \right)^{1/3} \right]$$

$$L^* = 116 \cdot \left(\frac{Y}{Y_0} \right) - 16$$

siempre que X/X_0 , Y/Y_0 y $Z/Z_0 > 0,01$, donde X_0 , Y_0 y Z_0 corresponden a los valores triestímulo de un blanco de referencia. Si no se da esta condición, es necesario modificar las expresiones anteriores.

La relación entre las coordenadas a^* y b^* con el croma (C) y el tono (h) viene dada por las siguientes expresiones:

$$C = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

$$h = \arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$$

Experimentalmente, se pueden conocer a^* y b^* a partir de los valores de X, Y y Z, que se obtienen mediante un espectrorradiómetro. En el presente estudio se empleó un Spectrascan-704 de PhotoResearch, del Departamento de Óptica de la Universidad de Granada (fig. 1.1.5), y las mediciones se realizaron en una cabina de iluminación Verivide con iluminante D65, simulador de la luz día estándar. La medida del blanco de referencia se tomó sobre una pieza de sulfato de bario, suministrada por el fabricante de la cabina. No fue necesario modificar las expresiones referentes a las coordenadas a^* y b^* .

Del total de muestras recogidas en las fuentes de la Alhambra y los Reales Alcázares se seleccionaron las 14 más representativas para este estudio. La observación directa permitió decidir los puntos sobre los que realizar las medidas en cada muestra. Las muestras se colocaron, dentro de la cabina, en un plano inclinado 45° sobre la horizontal. Se efectuaron 42 mediciones.



Fig 1.1.5- Análisis colorimétrico de una de las muestras (señalada con una flecha).

Análisis mineralógico.

Para el análisis mineralógico se recurrió a la técnica de difracción de rayos X (DRX), que permite conocer la composición de los distintos materiales; la DRX aporta además información cualitativa sobre la fase cristalina de las muestras analizadas. La técnica se basa en la difracción que experimentan los rayos al incidir con cierto ángulo sobre un sólido, si éste es cristalino y ordenado. El empleo de rayos X se justifica porque el fenómeno de difracción es posible debido a que su longitud de onda (λ) va desde los 0.02 y los 100 Å ($1 \text{ Å} = 10.000 \mu$), y las distancias interatómicas son de alrededor de 1 Å. El estudio por difracción de rayos X permite obtener el perfil que caracteriza a un material cristalino. Su utilidad se limita, por tanto, a sólidos ordenados, siendo completamente inútil para analizar sólidos amorfos o sustancias orgánicas.

Para este estudio, se utilizó un difractómetro Philips PW1710, equipado con rendija automática, del Departamento de Mineralogía y Petrología de la Universidad de Granada. Las condiciones de trabajo

fueron: radiación de emisión $\text{CuK}\alpha$, voltaje de 40 kV, intensidad de 40 mA, zona explorada de 3° a $60^\circ 2\theta$ y velocidad de goniómetro de $0,1 2\theta /s$. La mineralogía de las muestras se determinó mediante el método del polvo cristalino desorientado. Todas las muestras fueron previamente molidas en mortero de ágata hasta un tamaño inferior a 0,053 mm (tamiz 140 ASTM). El polvo obtenido se dispuso, sin ejercer ninguna presión que pudiera orientar algunos minerales, sobre portamuestras de sílice de bajo ruido de fondo. La interpretación de los datos obtenidos se llevó a cabo manualmente y mediante programas informáticos (Martín Ramos, 1990). La nomenclatura empleada en los difractogramas resultantes es la siguiente, y corresponde a la propuesta por Kretz (1983):

Cal: calcita	Arg: aragonito
Ank: ankerita	Dol: dolomita
Qtz: cuarzo	

Microscopía electrónica de barrido.

Esta técnica se basa en la formación de imágenes mediante el empleo de electrones. Esta óptica permite al microscopio electrónico de barrido (SEM, en sus siglas en inglés) obtener imágenes de gran aumento, aunque no tanto como las que ofrece el microscopio electrónico de transmisión (TEM). Con todo, el SEM está mucho más difundido y desarrollado que el TEM, ya que las imágenes que proporciona son más realistas, con mayor definición y de apariencia tridimensional (Matteini y Moles, 1990). Esto se debe a que los electrones que forman la imagen no son los transmitidos por la muestra, sino los reflejados (electrones secundarios). En este estudio la microscopía aplicada fue la electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM), una variante del SEM tradicional. El equipo empleado fue un Leo Gemini 1530 FESEM, acoplado a un analizador INCA-200 Oxford microanalysis. Las imágenes FESEM por electrones secundarios se obtuvieron a partir de pequeñas muestras de costras (2x4x1mm aprox.) cubiertas de carbón.

I.II. RESULTADOS

AGENTES DE BIODETERIORO

El elenco de géneros identificados en la observación al microscopio óptico de las muestras tomadas en las fuentes de la Alhambra, Bibatauín y los Reales Alcázares se ofrece en el anexo I. En las tablas correspondientes se señala también la proporción de cada uno de ellos en el total de cada muestra analizada. La tabla 1.2.1 ofrece un resumen del contenido del anexo, indicando las especies que se encontraron en cada recinto estudiado y en cuántas muestras se identificó cada una de ellas, además de su presencia relativa en el total de muestras analizadas de cada lugar.

ESPECIE		ALHAMBRA	Nº M / 24	BIBATAUÍN	Nº M / 25	ALCÁZARES	Nº M / 25
CIANOFÍCEAS	<i>Calothrix</i> spp	+	3	-	-	+++++	16
	<i>Chamaesiphon</i> sp	-	-	+++	5	-	-
	<i>Chlorogloea</i> sp	-	-	+++	5	-	-
	<i>Chroococidiopsis</i> sp	-	-	++	5	-	-
	<i>Chroococcus</i> sp	+	1	-	-	++	3
	<i>Gloeocapsa</i> sp	-	-	+	1	-	-
	<i>Phormidium</i> spp	+++++	15	+++++	14	+++++	17
	<i>Pleurocapsa</i> sp	-	-	+	2	-	-
	<i>Scenedesmus</i> sp	+	1	-	-	-	-
	<i>Symploca</i> sp	+	3	-	-	++	4
DIATOMEAS	<i>Achnantes</i> sp	-	-	pr	1	-	-
	<i>Amphora</i> sp	+	1	-	-	-	-
	<i>Cymbella</i> spp	+	1	-	-	pr	2
	<i>Epitemia</i> sp	-	-	-	-	++++	7
	<i>Melosira</i> sp	-	-	-	-	pr	1
	<i>Navicula</i> spp	+++	5	+	3	+	4
	<i>Nitzschia</i> spp	+++	4	pr	1	++++	10
	<i>Synedra</i> sp	-	-	-	-	pr	2
	<i>Tabellaria</i> sp	-	-	pr	1	-	-
CLOROFÍCEAS	<i>Apatococcus</i> spp	+	3	-	-	+	2
	<i>Chlorella</i> spp	pr	2	-	-	++	3
	<i>Chlorosarcina</i> spp	++++	19	-	-	++++	10
	<i>Chlorosarcinopsis</i> spp	++	2	-	-	-	-
	<i>Chroococidiopsis</i> sp	-	-	++	4	-	-
	<i>Coccomyxa</i> sp	pr	2	-	-	-	-
	<i>Cosmarium</i> spp	-	-	++++	6	-	-
	<i>Planophila</i> sp	++	3	pr	1	+	2
	<i>Stichococcus</i> sp	-	-	pr	2	pr	2
	<i>Tetracystis</i> sp	++	2	-	-	++	5
<i>Ulothrix</i> spp	-	-	+	3	+	2	

Tabla 1.2.1- Presencia relativa de las distintas especies de cianofíceas, clorofíceas y diatomeas en cada una de las fuentes estudiadas, y número de muestras en que fueron identificadas en cada caso (Nº M). Los índices se calcularon dividiendo la suma de los índices de porcentajes de la catalogación del anexo I entre el número de muestras total, de tal forma que (-) = ausencia; (pr) = menos de 0,1 (presencia no representativa de la especie); (+) = de 0,1 a 0,25; (++) = de 0,25 a 0,5; (+++) = de 0,5 a 0,75; (++++) = de 0,75 a 1; (+++++) = más de 1 (presencia muy elevada).

Se observa que, mientras que en las muestras extraídas de las fuentes de los Alcázares sevillanos la presencia de los distintos tipos de algas es, por término medio, relativamente proporcionada, sin que ninguno de ellos predomine claramente, en las muestras recogidas en las fuentes de la Alhambra las algas clorofíceas son más numerosas que las restantes, en líneas generales y a excepción de algunos casos concretos.

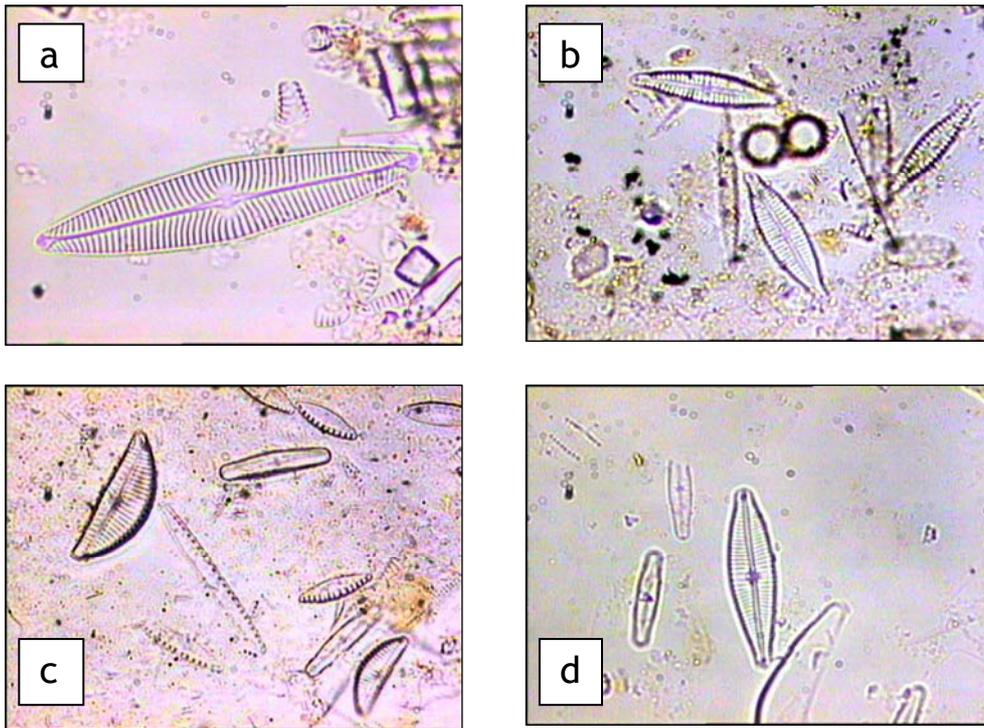


Fig. 1.2.2- 4 imágenes de diatomeas (100X): a) y b) dos especies de *Navicula*, c) varias células de *Gomphonema* sp, y d) *Nitzschia* spp (fotomicrografías cedidas por Eduardo Linares).

También la en la fuente de Bibatauín estas algas son muy numerosas, aunque el grupo protagonista es el de las cianofíceas. Entre las clorofíceas, la especie más frecuente es *Chlorosarcina* spp, un alga verde unicelular; también son abundantes *Tetracystis* sp, y *Planophila* sp. Entre las cianofíceas, en los tres lugares predominan especies del género

Phormidium (fig. 1.2.3f) y géneros muy similares, como *Symploca*, y, en los Reales Alcázares, de *Calothrix*. Son géneros de algas filamentosas, de filamentos uniseriados. Por otra parte, las diatomeas más comunes en todos los casos son *Nitzschia* spp, *Navicula* spp y *Cymbella* sp (figs. 1.2.2a-d).

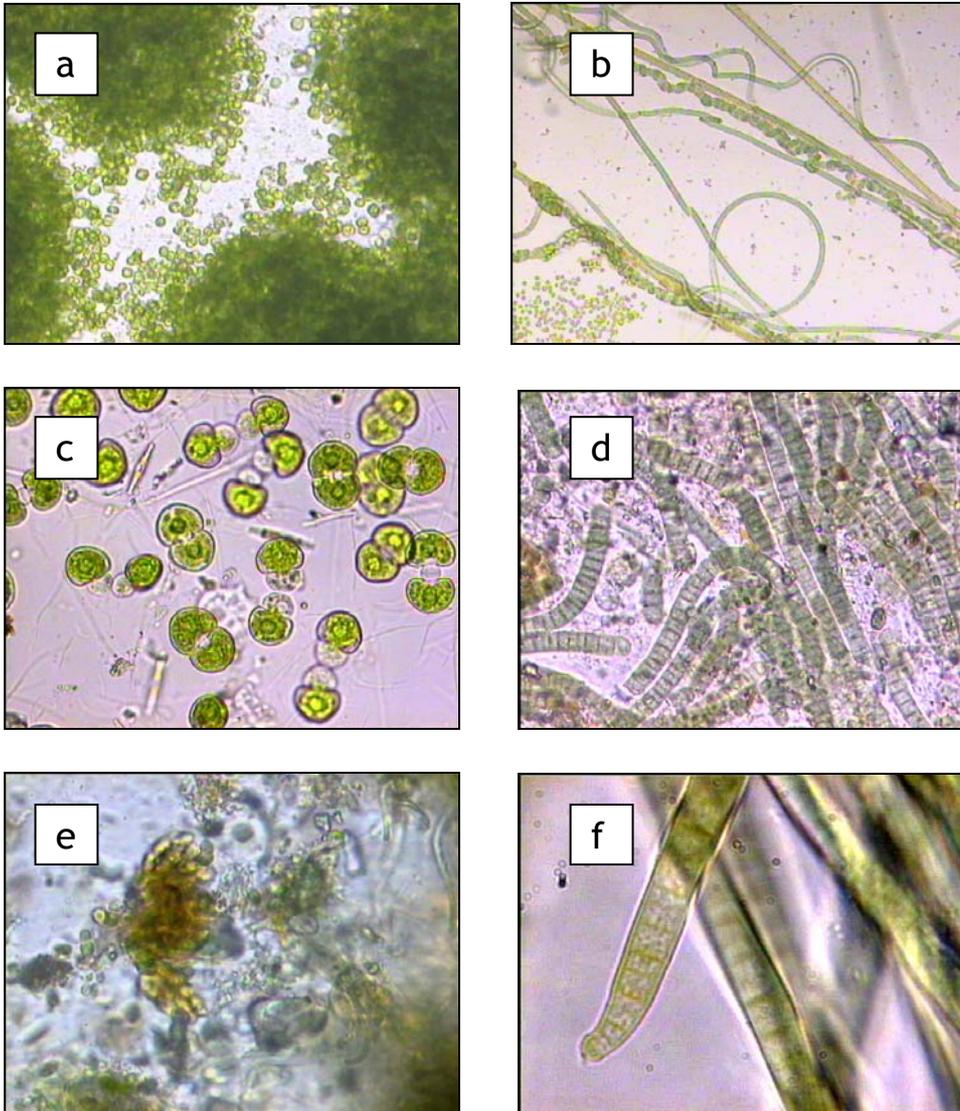
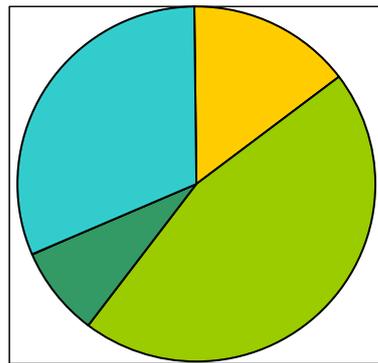


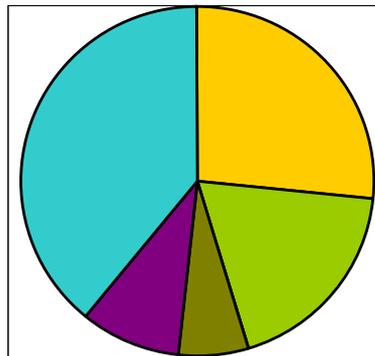
Fig. 1.2.3- a) agregado de algas verdes cocoides (40X); b) algas verdes filamentosas acompañadas de cocoides (20X); c) algas verdes unicelulares de la especie *Cosmarium* sp (40X); d) filamentos de cianofíceas (40X); e) pseudoparénquimas (20X); y f) filamentos de *Phormidium uncinatum* cf (40X).

Desde el punto de vista del biodeterioro resulta interesante conocer los biotipos a que pertenecen las especies identificadas, es decir, qué tipo de comunidad generan. En este estudio se seguirá la clasificación propuesta por Sánchez Castillo y Bolívar Galiano (1997). En la figura 1.2.4 están reflejados los biotipos predominantes en cada área de muestreo. Como se observa, los tres biotipos más representativos son el I, que corresponde a las unicelulares aisladas, y que aquí se corresponde con las diatomeas y algunas algas verdes; el II, células formando agregados gelatinosos, de algas verdes y, sobre todo, verde-azuladas; y el VI, filamentos con vaina, mayoritariamente de algas verde-azuladas.

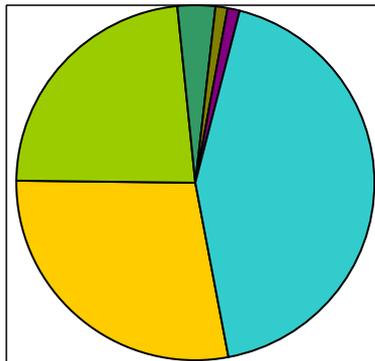
Fig. 1.2.4- Proporción de cada biotipo algal en las distintas zonas de muestreo.



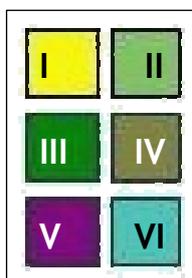
ALHAMBRA



BIBATAUÍN



ALCÁZARES



- BIOTIPOS:**
 I- UNICELULARES
 II- AGREGADOS GELATINOSOS
 III- AGREGADOS NO GELATINOSOS
 IV- PSEUDOPARÉNMQIMAS
 V- FILAMENTOS CON VAINA
 VI- FILAMENTOS CON VAINA

FORMAS DE ALTERACIÓN RELACIONADAS

Las especies identificadas se encontraron relacionadas con formas de alteración características, tales como pátinas biológicas de distintas tipologías, y costras carbonatadas biogénicas. La observación de estas últimas a la lupa binocular permitió distinguir, en algunos de los casos, varios estratos perfectamente diferenciables (figs. 1.2.5a-d).

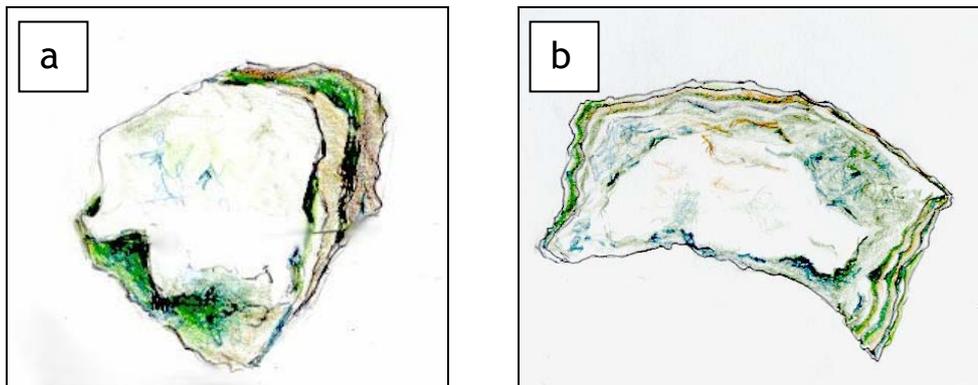
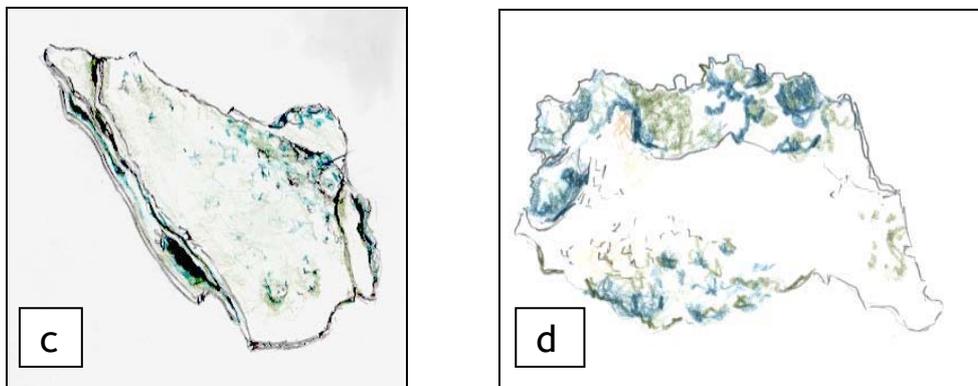


Fig.1.2.5. Costras biogénicas de carbonato cálcico: a) y b) muestras procedentes de la Alhambra; debajo, c) y d) muestras de Bibatauín. Se aprecian los distintos estratos, correspondientes a diferentes etapas en su formación y constituidos por diversos organismos.



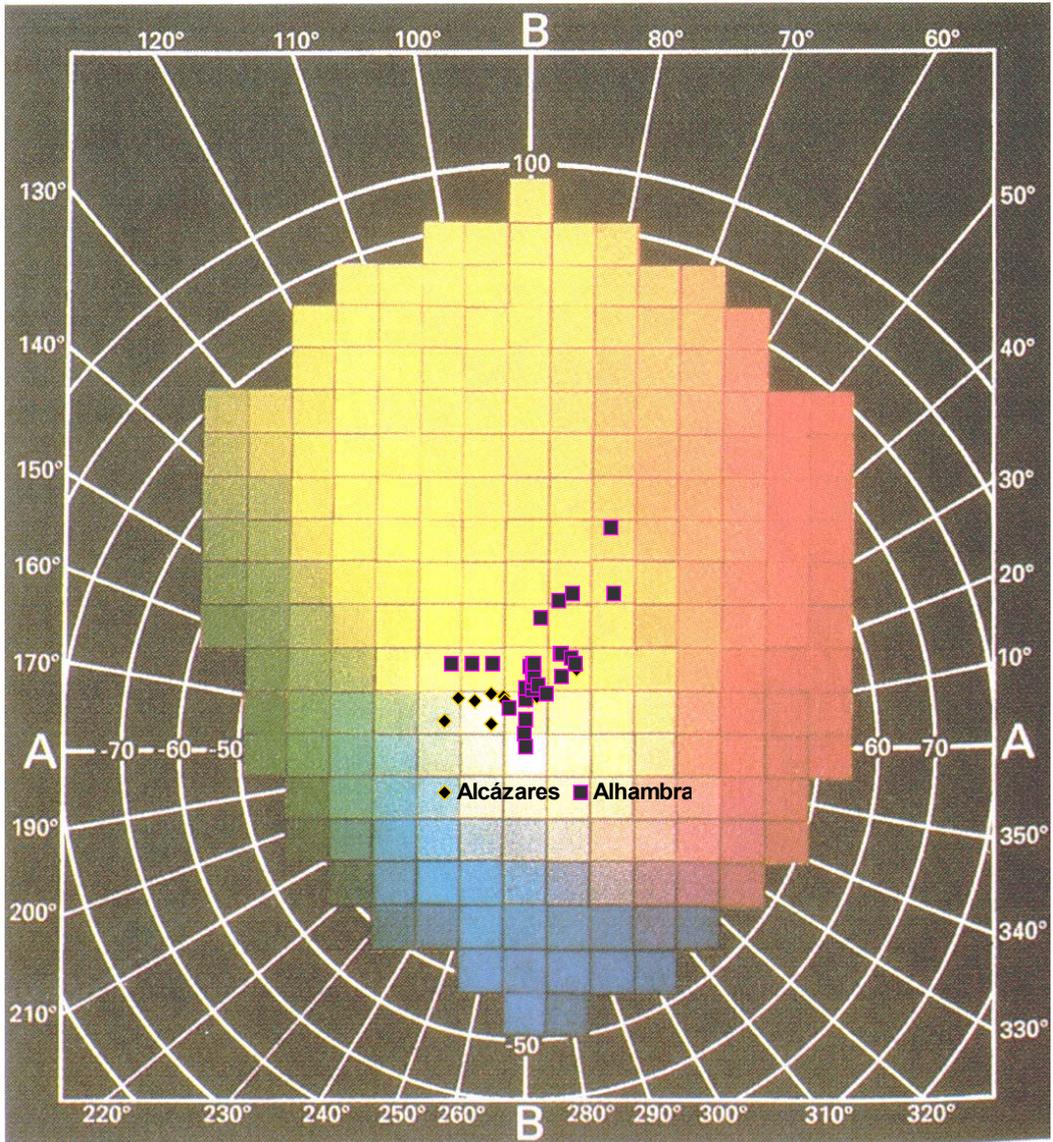
Las costras carbonatadas presentan una superficie externa extremadamente lisa, compacta y homogénea, hecho sobresaliente en el caso de las muestras tomadas en las fuentes de la Alhambra. En las muestras provenientes de los Alcázares las costras mostraban un grado menor de compactación, y a menudo los estratos se confundían entre sí.

La cara interna de las costras, por el contrario, es irregular, y muestra biofilms de organismos vivos, mezclados con materia inorgánica sin compactar.

Se analizaron al microscopio óptico muestras de cada uno de los estratos, en aquellos casos que se consideraron más interesantes. Como era presumible, se encontró que las capas coloreadas de tonos más oscuros correspondían a algas pertenecientes al grupo de las cianofíceas, mientras que los estratos de tonos verdes más claros estaban constituidos por clorofíceas. En ambos casos la presencia de cristales de materia inorgánica era notable.

Colorimetría.

Mediante el análisis colorimétrico se obtuvieron una serie de valores, recogidos en el anexo II, que permitieron realizar la gráfica que se muestra a continuación (fig. 1.2.7), y que ha sido superpuesta a un diagrama CIELAB, tomado de Hita Villaverde (2001), que sirve de referencia para su lectura. Los puntos corresponden al tono de las costras estromatolíticas. La figura que aquí se ofrece es una representación plana de un objeto tridimensional, donde el grado de saturación de los colores varía a lo largo de un eje perpendicular. Puesto que en este soporte no se puede representar este parámetro, el diagrama ha sido modificado ligeramente para aproximar la saturación de los colores de referencia a la de los colores de las costras analizadas.



Figs. 1.2.7- Tono de las costras analizadas por colorimetría. El eje de ordenadas corresponde al parámetro a^* , y el de abcisas, a b^* . Los tonos medidos en las costras provenientes de los Reales Alcázares están indicados con rombos, y los de las muestras de la Alhambra y el Generalife, con cuadrados.

Análisis mineralógico.

El contenido de los difractogramas que se obtuvieron mediante el análisis por DRX está resumido en la tabla 1.2.1; algunos de los más representativos de cada zona de muestreo se adjuntan en el anexo III. Como se puede observar, los resultados son similares en los tres casos, y en todas las muestras el mineral predominante fue la calcita. En algunas de ellas se encontró además otro mineral cálcico, el aragonito, y otro carbonato, la dolomita. También se detectó en ciertos casos la presencia de compuestos silíceos.

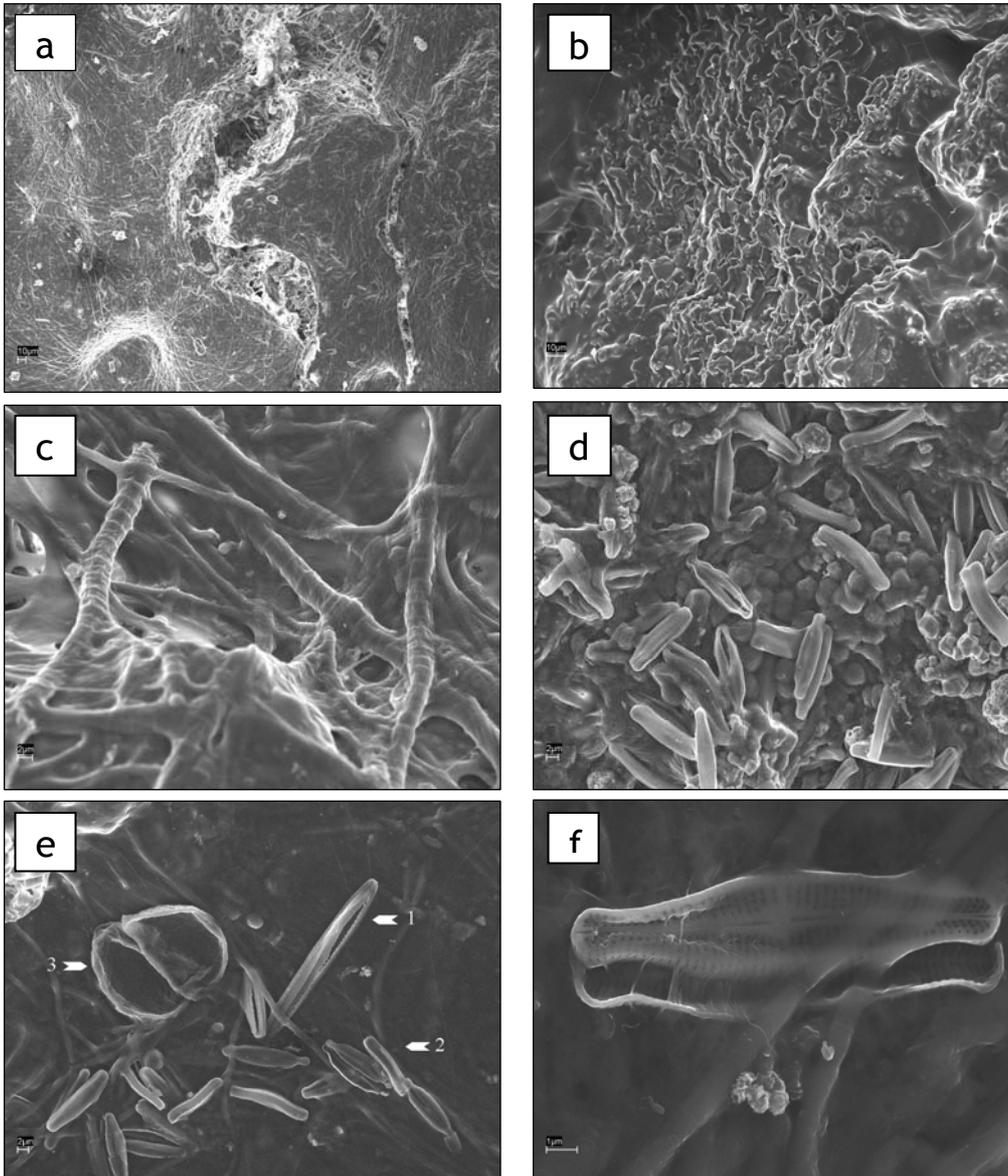
MINERALES	ALCÁZARES	ALHAMBRA	BIBATAUÍN
Calcita	++++	++++	++++
Dolomita	+	+	+
Aragonito	+	++	+
Ankerita	-	-	pr
Cuarzo	pr	+	+

Tabla 1.2.1- Análisis semi-cuantitativo de las costras biogénicas. La concentración de cada tipo de mineral se expresa mediante el número de (+); (pr) indica una presencia muy baja; (-) indica ausencia.

Microscopía electrónica de barrido.

El análisis de muestras al microscopio electrónico de barrido por emisión de campo (FESEM) proporcionó imágenes muy elocuentes sobre la estructura de las costras y su carácter biogénico. En la figura 1.2.9 (a-f) se recogen algunas de las más representativas, en las que se observa claramente cómo la materia mineral está configurada por capas sucesivas, y cómo las microalgas se encuentran imbricadas en la matriz mineral.

Fig. 1.2.9: a) vista general de la superficie de una costra carbonatada; b) aproximación a la misma costra; c) filamentos de cianobacterias recubiertos de materia mineral; d) diatomeas y cristales minerales; e) especies de diatomeas: *Nitzschia* sp (1) y *Achnantes* sp (2), y un ejemplar del alga verde *Cosmarium* sp (3); f) *Tabullaria* sp. Todas las imágenes provienen de muestras de la fuente de Bibatauín.



Descripción genérica.

Como se desprende de estas fotomicrografías (especialmente, figs. 1.2.9a y b), además de los dibujos realizados (figs. 1.2.5a-d) y de las observaciones recogidas en el anexo I, las costras estromatolíticas presentes en las fuentes ornamentales estudiadas ejemplifican distintas tipologías de estas formas de alteración. A partir de su estudio y comparación puede establecerse una tipología modelo, con ciertos rasgos característicos. En el esquema que se ofrece a continuación (fig. 1.2.10) están señalados esos rasgos:

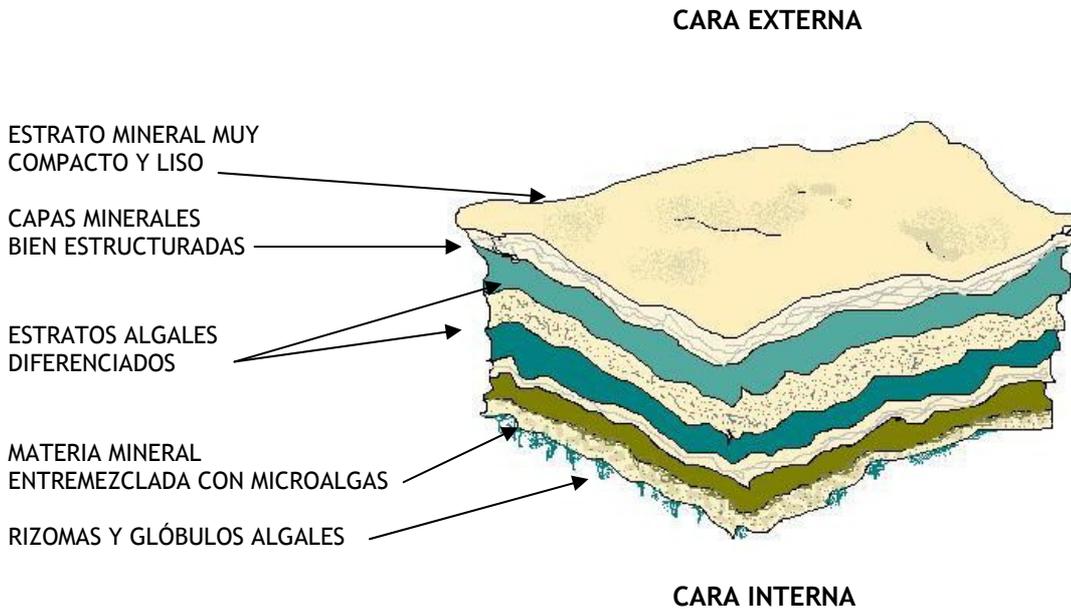


Fig.1.2.10- Esquema de la estructura del prototipo de costra estromatolítica.

Así, la costra biogénica típica estaría constituida de varias capas superpuestas en las que la materia mineral, principalmente calcita, se alterna con masa orgánica, de forma que cada estrato queda más o menos diferenciado. El número de estratos varía en función de la antigüedad del estromatolito, principalmente. En su cara externa, estas costras muestran una superficie lisa y muy compacta, de un tono ocre claro, que puede

llegar a confundirse con el propio sustrato pétreo cuando sus colores se asemejan (fig. 1.3.2). Bajo esta superficie suele encontrarse un estrato mineral bien estructurado y con pocas impurezas, pero a medida que se profundiza en la costra, se van encontrando estratos cada vez menos diferenciados.



Fig. 1.3.2- Borde de una fuente del Generalife, en la Alhambra, donde se puede observar el parecido aspecto de las costras estromatolíticas con el sustrato original.

Los estratos de microalgas pueden estar constituidos por organismos pertenecientes en su mayoría a una sola especie, aunque lo más frecuente es que convivan en proporción más o menos equilibrada varias especies de un mismo género, o varios géneros distintos. También en una misma capa algal pueden encontrarse organismos de distintos biotipos, pero normalmente predomina un biotipo sobre los demás.

En los estratos más cercanos al sustrato, la materia inorgánica se mezcla con la orgánica, de tal forma que al final los estratos son difícilmente individuables. Esto es debido a que estas últimas capas son las más recientes, y por tanto las más frescas, donde la mineralización no está tan avanzada.

I.III. DISCUSIÓN

AGENTES DE DETERIORO:

BIODETERIORO POR MICROALGAS EN LAS FUENTES ESTUDIADAS

La importancia de la descripción taxonómica de los organismos hallados en estos estudios queda justificada por ser la única manera de someter los resultados obtenidos a una norma que permita contrastarlos y compararlos entre sí, confrontando los resultados del análisis de muestras provenientes del recinto de la Alhambra y la fuente de Bibatauín, de Granada, con los de las muestras de los Reales Alcázares, de Sevilla, y también con los de otros trabajos en la misma línea realizados por otros autores.

BIOTIPOS

En el presente caso, antes de plantear cualquier tipo de comparación con trabajos anteriores, es conveniente establecer las diferencias y similitudes existentes entre las comunidades y especies identificadas en los tres lugares de muestreo considerados. En este sentido, se debe subrayar que las muestras tomadas pertenecen a biotipos y comunidades distintos: en las tomadas en las fuentes de la Alhambra y de Bibatauín las microalgas pertenecen, mayoritariamente, al grupo de las que forman agregados gelatinosos (biotipo II) y al grupo de las filamentosas con vaina (VI), estando a menudo muy mineralizadas. Las tomadas en los Reales Alcázares, en cambio, muestran películas menos carbonatadas.

Alhambra.

Las algas incluidas en los biotipos gelatinosos, como las de las muestras de la Alhambra, tienden a formar microestromatolitos o costras estromatolíticas, debido a las excreciones extracelulares que las recubren. No obstante, algunas de aquellas muestras representan formaciones de tipo película, aunque éstas fueron menos frecuentes.

Las estructuras estromatolíticas se relacionan con estados de desarrollo muy avanzados (Golubic, 1973 y 1987, Sánchez Castillo y Bolívar, 1997). Resulta chocante encontrar en gran número este tipo de formaciones (casi ausentes en las fuentes consideradas en los Alcázares, como se verá) frente a la escasez de otros biotipos. La explicación puede residir en que, dentro de una tendencia general en el ámbito andaluz, los jardines y fuentes de la Alhambra son en la actualidad objeto de intervenciones de restauración. Parece acertado suponer que en un proceso de limpieza reciente se hayan eliminado las comunidades algales más visibles y que ofrecen menos resistencia a tratamientos mecánicos y químicos, es decir, las pústulas, películas y tapetes. Así, en los momentos de muestreo, las nuevas comunidades no habrían tenido tiempo de desarrollarse de forma visible. Si además se tiene en cuenta que las tomas de muestra se realizaron durante el período invernal, poco propicio para el desarrollo de las microalgas, la veracidad de la explicación resulta más que probable.

Bibatauín.

También en la fuente de Bibatauín los biotipos “pegajosos” eran los más abundantes, aunque había gran número de comunidades de diatomeas, especialmente en las zonas donde el agua incide con mayor fuerza. Entre las algas recubiertas de mucílago, la mayoría pertenecían a géneros de cianobacterias filamentosas. Como cabría suponer, la proporción de mineral en las muestras allí tomadas era grande, al igual que en las provenientes de la Alhambra y el Generalife. Pero en este caso no es preciso buscar una justificación para su amplio desarrollo, ya que, como se

mencionó anteriormente, la fuente de Bibatauín está bastante desatendida por las autoridades locales, de modo que la proliferación de microorganismos no está controlada ni limitada por tratamientos biocidas o de limpieza. Así, la formación de costras carbonatadas tiene lugar libremente, llegándose al inquietante punto descrito en otros apartados de esta memoria.

Las comunidades que viven en los estromatolitos son muy difíciles de tratar y eliminar, puesto que se encuentran protegidas por la estructura mineral (Tiano et al., 1993; Dornieden et al., 2000), con lo que, en oposición a las consideraciones que algunos autores anotan (Borowitzka, 1989), la materia inorgánica estaría actuando como protector en estos casos. Esto hace que las algas integrantes de estas comunidades representen un grave problema desde el punto de vista de la conservación del monumento (Sand, 1997). Por otra parte, a menudo el aspecto de los estromatolitos es fácilmente confundible con el de la piedra original. Por tanto, no resulta descabellado pensar que estas comunidades hayan resistido a los últimos tratamientos efectuados.

Reales Alcázares.

Las muestras tomadas en las fuentes del Alcázar de Sevilla corresponden mayoritariamente a comunidades en forma de pústulas y películas, habiéndose recogido también algunas muestras de tapetes más o menos mineralizados. El grado de mineralización, en todo caso, no era tan avanzado como en el caso de los puntos de muestreo granadinos, pese a ser predominantes las algas filamentosas con vaina. En los primeros muestreos realizados en esta investigación, es decir, en los recintos de la Alhambra y los Reales Alcázares, las muestras fueron tomadas con muy pocos días de diferencia, con lo que se descarta la explicación de esta escasa mineralización alegando momentos vitales distintos debidos a diferencias estacionales. Puesto que las pústulas y películas de microalgas corresponden a estadios tempranos de colonización y desarrollo (Bolívar Galiano, 1994), es presumible que su presencia sea consecuencia de tratamientos de limpieza relativamente recientes: durante el proceso de limpieza se habrían eliminado comunidades precedentes, con lo que el

proceso de colonización por parte de las microalgas tendría que recomenzar desde las primeras etapas. Esta hipótesis resulta más aceptable aún si se tienen en cuenta las labores de reestructuración y restauración que se vienen desempeñando en los jardines del recinto sevillano desde hace algunos años.

GÉNEROS IDENTIFICADOS

Cianofitas.

Las cianobacterias, tanto filamentosas como cocoides, suponen un porcentaje importante del total de las muestras provenientes de Sevilla, y un porcentaje discreto de las de Granada (Alhambra y Bibatauín). Su mayor presencia en las primeras tiene la misma explicación que la predominancia de algas verdes en las muestras de la Alhambra.

Entre las filamentosas, las especies más frecuentes fueron en todos los casos, *Phormidium* sp y *Symploca* sp, ambas del orden de las Nostocales, y, en las muestras sevillanas, se destaca asimismo la presencia de *Calothrix* sp, casi ausente en las muestras tomadas en Granada. Todas son algas filamentosas con vaina (biotipo IV); las primeras (Nostocales) son móviles, mientras que las segundas se caracterizan por fijarse al substrato por medio de un heterocisto. Ambas pueden encontrarse en ambientes sumergidos o aéreos, puesto que resisten a condiciones externas muy diversas, gracias a la protección que les proporciona la vaina que las recubre. La existencia de esta vaina, junto con otros factores, va a determinar su capacidad deteriorógena. Las Nostocales son algas típicamente formadoras de tapetes (Sánchez Castillo y Bolívar, 1997). En las muestras estudiadas su presencia se relaciona con estadios de mineralización avanzados. Por otra parte, la presencia de *Calothrix* sp implica que el agua en que se encuentra es de gran pureza en el sentido de que carece de compuestos de nitrógeno: estas algas, mediante el heterocisto, son capaces de fijar N₂ de la atmósfera, del que obtienen compuestos orgánicos. Su abundancia en las fuentes de los Reales Alcázares es signo de baja concentración o ausencia de este elemento.

Las distintas especies identificadas se encuentran con frecuencia en la bibliografía relacionada: Ortega-Calvo *et al.* (1991) mencionan la presencia de varias especies de *Phormidium* en los substratos estudiados, al igual que Caneva *et al.* (1992) en su trabajo sobre mármoles de monumentos romanos, donde identificaron, además de otras microalgas, una especie de *Calothrix*. Young y Wainwright (1994), en el mismo estudio antes citado, mencionan la presencia de una especie de *Calothrix*, pero no hallaron ninguna de *Phormidium*; en ese trabajo se analizan las microalgas de un monumento de mármol emplazado en un bosque de Canadá, un ambiente virgen donde presumiblemente las aguas no están contaminadas, lo que justifica la presencia de *Calothrix* frente a la ausencia de *Phormidium*, que como se ha visto suele ser muy común. En cambio, en un trabajo sobre calcificación biogénica en tumbas romanas, Ariño *et al.* (1997) sí detectan cianofíceas filamentosas del orden de las Nostocales. También en Saiz Jiménez (1999), Tomaselli *et al.* (2000-a) y Urzì *et al.* (2001-a) se anota la existencia destacada de *Phormidium* entre las cianobacterias presentes en diversos monumentos pétreos.

Por otro lado, las especies más abundantes de cianofíceas no filamentosas fueron *Chamaesiphon* sp y *Chroococciopsis* spp. Estas algas, al igual que las anteriores, están recubiertas de secreciones poliméricas que ellas mismas producen. Por su morfología, la protección no adopta en estos casos la forma de vaina, sino que configura una matriz gelatinosa que las mantiene agrupadas y les permite soportar condiciones ambientales extremas.

Debido a la vaina de las filamentosas y a la matriz gelatinosa de las cocoides, todas ellas contribuyen al biodeterioro del material en que se desarrollan, al provocar interacciones químicas con el sustrato y fijar carbonatos (Lowenstam, 1981; Borowitzka, 1989; Sand, 1997). En efecto, el análisis por DRX de las muestras en que aparecen con más abundancia estas microalgas refleja la gran cantidad de carbonatos, principalmente calcita, que contienen, y el análisis por FESEM permitió observar estratos minerales entremezclados con estructuras orgánicas (figs. 1.2.9).

Bacilariofíceas.

En cuanto a las diatomeas, se aprecia que su presencia es más regular en las muestras de las fuentes de los Alcázares, aunque no dejan de estar presentes en las de Granada. En el primer caso, las especies más frecuentes son *Epitemia* sp y *Nitzschia* spp, y también se encontraron especies de *Navicula*, *Synedra* y *Cymbella*. En las fuentes de la Alhambra y Bibatauín predominaban *Navicula* spp y *Nitzschia* spp; se identificaron también especímenes de *Cymbella* sp y *Amphora* sp. Estas especies son muy similares entre sí. No obstante, llama la atención la ausencia total de *Epitemia* sp en las muestras de Granada, cuando fue tan abundante en las de los Alcázares. Las especies relacionadas son en general habituales en aguas dulces, y su presencia ha sido detectada en otros estudios sobre fuentes monumentales (Foged, 1983; Bolívar Galiano, 1994).

Las diatomeas se relacionan con estadios iniciales de colonización o con ambientes de gran estabilidad (Wetherbee, 1998), por lo que no es frecuente encontrarlas de forma representativa en pátinas biológicas no recientes sobre monumentos. Sin embargo, su presencia en fuentes es común, especialmente cuando la renovación del agua es continua (Tiano et al., 1995). Foged (1983) y Bolívar y Sánchez Castillo (1995) las mencionan en sus estudios sobre fuentes monumentales. En este estudio su presencia se ve justificada no sólo por la movilidad del agua, sino también porque, efectivamente, se trata de sustratos que, como se dijo, han sido limpiados recientemente, de modo que estamos ante una colonización que puede considerarse nueva, en comparación con las que afectan a los monumentos en que se basan otras investigaciones (Caneva et al., 1992; Wendler y Prasartset, 1999; Tomaselli et al., 2000-a; Urzì y de Leo, 2001, entre otros). En todo caso, las especies identificadas no representan un peligro grave para el sustrato, en términos de biodeterioro.

Clorofitas.

Por lo que se refiere a los grupos y géneros algales identificados en cada ámbito de muestreo, las algas verdes representan un gran porcentaje del total de microorganismos encontrados en las muestras tomadas en la Alhambra, y se encuentran también en gran medida en las de la fuente de Bibatauín. Las especies más abundantes fueron, en primer lugar, *Chlorosarcina* spp, seguidas por *Apatococcus* sp (sobre todo en la Alhambra), *Tetracystis* sp, *Planophila* sp y *Chlorosarcinopsis* minor.

A la hora de interpretar esta predominancia hay que considerar que estas algas son edáficas, es decir, se desarrollan preferentemente en ambientes no acuáticos. Puesto que las muestras tomadas en la Alhambra y la fuente de Bibatauín consisten en formaciones estromatolíticas, no es de extrañar la abundancia de estas especies, que habitan bajo las costras carbonatadas. Sin embargo esto es contrario al hecho descrito en el trabajo de Tomaselli et al. (2000-b), donde se apunta que las algas verdes detectadas sólo aparecían después de un año de los tratamientos de limpieza efectuados en los mármoles que se estudiaron.

Estas algas son unicelulares; todas tienen características similares y viven agrupadas en sarcinas (Canter-Lund y Lund, 1995), lo que supone un daño potencial para el substrato (Bolívar Galiano, 1994). Estas especies, además, activan la precipitación de carbonatos. Por lo demás, son organismos muy cosmopolitas que se encuentran de forma habitual en monumentos pétreos, preferentemente en los expuestos a la luz. Ortega Calvo et al. (1991) mencionan la presencia de otras algas verdes cocoides, como *Muriella terrestris* y *Chlorella* spp, género este último también presente en las muestras analizadas, en las fachadas de ciertos edificios estudiados; en Caneva et al. (1992) se hace hincapié en la abundancia de *Chlorococcum* sp en los substratos marmóreos estudiados, una especie muy cercana a las antes nombradas, e identificada en nuestro estudio. Young y Wainwright (1994) la identificaron también, además de algunas especies de *Chlorella*, en el análisis de la microflora causante del biodeterioro de un petroglifo de mármol en Norteamérica. Especies muy similares encontraron Gaylarde y Gaylarde (1999) en edificios de Brasil, país de clima muy

distinto. Saiz Jiménez (1999), en un estudio en España, identificó especies parecidas, concluyendo que los microorganismos identificados tenían la capacidad de transformar los contaminantes atmosféricos antropogénicos en compuestos favorables a su desarrollo, con los consiguientes problemas que, en términos de conservación, se derivan: el deterioro que han de sufrir los monumentos parece con esto inevitable, sea a causa de los productos químicos contaminantes, sea a causa de los microorganismos. En el estudio de Tomaselli et al. (2000-a) realizado sobre varios substratos pétreos, entre ellos algunos mármoles, se menciona la presencia de *Apatococcus* sp y otras algas verdes cocoides de características similares; en el estudio de Tomaselli et al. (2000-b) sobre ficoflora en estatuas de mármol de Carrara se identificaron igualmente algas verdes unicelulares como *Chlorococcum* y *Apatococcus*, entre otros géneros de algas filamentosas y de otros tipos. También Bellinzoni et al. (2003) citan una especie de *Chlorococcum* entre las encontradas en su estudio del río Tíber, en Roma.

La ausencia casi total de otras tipologías de algas verdes, como las filamentosas, se explica por las intervenciones de limpieza mencionadas: ante estos tratamientos las algas verdes filamentosas son de las primeras en ser eliminadas, junto con las diatomeas. Sin embargo cabe resaltar la llamativa presencia en el interior de la fuente de Bibatauín del alga verde *Cosmarium* sp, raramente mencionada en estudios de este tipo. En todo caso, su presencia no implica ninguna amenaza para la integridad del sustrato. Es un género muy sensible que soporta mal los cambios bruscos de temperatura y las condiciones extremas; la superficie sumergida de las paredes internas de la taza de la fuente, que son relativamente altas, constituye sin duda el hábitat idóneo para su desarrollo, pues la masa de agua filtra la luz y atenúa las variaciones de temperatura del exterior.

En cuanto a las muestras procedentes de las fuentes sevillanas, su análisis reveló que ninguna clase aparecía de forma predominante. Algas verdes, cianobacterias y diatomeas estaban presentes en proporciones más o menos equilibradas. Dentro del grupo de las algas verdes, las especies más abundantes coincidieron con las identificadas en la Alhambra. En las muestras de los reales Alcázares abundan también lo que se ha señalado en el anexo I como quistes naranjas. Estos quistes, presentes en menor

proporción en las muestras granadinas, corresponden a productos de reserva que almacenan las algas verdes cuando las condiciones ambientales son adversas, y cuyo color es de bermellón a anaranjado debido a la presencia de ciertos pigmentos, principalmente β -caroteno. Estos pigmentos cumplen una función protectora, actuando de escudo ante una radiación lumínica excesiva (García-Pichel y Castenholz, 1991), que puede deberse a una disminución de la humedad por alta sequedad ambiental, lo da lugar a que el microorganismo entre en un período de resistencia (Lee, 1989).

FORMAS DE ALTERACIÓN RELACIONADAS

El análisis colorimétrico de las costras carbonatadas seleccionadas del total de muestras tomadas mostró que el tono general de las provenientes de las fuentes de los Reales Alcázares era más verdoso que el de las fuentes de la Alhambra, donde los tonos están en torno a los ocres, como se desprende de la observación de la gráfica correspondiente (fig. 1.2.7). Esto se corresponde con el hecho de que el proceso de mineralización de las películas algales está menos avanzado en el caso de las primeras fuentes, de modo que el color de las algas influye más sobre el tono del conjunto. En la Alhambra las costras están más consolidadas y extendidas, lo que puede verse influido por la composición de su agua; conviene apuntar que también las costras de la fuente de Bibatauín, donde presumiblemente el agua que fluye es de características similares, eran mayores que las sevillanas. Confrontando estos datos con la observación a la lupa binocular de los estromatolitos, se encuentra que efectivamente en las costras de la Alhambra las capas de materia inorgánica son, en líneas generales, de mayor grosor, con lo que el color de los microorganismos queda cubierto por el de los minerales. Así, pese a haberse encontrado en esas muestras mayoría de algas verdes, el aspecto de las costras carbonatadas no se ve influido de forma significativa por su color.

El análisis por colorimetría no ofreció, por tanto, resultados concluyentes. Por este motivo no se realizó en las muestras provenientes de la fuente de Bibatauín: estas fueron tomadas después de los primeros

muestreos en la Alhambra y los Reales Alcázares, cuando ya se había efectuado el análisis colorimétrico sobre aquellas muestras.

Por otra parte, en el estudio mineralógico se obtuvieron resultados que coinciden con los de muchos autores, entre otros, Golubic (1973 y 1987), Brüggerhoff *et al.* (1999) y García-Vallès *et al.* (2000). Los difractogramas muestran que las costras estromatolíticas, en todos los casos, están compuestas mayoritariamente de calcita. Este hecho responde a que en el proceso de mineralización son los compuestos de calcio los que las microalgas fijan principalmente (Borowitzka, 1989). Además de carbonato cálcico, en algunas muestras se detectó también carbonato de magnesio, o dolomita, que también es un producto habitual de la carbonatación algal (Golubic, 1969). Otro carbonato identificado en la DRX fue el aragonito, presente en varias muestras. El aragonito es una forma meta-estable de calcita; por tanto, es indicador del origen biogénico de estas costras (Brüggerhoff *et al.*, 1999; Kawaguchi y Decho, 2002). Se detectaron también, en las muestras de costras provenientes de la Alhambra y Bibatauín, minerales compuestos de silicio. Su presencia puede estar vinculada a comunidades de diatomeas, cuyo frústulo es silíceo. Otra posibilidad es que haya habido interferencias con partículas minerales traídas por el viento. La DRX, sin embargo, no permitió localizar diferencias significativas en cuanto a la cristalografía de las muestras analizadas.

PARTE II

PROPUESTA DE MATERIAL DE INTERVENCIÓN

II.I. MATERIALES Y MÉTODOS

MÁRMOLES Y RESINAS SINTÉTICAS

Los materiales que se propusieron, como alternativa a los tradicionales, para su empleo en intervenciones relacionadas con la restauración de fuentes monumentales, consisten en una mezcla de resina sintética con polvo de piedra natural.

Las piedras naturales utilizadas son dos tipos de mármol blanco, de Macael (Almería) y de Carrara (Italia). Estos materiales se eligieron por ser, en la mayoría de los casos, los constituyentes de las obras originales consideradas en este estudio.

Las resinas que se emplearon son de tipo termo-endurecible, seleccionadas por su idoneidad como ligantes y por sus propiedades mecánicas. Concretamente, estas resinas son las descritas a continuación:

Resina de poliéster ESTRATIL® AL100, de la casa Cray Valley Ibérica S.A.

Las resinas de poliéster son las más usadas en la industria, especialmente en la naval. Las más frecuentes son las insaturadas; de hecho, el término “resina de poliéster” se refiere generalmente a ellas.

Otras de sus características son:

Viscosidad a 25°C (PNE-53 344): 5000 Mpa

Resistencia a la tracción (UNE 53023): 60 Mpa

Resistencia a la flexión (UNE 53022): 110 Mpa

Resina Gel-Coat ADHEGEL serie 11000, de Adhesia S.A.

El componente básico de las resinas Gel-Coat es el poliéster, cuya composición química le da unas propiedades muy similares a las descritas anteriormente, con la diferencia de que el Gel-Coat tiene características tixotrópicas, que le vienen dadas por la inclusión de sílice coloidal en su composición. La sílice coloidal es un pirógeno hidrófilo inerte; el empleado en nuestro caso es el HDK N20 de la firma comercial Wacker. El contenido de sílice en la resina es el máximo que ésta permite para su correcta polimerización, es decir, el 20%. La activación del proceso de polimerización es igual al caso precedente.

Resina epoxídica EC54 + endurecedor K12, de Camattini SPA.

Las resinas epoxi forman una gran familia y son muy versátiles. Se caracterizan por su color ámbar o marrón claro; sus cualidades mecánicas y adhesivas y su resistencia a la degradación ambiental y acuática hacen de ellas un material excelente para industrias como la aeronáutica y la naval, reemplazando incluso a las resinas de poliéster y las Gel-Coat. Otra característica favorable es su poca retracción al endurecer.



Fig. 2.1.2- Estructura ideal del grupo epoxi.

El término “epoxi” hace referencia a un grupo químico que consiste en un átomo de oxígeno ligado a dos de carbono, ligados a su vez entre sí y con otra molécula (fig. 2.1.2). La resina epoxídica más sencilla

tiene una estructura anular de tres miembros, y se denomina ‘alfa-epoxi’ o ‘1,2-epoxi’.

Las resinas epoxi se diferencian de las de poliéster en que no endurecen mediante un catalizador, sino mediante un agente reactivo, normalmente una amina, que también participa en la reacción química de endurecimiento. En esta reacción, dos grupos epoxi se enlazan a un grupo amina, formando una estructura tridimensional compleja. Tanto la resina líquida como el agente endurecedor tienen baja viscosidad y son fácilmente manipulables. Se puede trabajar con resinas epoxi a temperaturas entre los 5° y los 150°, en función del agente elegido. El número de moléculas que intervienen en la reacción es fijo, por lo que, para asegurar una reacción total, la proporción de cada componente ha de ser la indicada por el fabricante. De otro modo quedarían grupos amina o epoxi libres y la calidad final del material se vería afectada.

En las largas cadenas epoxídicas los grupos reactivos están situados en los extremos. En otras resinas estos son grupos éster; su ausencia en las epoxi les proporciona mayor resistencia al agua. Las moléculas epoxi tienen también dos grupos anulares en el centro (fig. 2.1.3); estos grupos absorben las tensiones mecánicas y térmicas mejor que los grupos lineales, proporcionando a la resina buenas cualidades de rigidez y resistencia térmica.

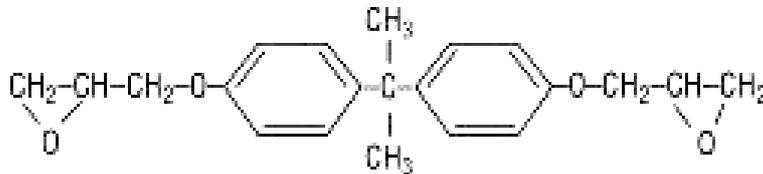


Fig. 2.1.3- Modelo de cadena epoxídica.

Otras de sus características son:

- Viscosidad a 25°C (PNE-53 344): 1400 Mpa
- Resistencia a la tracción (UNE 53023): 40 Mpa
- Resistencia a la flexión (UNE 53022): 70 Mpa

ELABORACIÓN DE LAS PROBETAS

De cada uno de los mármoles naturales se cortaron 55 probetas de varias dimensiones. En adelante nos referiremos a ellas con las siglas M y C para el mármol de Macael y Carrara, respectivamente.

Por otra parte, el estudio de las piedras artificiales se estructuró en dos fases. En la primera de ellas se realizó un análisis comparativo entre sus propiedades y las de las rocas naturales. Para la preparación de los morteros, en esta primera fase, se fijó la proporción de sus dos componentes, en cada caso, en 1:1 en relación de volumen. El tamaño de grano de las cargas pétreas fue de 350 micras para ambos mármoles. Se prepararon 6 morteros diferentes, constituidos por mezclas de:

Mármol de Macael	+ Resina Epoxi	ME
	+ Resina de Poliéster	MP
	+ Resina Gel-Coat	MG
Mármol de Carrara	+ Resina Epoxi	CE
	+ Resina de Poliéster	CP
	+ Resina Gel-Coat	CG

Las siglas que se indican a la derecha de cada composición serán las que, a partir de ahora, se utilicen para designar los distintos morteros en este trabajo.

De los morteros así elaborados se realizaron un total de 504 probetas, de varias dimensiones, sobre las que se desarrollaron los distintos ensayos y experimentos, de tipo físico, químico y biológico, programados para esta etapa. Las probetas se realizaron por vaciado de moldes de silicona; se sometieron después a una limpieza con acetona, y finalmente se lijaron con lija de corindón 04-PVI 200.

ESTUDIOS FÍSICO- QUÍMICOS

Para conocer las cualidades físicas y mecánicas de los materiales pétreos elaborados, y contrastarlas con las de los mármoles de origen natural, se realizaron una serie de pruebas en laboratorio, que permitieron obtener, para cada material, los valores correspondientes a las siguientes magnitudes: masa específica, porosidad, absorción, resistencia a flexión, resistencia a compresión. Por otra parte, se sometieron los materiales a ensayos químicos, con el fin de conocer su respuesta ante: envejecimiento natural, envejecimiento en cámara climática, radiación ultravioleta, ciclos de sales de sodio y atmósfera saturada de dióxido de azufre.

Los estudios de las propiedades físicas fueron realizados por el Laboratorio de Materiales de Construcción, del Departamento de Construcción y Proyectos de Ingeniería Civil de la Universidad Politécnica de Valencia; las pruebas químicas se efectuaron en el Laboratorio de Química Analítica del Departamento de Conservación y Restauración de Bienes Culturales, perteneciente a la misma Universidad (Roig-Salom *et al.*, 2003).

ESTUDIO BIOLÓGICO

Para conocer la susceptibilidad de ser colonizados por microorganismos de los materiales artificiales propuestos, y compararla con la de los materiales originalmente empleados, se realizó un estudio experimental. El estudio se basó en la observación progresiva de la colonización de algas en probetas representativas de sustratos de origen natural y sintético. Los distintos materiales fueron representados por un total de 108 probetas:

Composición de las probetas (de 2x3x0.5 cm cada una)

- mármol de Carrara (x12 probetas)
- mezcla de Carrara con 50% de
 - resina epoxi (x12)
 - resina poliéster (x12)
 - resina Gel-Coat (x12)
- mármol de Macael (x12)
- mezcla de Macael con 50 % de
 - resina epoxi (x12)
 - resina poliéster (x12)
 - resina Gel-Coat (x12)
- resina epoxi pura (x4)
- resina poliéster pura (x4)
- resina Gel-Coat pura (x4)

Las probetas se dispusieron en grupos de cuatro pertenecientes a un mismo material. Los grupos se colocaron aleatoriamente, para favorecer la homogeneidad de los resultados, sobre una plancha de metacrilato blanco de 50x70 cm. Las probetas se fijaron al soporte plástico mediante una masilla adhesiva químicamente inerte (BluTack®). El conjunto se colocó en el área de los semilleros de los jardines del Generalife, cercano a una fuente de agua corriente de iguales características a la que fluye en las fuentes monumentales del recinto. Para surtirlo de agua se instaló un sistema de riego consistente en una tubería circular, conectada a la red general de las fuentes de la Alhambra, con cuatro surtidores aspersores. De este modo se obtuvo sobre las probetas un aporte constante de agua (figs. 2.1.4a y b) que reproduce las situaciones prototípicas que se pueden dar en una fuente: el agua incide sobre la superficie de las probetas igual que lo haría sobre los bordes de una taza, resbala y fluye sobre ellas, acumulándose en algunos puntos y fluyendo con más rapidez en otros. Con esto se pretende abarcar las distintas condiciones de colonización y desarrollo que, de forma natural, pueden encontrar las microalgas en condiciones normales.



Figs. 2.1.4a y b -
Dispositivo
experimental instalado
en los semilleros del
Generalife, en la
Alhambra.



En los meses sucesivos se hizo un seguimiento de la colonización de los distintos sustratos por parte de diversas comunidades de algas. En intervalos de aproximadamente un mes se recogieron probetas (1 de cada grupo de 4 en cada extracción), de las cuales se extrajeron muestras de organismos que se estudiaron por observación al microscopio óptico (fig. 2.1.5). Para el análisis se empleó un microscopio invertido Zeiss Axiovert 35.



Fig. 2.1.5- Segunda recogida de probetas.

II.II. RESULTADOS

PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS COMPARADAS

Las pruebas realizadas por el Departamento de Construcción y Proyectos de Ingeniería Civil de la Universidad Politécnica de Valencia y en el Laboratorio de Química Analítica del Departamento de Conservación y Restauración de Bienes Culturales, de la misma Universidad, ofrecieron los datos que se muestran a continuación.

Los valores medios de masa específica real, porosidad y absorción están contemplados en la tabla 2.2.1. Se observa que los materiales artificiales ofrecen valores más bajos de masa específica respecto a los mármoles naturales. En efecto, el carácter ligero de los materiales propuestos es una de las ventajas que esperaba obtenerse con su diseño.

material	masa esp.	porosidad	absorción
C	2,84	0,2934	0,1034
CE	1,85	0,0767	0,0416
CP	1,95	0,0339	0,0174
CG	1,90	0,0321	0,0168
M	2,72	0,0144	0,0053
ME	1,85	0,0337	0,0182
MP	1,96	0,0307	0,0157
MG	1,95	0,0460	0,0236

Tabla 2.2.1- Valores de masa específica en gr/cm^3 , y porosidad y absorción en % de cada material. Acrónimos: C: mármol de Carrara, CE: mármol de Carrara con resina epoxi, CP: Carrara con resina de poliéster, CG: Carrara con Gel-Coat, M: mármol de Macael, ME: Macael con epoxi, MP: Macael con poliéster, MG: Macael con Gel-Coat.

Por otra parte, los valores de absorción y porosidad son muy bajos en todos los casos, incluso excesivamente para el mármol de Macael.

En cuanto a los valores medios de resistencia a flexión y compresión, son los siguientes:

material	R. flexión	R. compresión
C	22	159
CE	46	93
CP	33	117
CG	32	92
M	20	115
ME	32	95
MP	31	107
MG	32	95

Tabla 2.2.2- Resistencia a la flexión y a la compresión (MPa) de cada material.

La resistencia a la flexión es menor en los materiales naturales que en los artificiales, aunque éstos son más deformables y plásticos que los primeros. Se desprende que las piedras naturales sufrirán roturas de tipo frágil ante una flexión suficiente. Como dato comparativo, cabe mencionar que la resistencia a la flexión del hormigón es unas cinco veces menor que la del mármol de Macael, que ofrece el valor más bajo en esta prueba (equipo del Laboratorio de Materiales de Construcción, com. pers.).

En el caso de la resistencia a la compresión, es mayor en los materiales naturales, puesto que antes de que se produzca la ruptura se dan movimientos y reajustes entre las partículas que los constituyen, en tanto que en las probetas de materiales compuestos estos movimientos no tienen lugar. La gran diferencia que ofrecen los mármoles de Macael y Carrara se debe, precisamente, al mayor tamaño de las partículas del primero.

Por último, la tabla 2.2.3 muestra los valores medios de porcentaje de masa perdida tras las pruebas con sulfatos y de ciclos de hielo-deshielo.

Probeta	Ensayo con NaSO ₄	Ensayo hielo-deshielo
C	1,06	1,07
CE	0,70	0,00
CP	1,24	0,00
CG	1,25	0,61
M	0,76	1,20
ME	0,71	0,65
MP	0,58	0,60
MG	1,75	0,59

Tabla 2.2.3- Porcentaje de pérdida de masa en cada material. Acrónimos: C: mármol de Carrara, CE: mármol de Carrara con resina epoxi, CP: Carrara con resina de poliéster, CG: Carrara con Gel-Coat, M: mármol de Macael, ME: Macael con epoxi, MP: Macael con poliéster, MG: Macael con Gel-Coat.

Los datos demuestran que la respuesta de las probetas de materiales artificiales fue, con mucho, mejor que la de los mármoles naturales ante estas pruebas. Además, exámenes mediante SEM/EDX mostraron variaciones significativas en las probetas de material pétreo natural, cuya superficie sufría una fuerte disgregación cristalina tras las pruebas.

Por otro lado, se obtuvieron resultados poco favorables para los morteros mixtos ante las pruebas de envejecimiento acelerado y radiaciones. Los morteros que mostraron una reacción más negativa fueron los realizados con resina epoxi. De todos modos, los cambios cromáticos experimentados por los mármoles naturales fueron también muy elevados.

SUSCEPTIBILIDAD ANTE LOS AGENTES DE BIODETERIORO

La identificación de las especies algales que se desarrollaron en las diferentes probetas permitió la elaboración de las tablas recogidas en el anexo IV. A partir de ellas se realizó la siguiente gráfica (fig. 2.2.4), en la que se ofrece una visión general del desarrollo de la colonización en cada sustrato. Como se puede apreciar, las probetas correspondientes a los materiales naturales (C y M) son las que fueron colonizadas más lentamente, mientras que las artificiales, especialmente las mezclas a partir de mármol de Macael (ME, MP y MG) y la de Carrara con resina Gel-Coat (CG) fueron colonizadas muy rápidamente.

Más concretamente, volviendo a los datos del anexo IV, se observa que las primeras comunidades colonizadoras pertenecen siempre al grupo de las diatomeas, independientemente del sustrato estudiado. Dentro de las diatomeas, los géneros que se encontraron con mayor abundancia fueron *Gomphonema* en primer lugar, seguido de *Nitzschia* y *Navicula*. Asimismo detectamos la presencia frecuente de otros géneros, como *Fragillaria*, *Cymbella* o *Achnantes*.

Colonización

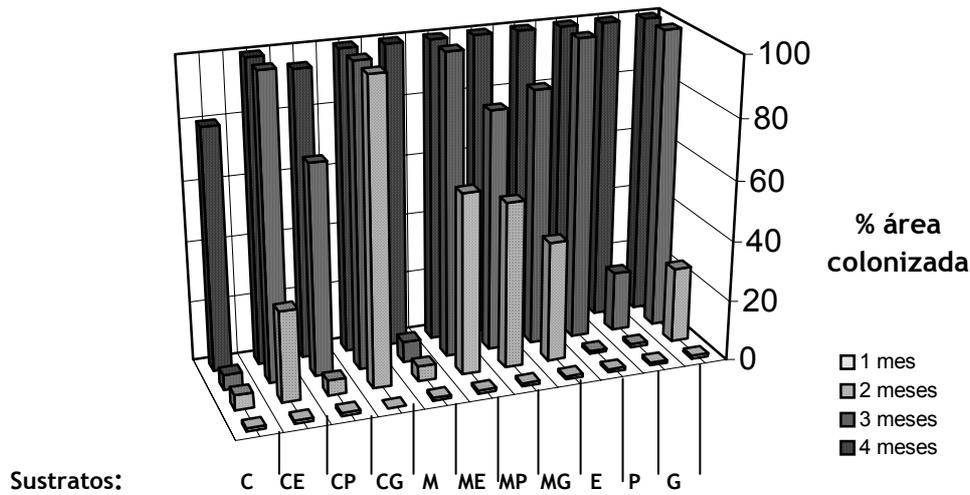


Fig. 2.2.4- Progresión de la colonización algal en cada material. Acrónimos de los sustratos: C: mármol de Carrara, CE: mármol de Carrara con resina epoxi, CP: Carrara con resina de poliéster, CG: Carrara con Gel-Coat, M: mármol de Macael, ME: Macael con epoxi, MP: Macael con poliéster, MG: Macael con Gel-Coat, E, probeta de resina epoxi, P: resina de poliéster, G: resina Gel-Coat.

Tras los primeros estadios del experimento las comunidades de diatomeas se fijaron al sustrato, formando películas, que posteriormente se recubrieron de tapetes de algas verdes, particularmente de filamentos de *Ulothrix* sp y *Oedogonium* sp, y de agregados de *Apatococcus* sp, *Tetracystis* sp y otras especies muy similares. Estos tapetes, posteriormente, se mineralizaron (fig. 2.2.5).

El proceso, si bien se da repetidamente en todos los tipos de sustratos analizados, se desarrolló con mayor rapidez en los morteros de mármol de Macael con resinas sintéticas de cualquier tipo y el mortero de mármol de Carrara con resina Gel-Coat. Los sustratos más lentamente colonizados fueron los mármoles naturales de Carrara y Macael, el mortero de mármol de Carrara con resina poliéster y la resina de poliéster pura (fig. 2.2.6).

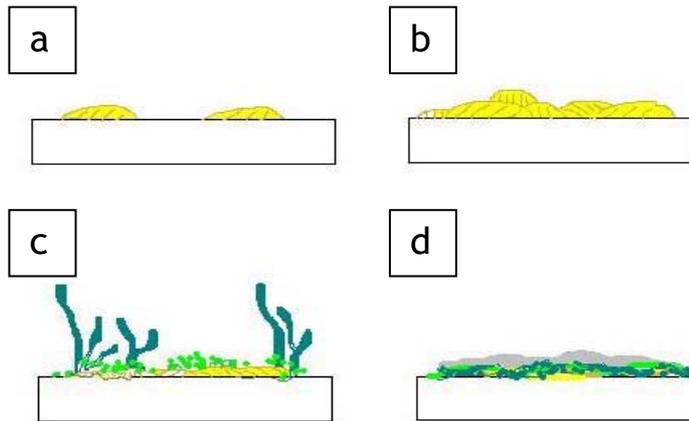


Fig. 2.2.5- Esquema del proceso de colonización de las probetas: a) las primeras diatomeas toman contacto; b) se forma una película relativamente estable de diatomeas; c) algas verdes filamentosas y coccoides se desarrollan sobre la película inicial, formando un tapete de mayor grosor; d) el tapete comienza a mostrar signos de mineralización.



Fig. 2.2.6- Estado del dispositivo experimental para evaluar la susceptibilidad de los diferentes materiales a la colonización por microalgas, momentos antes de la tercera recogida de probetas. Las probetas menos colonizadas corresponden a los materiales naturales.

II.III. DISCUSIÓN

PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LOS MATERIALES COMPARADOS

Las características físico-mecánicas y químicas que manifestaron los materiales artificiales propuestos resultaron ser, en general, muy favorables, desde el punto de vista de los objetivos planteados en este trabajo. La confrontación de los resultados obtenidos en las pruebas abióticas realizadas a estos materiales con los obtenidos para los mármoles naturales ofrece un panorama satisfactorio, *grosso modo*. Estos resultados eran, en cierta medida, presumibles, teniendo en cuenta los datos que se conocen sobre las propiedades de estas rocas (entre otros, Winkler, 1975; Cabrera Garrido, 1979) y sobre las de los materiales elaborados (Roig Salom, 1995). Así, el empleo de estos materiales para los fines aquí propuestos no era sólo seriamente planteable, sino además, al menos desde esta perspectiva, muy conveniente. De hecho, algunos autores han sugerido que, ante situaciones de deterioro avanzado de rocas naturales, concretamente para los mármoles del Patio de los Leones de la Alhambra y del Hospital Real, en Granada, lo más razonable sería sustituir las piezas dañadas por otras nuevas, y no consolidar las actuales, puesto que los problemas surgidos en dichos edificios tienen su origen en las características intrínsecas de la piedra, de modo que un tratamiento de consolidación sólo retrasaría la necesidad de una intervención más radical (Zezza y Sebastián Pardo, 1992).

Con todo, hay que puntualizar sobre el hecho de que algunos de los morteros testados ofrecieron resultados negativos en las pruebas que examinaban su estabilidad cromática. Exactamente, los morteros elaborados con resina epoxi mostraron un grado de alteración cromática tras estos ensayos excesivamente elevado, lo que los convierte en inutilizables en labores de restauración de monumentos. La inestabilidad cromática es uno de los mayores inconvenientes de las resinas sintéticas en general (Melo *et al.*, 1999), y es uno de los principales problemas que plantea el uso de la resina epoxi (de Witte *et al.*, 1985). Esto supone una gran contrariedad, puesto que la resina epoxi figura entre las más duras y resistentes de las que se aplican en la consolidación de monumentos pétreos (Selwitz, 1992); sin embargo, las pruebas físicas y químicas realizadas en la Universidad de Valencia ofrecen resultados que parecen indicar lo contrario, quizás debido a su mezcla con los micronizados de mármol.

SUSCEPTIBILIDAD AL BIODETERIORO POR MICROALGAS

La susceptibilidad al ataque microbiológico de las resinas sintéticas es un tema de estudio que se ha desarrollado paralelamente a la profusión del uso de estos materiales en todos los campos de la tecnología y la ciencia, principalmente en aplicaciones industriales (Powers *et al.*, 1979; Stoken y Cobian, 1982; Ait-Langomazino *et al.*, 1991; Williams y Zhong, 1994; Gu y Mitchell, 1996; Itavaara y Vikman, 1995; Pinchuk *et al.*, 2004; Rashmi *et al.*, 2004). A este respecto, llama la atención la situación paradójica que se está creando en relación con este tipo de materiales, ya que las investigaciones se dirigen, por una parte, a encontrar formulaciones de polímeros cada vez más resistentes y duraderos, pero por otro lado el objetivo es conseguir resinas fácilmente biodegradables, para no dañar el equilibrio medioambiental (Cappitelli *et al.*, 2004).

En el ámbito de la conservación de obras de arte en general, las investigaciones se dirigen especialmente a obtener productos resistentes al biodeterioro (Nugari y Priori, 1985; Koestler y Santoro, 1988; Tiano *et al.*, 2000). Aunque todas las tipologías artísticas se benefician de estos

trabajos, son los monumentos pétreos los que mayor atención reciben. Entre las publicaciones relacionadas con este tema, cabe citar las de Accardo *et al.* (1981), Charola *et al.* (1986), Salvadori y Nugari (1988), Selwitz (1992), o Melo *et al.* (1999), entre otras.

La bibliografía existente sugiere que las resinas sintéticas no son, en términos generales, menos susceptibles de sufrir deterioro biológico que los materiales tradicionales, aunque las conclusiones de los distintos autores al respecto son muy heterogéneas. Domaslowski y Strzelczyk (1986) señalan que el empleo de resinas epoxídicas en restauración puede favorecer el desarrollo de comunidades de microorganismos, aunque aclaran que quizás sea debido a la presencia de aditivos en la resina, más que al polímero en sí mismo. Koestler (2000) concluye que los aditivos son los principales desencadenantes de la colonización biológica; Cappitelli *et al.* (2004) también subrayan, en relación con la susceptibilidad al biodeterioro, la importancia del proceso de elaboración de los materiales sintéticos, y proponen la adición de biocidas en las formulaciones de resinas como un preventivo. Sin embargo otros autores, como Pankhurst *et al.* (1972), Favali *et al.* (1978), Nugari y Priori (1985), o Sorlini *et al.* (1991) inoculan varios tipos de microorganismos a distintas resinas sintéticas, y encuentran que aquellos no son capaces de alimentarse de las resinas, con lo cual su desarrollo sobre ellas, cuando lo hay, podría ser debido a la presencia de nutrientes provenientes de grietas o fisuras, pero no de las propias resinas.

En el presente trabajo, el experimento realizado para estudiar la susceptibilidad de ser colonizados por microalgas de los distintos substratos considerados en un principio (esto es, incluyendo aquéllos compuestos de resina epoxi, puesto que aun no se conocía su comportamiento negativo en términos de estabilidad cromática), demostró que, pese a que después de un cierto período (18 semanas) habían sido colonizadas las probetas de todos los materiales, el proceso de colonización fue mucho más rápido en las probetas de los morteros artificiales, siendo las piedras naturales sobre las que más lentamente se desarrollaron las comunidades de microalgas (figs. 2.3.1a y b). En el estudio citado de Nugari y Priori (1985), aunque las resinas examinadas (Paraloid b72 y Primal AC33, dos resinas acrílicas muy comunes en

restauración de obras de arte) fueron colonizadas por hongos y bacterias, el proceso fue notablemente más lento que sobre otros sustratos naturales. Salvadori y Nugari (1988) experimentan con hongos sobre probetas de polímeros y mármol natural de Carrara, pero no encuentran diferencias significativas entre ambos sustratos. Koestler y Santoro (1988) hacen pruebas, también con hongos, sobre distintas resinas acrílicas y de silicona, y concluyen que ninguno de los sustratos analizados presentó un comportamiento tipificable. No obstante, Cappitelli *et al.* (2004) sostienen que las resinas de tipo acrílico son más resistentes al biodeterioro que las de tipo polivinílico y las alquídicas, aunque insisten en la necesidad de establecer unas pautas comunes de análisis, ya que cualquier cambio en la metodología afectaría a los resultados obtenidos.

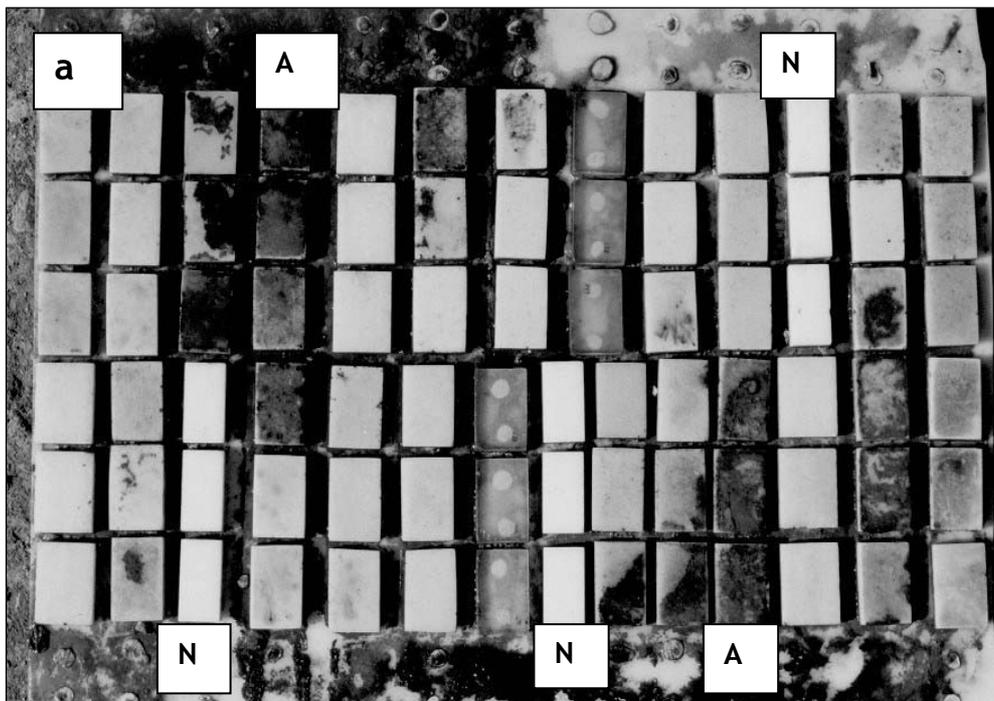


Fig. 2.3.1a- En esta etapa del experimento se observa que en algunas probetas de morteros artificiales (indicadas con una 'A') la colonización comienza antes que en las de mármoles naturales (marcados un una 'N').

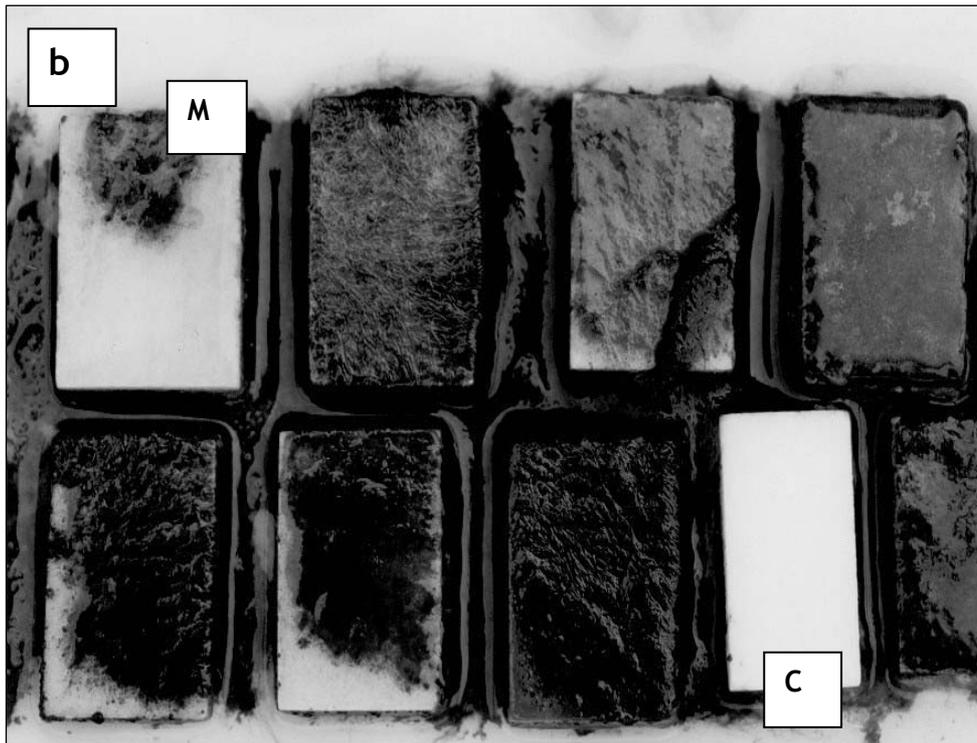


Fig. 2.3.1b- En un momento posterior se ve claramente cómo las rocas naturales (mármol de Macael ('M'), arriba a la izquierda, y de Carrara ('C'), abajo a la derecha) permanecen casi sin colonizar.

En el caso de este estudio sería preciso realizar un nuevo experimento, con distintas mezclas especialmente diseñadas, para evaluar la influencia de la composición y el proceso de elaboración de los materiales en la resistencia a la colonización algal, ya que las probetas aquí analizadas fueron elaboradas todas de la misma manera, sin variaciones en la formulación, lo que no permite extraer conclusiones en este sentido.

MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS

Por lo que atañe a las microalgas identificadas sobre las probetas, en todos los casos se verificó que las primeras especies en aparecer son mayoritariamente del género *Gomphonema*. Aunque es un género que también se identificó en las muestras tomadas en las distintas fuentes estudiadas, su proporción entonces era mucho menor que en este experimento. En procesos de biodeterioro de fuentes monumentales, las algas son los organismos pioneros en colonizar (Tiano *et al.*, 1993); dentro del vasto elenco de clases y géneros que están incluidas dentro de la denominación de algas, son las diatomeas bénticas las que inician los procesos de colonización de un sustrato, tanto si éste es natural como si es artificial (Wetherbee *et al.*, 1998). Las del género *Gomphonema* son pioneras en la colonización formando pústulas globosas, que pueden llegar a tener varios centímetros de diámetro (Sánchez Castillo y Bolívar, 1997). Son diatomeas con rafe, y se caracterizan por producir gran cantidad de compuestos de polisacáridos (Lee, 1989), que favorecen o inducen la adhesión de la célula al sustrato. Aunque éste es un proceso fácilmente reversible en las primeras etapas, normalmente las células se fijan con firmeza al sustrato. No se conoce este fenómeno con profundidad y no se sabe cuál es el papel concreto de cada elemento en el fenómeno de adhesión, pero parece que los compuestos excretados por *Gomphonema* spp, entre otras diatomeas, una vez que la célula está fijada al sustrato, actúan como núcleo de precipitación de carbonatos (Golubic, 1987). Esto significa que estas diatomeas intervienen en la formación de estromatolitos, lo cual, sumado a la materia inorgánica proveniente del frústulo que se va depositando tras la muerte de las células, supone que generan un medio idóneo para el desarrollo de otras especies de algas.

Si bien las especies de *Gomphonema* son las que aparecen más frecuentemente como pioneras en este caso, se encontraron también otras especies de diatomeas en los primeros estadios de colonización, tales como especies de los géneros *Nitzschia*, *Navicula* o *Cymbella*. Aunque según Golubic (1987), *Gomphonema* spp son las que más intensamente intervienen en la precipitación, estas otras especies

también favorecen el fenómeno. Todas ellas son habituales en monumentos pétreos (Bolívar Galiano, 1994; Tiano *et al.*, 1995), y no representan una causa de alteración directa para el sustrato. No obstante, su presencia puede favorecer la colonización secundaria y activar otros mecanismos de biodeterioro (Ascaso *et al.*, 1998; Cappitelli *et al.*, 2004).

En los meses siguientes se observó cómo la proporción de diatomeas presentes en las probetas fue decreciendo paulatinamente, dejando paso a comunidades de algas verdes, tanto filamentosas como cocoides, sarcinoideas y otras. Entre las especies filamentosas destacan por su abundancia *Ulothrix* spp, seguidas de *Oedogonium* spp, ambas algas de filamentos largos sin vaina, no ramificados, habituales en ambientes anfibios, donde llegan a formar tapetes fibrosos (Bolívar Galiano, 1994). Son géneros que también se identificaron en las muestras provenientes de las fuentes de la Alhambra y los Reales Alcázares. En la bibliografía, sin embargo, estos géneros no aparecen citados con frecuencia, y sólo de forma ocasional se han encontrado ejemplos donde se mencione su presencia (en Caneva *et al.*, 1992, figura la identificación de una especie de *Ulothrix* en un monumento de mármol; en Tiano *et al.*, 1995, también se menciona su presencia en fuentes monumentales). Esto se justifica por el hecho de que, en condiciones de humedad baja o muy alta, estas algas son más débiles que otras (como algunas algas verdes unicelulares, o muchas cianofíceas), por lo que se verían desplazadas por ellas. Además, en los monumentos, las intervenciones de limpieza las eliminan fácilmente, por lo que es infrecuente encontrarlas en esos ambientes. El hecho de que fueran tan abundantes en las probetas dispuestas en este experimento es fruto de las condiciones que se dieron, sin duda propicias para su desarrollo.

En menor medida se identificaron otras algas verdes filamentosas, como *Gongrosira* sp, que se distingue de las anteriores en que constituyen estructuras pseudo-parenquimáticas, formadas por filamentos cortos. Se encontraron también algas verdes unicelulares de varios géneros, como *Apatococcus*, *Tetracystis* y *Chlorococcum*; son algas que viven agrupadas en agregados más o menos irregulares, muy frecuentes en monumentos pétreos (Bolívar Galiano, 1994; Tomaselli *et al.*, 2000-b). Estas microalgas

fueron las que se identificaron en las últimas etapas del experimento. Debido al enfoque del mismo, más centrado en la rapidez y desarrollo de la colonización que en las biocenosis generadas, el tiempo de su duración fue demasiado breve para que las colonias aparecidas formaran otro tipo de estructuras más avanzadas, como tapetes mineralizados y estromatolitos. Aún así, en el momento de la retirada del dispositivo experimental se observó una incipiente mineralización.

PARTE III

INTERACCIONES ENTRE MICROALGAS Y MATERIALES PÉTREOS: ESTUDIO DE SUPERFICIES

III.I. MATERIALES Y MÉTODOS

El hecho de que en el presente trabajo la colonización algal sobre los morteros artificiales se desarrollara con una velocidad sensiblemente mayor que sobre las probetas de mármoles naturales (véase Parte II, Resultados y Discusión), condujo a considerar la cuestión desde el punto de vista de las cualidades físicas superficiales de las probetas, más allá de su composición química, y las de los microorganismos.

Se estudiaron las propiedades superficiales de los distintos materiales pétreos considerados, así como las de algunas especies representativas de microalgas. Este análisis permitió también conocer la relación existente entre ambas partes, sustrato y microalga, en términos de adhesión. Se escogieron dos métodos para estos fines: la medida de ángulos de contacto de ciertos líquidos sobre las superficies a estudiar, y la evaluación de la afinidad de los microorganismos a medios de distintas cualidades.

PLANTEAMIENTOS TEÓRICOS

Como se expuso anteriormente, el problema de la adhesión se interpreta actualmente desde dos puntos de vista: el termodinámico y el de las teorías de DLVO.

La teoría termodinámica es fundamental para interpretar los fenómenos relacionados con la adhesión microbiana y la formación de biofilms (Strevett y Chen, 2003). Desde este punto de vista, cuando una microalga que se encuentra inmersa en agua está a punto de entrar en contacto con un sustrato sólido, las superficies se consideran físicamente unidas en un equilibrio termodinámico, que puede alterarse; se entiende, pues, que la adhesión se considera reversible. Si se presupone que la distancia que separa a las dos partes es virtualmente igual a cero, las dos zonas de contacto que existían en cada uno de los sistemas sustrato-agua y agua-cuerpo (en el caso de las microalgas), se convierten en tres de un solo sistema: sustrato-agua-cuerpo. En la interfase se producen una serie de interacciones diversas, interpretadas a principios del siglo XIX por Young y Laplace (Wege, 2002). Estas interacciones se pueden describir en términos de densidades superficiales de energías libres interfaciales γ (Busscher, 1985; Boonaert *et al.*, 2002):

$$\Delta G_{adh} = \gamma_{MS} - \gamma_{ML} - \gamma_{SL} \quad (\text{ec. I})$$

donde ΔG_{adh} es la variación por unidad de área de la energía libre total del sistema, que determinará la adhesión; M corresponde a las microalgas (que constituyen el cuerpo adherido en este caso), S al sustrato y L al fluido entre ellos, que en condiciones normales es agua.

El sistema antes descrito, como cualquier otro, tiende a alcanzar el equilibrio, o sea, evoluciona hacia estados de mínima energía. Entonces, y según la expresión anterior, si la variación de energía libre fuera menor de cero, es decir, si la energía en el proceso disminuyera, la tendencia de los microorganismos sería a adherirse al sustrato para estabilizar el sistema. Por tanto, conocer el valor de ΔG para un determinado sistema permitirá prever el comportamiento de los microorganismos respecto al sustrato.

La variación de energía libre, si las condiciones de temperatura y presión son constantes, y si el volumen de los cuerpos implicados es estable, se relaciona con el trabajo de adhesión mediante la siguiente expresión (Pedri, 2002) :

$$\Delta G = - W_{SML} \quad (\text{ec. II})$$

donde W es el trabajo de adhesión entre el sustrato (S) y el microorganismo (M) en medio acuoso (L).

Mediante la medida del ángulo de contacto de un líquido sobre las dos superficies implicadas en el sistema (es decir, el sustrato sólido y los microorganismos) puede conocerse el valor de este parámetro.

Medida de ángulos de contacto.

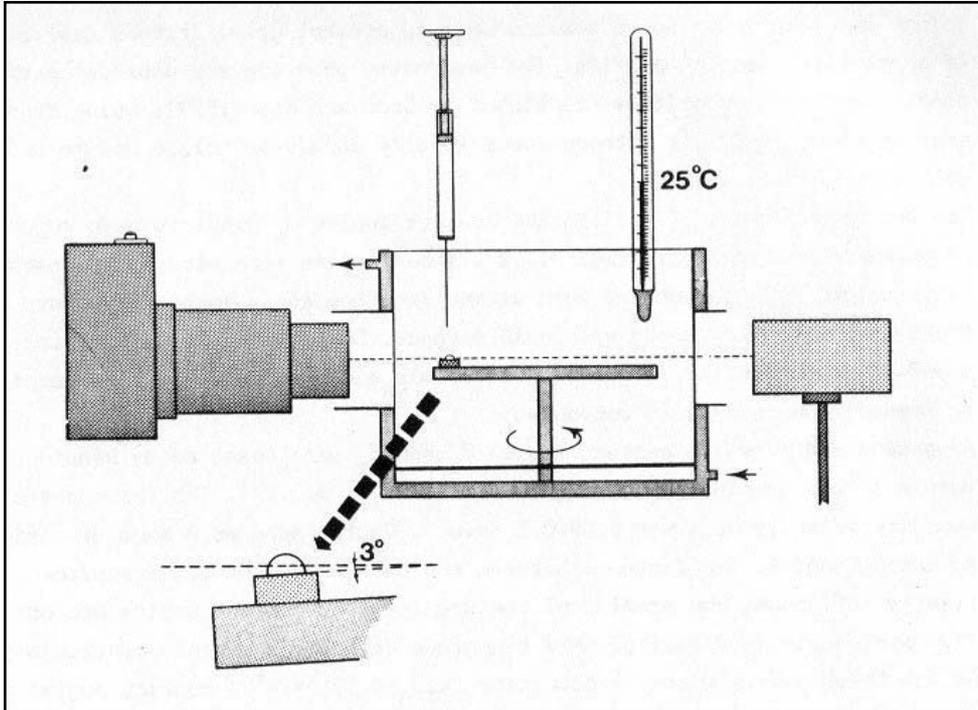
El ángulo de contacto (fig. 3.1.1) es una magnitud macroscópica, accesible experimentalmente mediante el uso de un goniómetro. El mecanismo óptico del goniómetro es similar al de un microscopio, y ofrece una imagen invertida. Mediante distintas ruedas se puede modificar la posición de la pieza (vertical y horizontal), de la jeringa que contiene el líquido, y del visor. En el visor aparecen dos líneas de guía: una horizontal, ligeramente móvil, que debe nivelarse con la superficie de la muestra, y otra totalmente móvil que, tangente a la gota que se deposita sobre la muestra, da el valor del ángulo de contacto (fig. 3.1.2).

La magnitud queda definida sólo en el caso de que la superficie a estudiar sea sólida y forme un único plano homogéneo y rígido. El parámetro, al menos teóricamente, está bien definido, aunque su aproximación en términos experimentales resulte dificultosa (Busscher, 1985).

Fig.3.1.1- Esquema del ángulo Φ que forma un líquido al entrar contacto con la superficie de un sólido.



Fig. 3.1.2- Esquema de funcionamiento de un goniómetro (tomado de Busscher, 1985).



La siguiente expresión relaciona el valor del ángulo de contacto de un líquido sobre una superficie y el trabajo de adhesión (Pedri, 2002):

$$W_{SML} = \frac{1}{2} \gamma_L (1 - \cos \Phi_S) (1 - \cos \Phi_M) \quad (\text{ec. III})$$

donde γ_L es la energía superficial del líquido, Φ_S es el valor del ángulo de contacto del líquido sobre el sustrato, y Φ_M el del ángulo sobre los microorganismos.

La medida de ángulos de contacto sobre las diferentes superficies, entonces, hace posible describir las interacciones que se dan entre ellas.

Sin embargo, aunque de esta forma se obtiene una descripción global del fenómeno, con este procedimiento no se pueden conocer con detalle qué componentes de estas interacciones tienen protagonismo. Como se expuso anteriormente, en un proceso de adhesión están presentes una serie de fuerzas (de Lifshitz - van der Waals, electrostáticas, ácido-base) que intervienen en su desarrollo. Conociendo la variación de la energía total del sistema se tiene acceso a una información general, sin desglosar.

La ecuación IV ofrece la relación que existe entre la energía libre total de una superficie (γ) y algunas de las fuerzas que la componen:

$$\gamma = \gamma^{LW} + \gamma^+ + \gamma^- \quad (\text{ec. IV})$$

El superíndice ^(LW) indica que se trata de la componente Lifshitz- van der Waals de γ , mientras que ⁽⁺⁾ y ⁽⁻⁾ se refieren a las componentes ácido-base (González-Caballero y García López-Durán, 2000). Esta expresión no recoge la influencia de otras componentes en la γ global, como las fuerzas de atracción y repulsión electrostáticas, que para algunos autores es muy significativa en los fenómenos de adhesión (Boonaert *et al.*, 2002). No obstante, permite conocer con mayor detalle los condicionantes de estos fenómenos, ya que la descripción de las propiedades de cada superficie implicada es más profunda. Esta información es muy valiosa a la hora de interpretar el desarrollo de la adhesión. Mediante la medida de ángulos de contacto se puede acceder experimentalmente a estos datos.

La expresión termodinámica que describe la relación entre el ángulo de contacto y las distintas componentes de la energía libre superficial viene dada por esta variante de la ecuación de Young (en van Oss, 1994):

$$(1 + \cos \Phi) \gamma_L = 2(\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_L^+}) \quad (\text{ec. V})$$

donde Φ es el ángulo de contacto, γ_L representa la energía superficial del líquido empleado, y, en el miembro derecho de la expresión, cada γ_L supone una parte de la energía superficial total del líquido, y cada γ_s , una componente de la energía superficial del sólido (ec. IV).

Conociendo de antemano las características de ciertos líquidos (γ_L y sus tres componentes), si se emplean tres líquidos diferentes se conforma un sistema de tres ecuaciones con tres incógnitas, que serían las tres componentes γ del sólido, ya que el valor de Φ se obtiene por mediciones. De este modo, además del valor de la energía libre total de la superficie, se pueden conocer los valores de las interacciones de polaridad (sensu Lewis, como interacciones de tipo ácido-base) y de fuerzas no polares (de van der Waals, sensu Lifshitz).

Los líquidos se escogen en función de ciertas características que deben cumplir: dos de ellos deben ser polares y uno no polar. Habitualmente se emplean agua y formamida como polares, y di-yodometano como no polar. Como alternativa se pueden emplear líquidos como el etilen-glicol, el glicerol, etc., entre los polares, y el α -bromonaftaleno entre los no polares (Busscher, 1995). La cantidad de líquido que se deja caer sobre la superficies se puede regular con precisión mediante un dosificador acoplado a la aguja de una jeringa (fig. 3.1.3). Para cada líquido se dispone de una jeringa diferente.

La aplicabilidad de este método de análisis queda limitada por las características de los líquidos a emplear, ya que algunos pueden resultar agresivos con la superficie a estudiar, especialmente si se trata de superficies de naturaleza biológica (Pembrey *et al.*, 1999). En este trabajo, en el que se planteó el objetivo de conocer las cualidades superficiales de los sustratos pétreos y las microalgas, el caso de las microalgas exigió hacer ciertas consideraciones: líquidos como la formamida, el α -bromonaftaleno o el di-yodometano alterarían sin duda sus cualidades, de modo que se optó por realizar las mediciones sobre ellas empleando únicamente agua, y emplear tres líquidos, entre ellos el agua, para estudiar los sustratos pétreos.

Esta simplificación del método es muy habitual en el estudio de microorganismos (Busscher *et al.*, 1984-b; Ahimou *et al.*, 2001; van der Mei *et al.*, 2002). Aunque implica no conocer el valor de las distintas componentes de γ que actúan en el proceso, al disponer de datos referentes a las mediciones de ángulos de contacto del agua tanto en el caso de los sustratos como en el de las microalgas, se puede conocer el trabajo de adhesión de los microorganismos sobre los sustratos (ec. III), y

a partir de él, la variación de la energía del sistema (ec. II). Para el agua, el valor de γ , factor presente en la ecuación III, es 72.8 mJ/m^2 (Pedri, 2002); conociendo este dato, la resolución de la ecuación es rápida.



Fig. 3.1.3- Llenado de una jeringa con formamida.

Por otra parte, el empleo del agua permite conocer la hidrofobicidad de las células y de los distintos materiales pétreos en términos cualitativos.

La hidrofobicidad es una propiedad que repercute enormemente en los fenómenos de adhesión (Rönnner *et al.*, 1990; Busscher *et al.*, 1995). Por ello, teniendo en cuenta que la medida de ángulos de contacto es un método que no aparece citado para el análisis de microalgas en la bibliografía consultada, en este trabajo se decidió poner en práctica, como complemento, otro método de estudio que sí ha sido empleado

sobre estos microorganismos, aunque sea en contadas ocasiones (Fattom y Shilo, 1984; Lamenti *et al.*, 2000; Tomaselli *et al.*, 2000-b): el análisis de adhesión de microorganismos a hidrocarburos.

Adhesión de microorganismos a hidrocarburos.

Este método, comúnmente llamado MATH (acrónimo de *Microbial Adhesion to Hydrocarbons*) o BATH (*Bacterial Adhesion to Hydrocarbons*, lo que hace patente que su aplicación más generalizada es el estudio de bacterias), fue propuesto por Rosenberg y sus colaboradores en 1980. Está pensado para conocer, de forma cualitativa, la hidrofobicidad de un grupo de células frente a un disolvente orgánico, apolar.

El fundamento del MATH es el siguiente: a una suspensión acuosa de microorganismos se añade una cantidad de disolvente apolar, inmisible; evaluando la proporción de microorganismos que, por afinidad, se desplazan a una u otra fase, se puede caracterizar la hidrofobicidad de las células. Para ello se realiza una prueba de espectrometría de absorción en el visible. El fundamento de este tipo de análisis es el siguiente: cuando un haz de radiaciones electromagnéticas incide en un cuerpo y lo atraviesa, la radiación transmitida suele disminuir de intensidad para ciertas longitudes de onda (λ) respecto a la radiación inicial. Esto se debe a que los electrones presentes en los enlaces de la sustancia captan energía de la radiación, dependiendo de la naturaleza de los enlaces y los átomos implicados. Si el espectro de la radiación incidente es continuo y se conoce, puede conocerse también la fracción absorbida por la sustancia, obteniendo así su espectro de absorción. Este espectro, entonces, permitirá caracterizar la sustancia.

Como se aprecia, este método aborda la influencia de las interacciones electrostáticas en los fenómenos relacionados con la adhesión, lo que no ocurre en el caso de la medida de ángulos de contacto. Desde el punto de vista del grupo de Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek (normalmente citado como DLVO), las fuerzas de repulsión o atracción de naturaleza electrostática son protagonistas en la adhesión microbiana, junto con las fuerzas de atracción de Lifshitz - van der Waals, de modo que el fenómeno puede explicarse esencialmente como un

balance entre estas (Bos *et al.*, 1999). Aproximaciones experimentales como la medición del potencial zeta de las superficies implicadas ofrecen información sobre las interacciones electrostáticas, pero este análisis resulta insuficiente por sí solo (van Oss *et al.*, 1986; Speranza *et al.*, 2004): es necesario incluir en el estudio las interacciones ácido-base o de Lewis. La consideración de las fuerzas de Lewis permite tener en cuenta las interacciones originadas por distintas polaridades en medio acuoso y las interacciones de hidrofobicidad. Este punto de vista resulta muy apropiado para investigar la colonización de un sustrato por parte de microalgas, puesto que el proceso tiene lugar normalmente en medio acuoso. En este sentido, el método de adhesión a hidrocarburos parece ajustarse a las necesidades de este trabajo.

SUSTRATOS PÉTREOS ESTUDIADOS

Los sustratos pétreos empleados para este estudio fueron de varios tipos. Para una primera fase experimental las mediciones se realizaron sobre probetas de la misma naturaleza que las empleadas en la segunda parte de este trabajo. Sin embargo, la medida de los ángulos de contacto con las superficies de los mármoles naturales resultó problemática, puesto que estas muestras, al ser de origen natural, presentan cristales de tamaño excesivamente grande, lo que influye en el ángulo: la distinta composición de los cristales afecta de diferente manera al líquido, que produce gotas de muy distintos ángulos de contacto (Busscher, 1985). Este problema condujo a la elaboración de comprimidos a partir de polvo de estos materiales, para realizar las medidas sobre ellos.

Los comprimidos se elaboraron en una máquina que consiste, básicamente, en un cilindro metálico, donde se deposita el polvo a prensar, sobre el que se aplica un peso determinado. El peso aplicado fue en este caso de 8 toneladas, y durante un tiempo de 10 minutos, lo que permitió obtener el grado de compactación adecuado. Es importante subrayar que todos los elementos del aparato que entraron en contacto con el material a comprimir estaban escrupulosamente limpios, con el fin de evitar posteriores interacciones a la hora de realizar las medidas de los ángulos.

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, algunos autores subrayan la importancia de la rugosidad superficial en el desarrollo de microorganismos fotosintéticos sobre un sustrato (Tomaselli *et al.*, 2000-b), concluyendo que en superficies porosas e irregulares aumenta la susceptibilidad a la colonización, y que este factor, de hecho, resulta más determinante que la propia composición del sustrato a la hora de promover el desarrollo de comunidades algales. Por este motivo se decidió en esta investigación realizar un estudio de las cualidades superficiales de sustratos artificiales de composición alterada, con el fin de contrastarlas con las de los sustratos empleados en las pruebas de colonización biológica. Las mezclas preparadas con este fin no respetan las proporciones de árido/resina que se consideran idóneas, de modo que no están pensadas para su uso como material de intervención en restauración o réplicas de obras de arte, sino tan sólo como material experimental, ya que su composición no permite garantizar un buen comportamiento.

Para esta segunda fase del estudio se emplearon nuevos morteros, de MP, MG, CP y CG, con variaciones en la composición. Se abandonó el uso de la resina epoxídica, por no poder considerarse apta para su empleo como material de intervención en restauración y reintegración de obras de arte. El tamaño de grano de los micronizados de mármol se redujo, moliendo el material en un molino de bolas, hasta las 100 micras. Se prepararon dos morteros diferentes de cada pareja de mármol y resina, uno manteniendo la proporción 1:1 y otro de 4:1 (80% de aglutinante y 20% de carga inerte). De cada uno de estos morteros se realizaron 3 probetas, lo que supone un total de 12 probetas. Para su realización no se emplearon moldes, sino que los morteros preparados se vertieron sobre placas porta-objetos de vidrio. La superficie de las probetas se limpió de igual forma que las anteriores, pero en este caso no se lijaron.

MICROALGAS ESTUDIADAS

Las especies de microalgas cultivadas para realizar estas pruebas fueron las siguientes: *Symploca elegans*, *Stichococcus bacillaris*, *Chlorella* sp, *Tetracystis* sp y *Planophila* sp.

Symploca elegans es una cianobacteria filamentosa de la familia de las Oscilatoriáceas (fig. 3.1.4a). El género *Symploca* es muy similar a *Phormidium* y *Lyngbya*, de los que se distingue porque los filamentos se desarrollan formando mechones, mientras que los filamentos de *Phormidium* se disponen libremente, y los de *Lyngbya* se agrupan en haces más o menos ordenados. No obstante, estas diferencias llevan a distintas clasificaciones según las referencias bibliográficas, apareciendo a veces una misma especie bajo distintos géneros. En las fuentes estudiadas se encontraron numerosas especies de los géneros *Symploca* y *Phormidium*. La especie *elegans* es una de las más comunes del género *Symploca*.

Stichococcus bacillaris es una especie de alga verde de la familia de las Ulothricáceas, familia que incluye a todas las clorofíceas filamentosas simples, es decir, de filamentos no ramificados. En el caso de esta especie, sobre todo en cultivos jóvenes, raramente se forman filamentos propiamente dichos, siendo más frecuente que las células aparezcan desunidas, acaso constituyendo pequeñas cadenas de tres o cuatro células (fig. 3.1.4b). *Stichococcus* es un género cercano a *Ulothrix*; en las fuentes monumentales estudiadas aparecieron varias especies de ambos géneros, aunque *Ulothrix* fue más abundante. Sin embargo, debido a las características de las pruebas que se plantearon en esta parte de la investigación, se optó por aislar una especie de *Stichococcus*, y no de *Ulothrix*, ya que la forma filamentosa de estas últimas dificultaría la realización de dichas pruebas. La especie *Stichococcus bacillaris* es muy habitual en aguas dulces.

Chlorella sp es un alga verde unicelular, cocoide y de pequeño tamaño. El género *Chlorella* pertenece a la familia de las Oocistáceas; comprende más de 30 especies, y es muy común en aguas dulces. Por este motivo, y porque resulta muy fácil de cultivar, se emplea a menudo en distintos ámbitos de investigación en ficología.

Tetracystis sp es también un alga verde cocoide (fig. 3.1.4d), perteneciente a la familia de las Chlorococáceas, que incluye otros

géneros identificados en este trabajo, como *Chlorococcum*, con la que guarda muchas similitudes. Las Chlorococáceas son algas que viven de forma aislada o en grupos irregulares. En el género *Tetracystis* las células se encuentran aisladas o agrupadas en múltiplos de 2 ó 4; la formación de tétradas, junto con la división celular vegetativa, son los caracteres que lo diferencian de *Chlorococcum* (Bourrely, 1972).

La última especie cultivada es *Planophila sp*, otra clorofícea cocoide (fig. 3.1.4e), en este caso de la familia de las Chlorosarcináceas, a la que pertenecen también los géneros *Chlorosarcina* y *Chlorosarcinopsis*, y con la que guarda muchas similitudes *Apatococcus*. Son algas que se desarrollan formando paquetes, agrupadas mediante polímeros extracelulares. La peculiaridad más llamativa del género *Planophila* es que las células a menudo presentan dos o tres pirenoides.

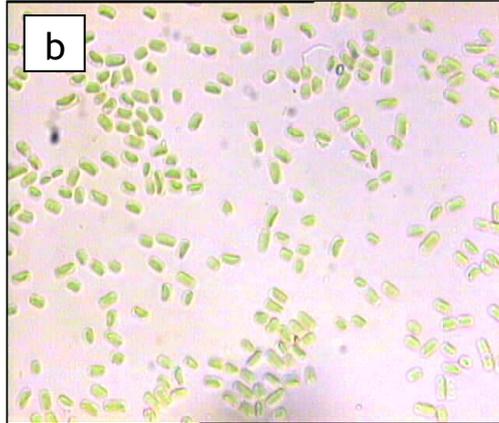
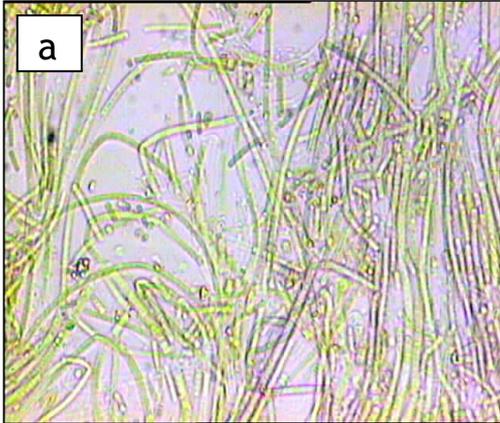
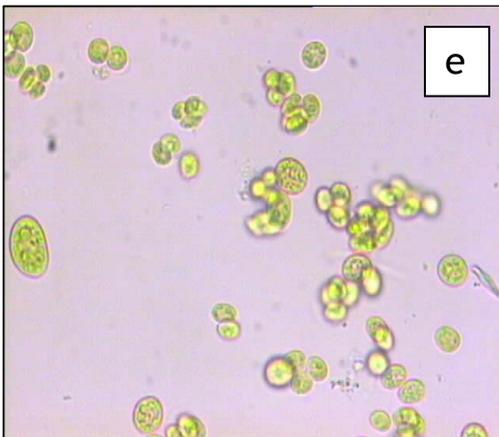
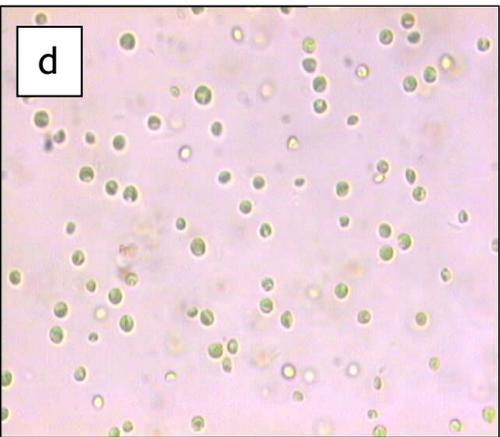


Fig. 3.1.4- a) Filamentos de *Symploca elegans*; b) *Stichococcus bacillaris*; c) *Chlorella* sp; d) *Tetracystis* sp; y e) *Planophila* sp. Todas las fotos están tomadas a 40 aumentos.



PROTOSCOLOS DE TRABAJO

En este trabajo, como se ha explicado, se emplearon dos métodos de análisis diferentes: la medida de ángulos de contacto y la adhesión de microorganismos a hidrocarburos.

Para efectuar las medidas de ángulos de contacto se adoptaron dos protocolos diferentes, en función de la superficie a estudiar. El primero de ellos, aplicado al análisis de las superficies de las probetas pétreas, implica el empleo de tres líquidos de características conocidas: agua, formamida y di- yodometano.

Para estudiar las microalgas, en cambio, se siguió un segundo protocolo, empleando únicamente agua.

Por último, el método de MATH se desarrolló según una modificación del protocolo estándar de Rosenberg *et al.* (1980)

Medida de ángulos de contacto sobre sustratos pétreos.

La ejecución del método exige que las superficies a estudiar estén impolutas, ya que cualquier depósito extraño sobre ellas podría interferir en los resultados (Speranza *et al.*, 2004). Por ello, las probetas de los distintos sustratos pétreos, en todos los casos, fueron lavadas minuciosamente en acetona y sometidas a ultrasonidos durante 2 min para garantizar la regularidad de la superficie a examinar y asegurar así la fiabilidad de los resultados. Después de esta operación, se aclararon en agua destilada. Se dejaron secar a temperatura ambiente en un lugar libre de contaminación; para completar el secado se metieron en un horno a 40° durante dos horas. Se conservaron en una campana desecadora hasta el momento de realizar las medidas.

Los datos de las distintas mediciones realizadas se introdujeron en un programa informático diseñado a propósito para resolver forma automática el sistema de tres ecuaciones que permite conocer los valores de las distintas componentes de γ .

Medida de ángulos de contacto sobre microalgas.

El segundo método seguido es, como se expuso, una simplificación del anterior, y se realiza empleando únicamente agua para tomar las medidas. La metodología desarrollada se tomó de la expuesta por Busscher *et al.* (1984-b), aunque en su trabajo la medida de ángulos de contacto se aplicó a cultivos de distintas bacterias. Las diferencias de tamaño y forma celular entre esos microorganismos y los que consideramos nosotros llevaron a realizar ciertas modificaciones en el procedimiento a seguir.

Las microalgas empleadas fueron cultivadas en laboratorio, para poder trabajar con comunidades mono-algales aisladas y poder obtener datos “limpios”. Para ello se sembraron directamente en placas de Petri muestras provenientes de varias de las fuentes estudiadas. El medio de cultivo empleado fue BG-11 para las cianofíceas, y BBM para las algas verdes, ambos consolidados con Agar, según el protocolo descrito en González *et al.* (1995).

A partir de los primeros cultivos se seleccionaron cepas que se sembraron, en función del tipo de alga, en nuevas placas de Petri o en placas de pocillos, con BG-11 o BBM líquidos en este caso (fig. 3.1.5a). Tanto las placas de Petri como las de pocillos se sellaron con cinta Parafilm para evitar la contaminación de los cultivos. Tras 2 semanas de observación y resiembra fueron aisladas ciertas especies, que se inyectaron en frascos y, posteriormente, en Erlenmeyer con medio de cultivo líquido (fig. 3.1.5b). Para facilitar e incrementar su proliferación, se conectó un motor que proporciona aire a cada Erlenmeyer. Todos los cultivos se conservaron durante el tiempo de aislamiento y experimentación en una cámara a 19°C y con un fotoperíodo de 14/8 h.



Figs. 3.1.5a y b- Cultivos en placas de pocillos y cultivos de microalgas aisladas en Erlenmeyer.



Figs. 3.1.6a y b- Dos momentos del proceso de filtrado.

Si en el caso de los materiales pétreos la superficie a estudiar constituía un sólido regular, como exige el método en cuestión, las microalgas, de forma natural, conforman comunidades, a menudo mixtas, de forma y perfil más o menos irregulares, incluso cuando generan películas o tapetes. Por ello fue preciso, para poder llevar a cabo la medición de ángulos de contacto, provocar la formación artificial de un plano homogéneo, tanto desde el punto de vista de su composición como de su superficie. Las suspensiones algales fueron filtradas a través de dos filtros distintos: a) una membrana de fibra de vidrio de 1 micra de diámetro de poro (Whatman), y b) un filtro de acetato de celulosa (ATTP) de 0.8 micras de diámetro de poro (fig. 3.1.6a y b).

Estas membranas se colocaron sobre placas de Petri recubiertas con una fina capa de Agar y glicerol (1% peso/volumen de Agar y 10% volumen/ volumen de glicerol) y se dejaron reposar durante 30 minutos, con el objeto de que se homogeneizara la humedad que contenían y obtener ángulos relativamente estables (fig. 3.1.7). Seguidamente se realizaron las medidas de ángulos sobre ellos (fig. 3.1.9). 30 minutos después se realizó una segunda medición. En el caso del cultivo de cianobacterias filamentosas, y debido a sus características, no se filtró la suspensión, sino que se colocó directamente una película algal natural sobre la placa de Petri preparada (fig. 3.1.8).

Tanto para el análisis de las probetas de materiales pétreos como para el de las películas algales, las medidas de los ángulos se tomaron con un goniómetro Olympus DGHM. En todos los casos, las medidas de ángulos de contacto se realizaron a 25°C y en condiciones de presión constante.



Fig. 3.1.7- Capa de microalgas filtradas.



Fig. 3.1.8- Película de *Symploca elegans*.

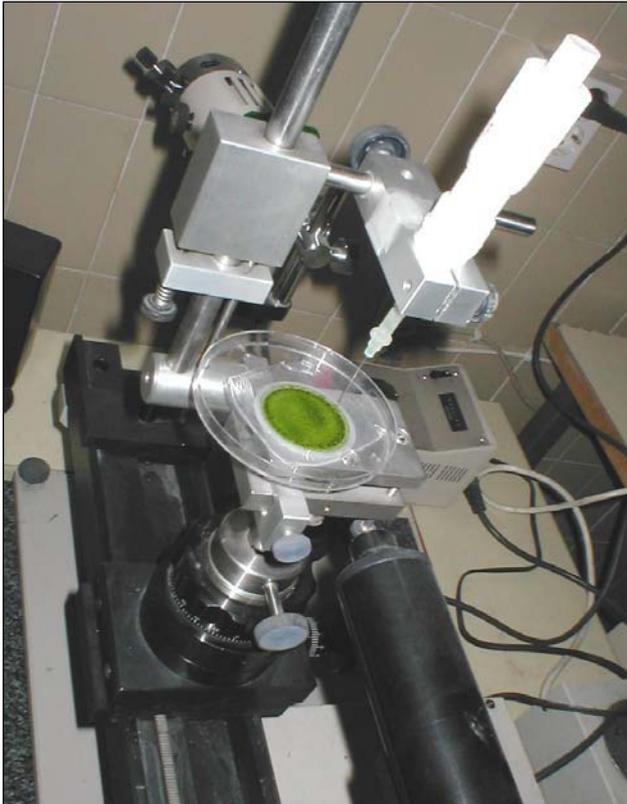


Fig. 3.1.9- Medición sobre una capa de algas verdes.

Adhesión de microorganismos a hidrocarburos.

El protocolo más comúnmente seguido para poner en práctica el MATH es el original de Rosenberg *et al.* (1980), empleado, entre otros, por Zhang y Miller (1994), Baldi *et al.* (1999), Ahimou *et al.* (2001) o Krepsky *et al.* (2003). En todos estos trabajos el método MATH se aplica al estudio de las propiedades de la pared celular de bacterias. Fattom y Shilo (1984) lo adaptan al estudio de cianobacterias filamentosas, muy similares a algunas de las identificadas en el presente trabajo. Un procedimiento similar siguen Lamenti *et al.* (2000) y Tomaselli *et al.* (2000-b). Sin embargo, aquí se realizará la prueba siguiendo, esencialmente, el protocolo más extendido, puesto que las ventajas de las modificaciones de Fattom y Shilo no son obvias, y su dificultad es mayor.

Las microalgas empleadas para esta prueba procedían de los mismos cultivos con que se realizaron las mediciones de ángulos de contacto (fig. 3.1.4), pero para esta prueba se excluyó el cultivo de *Symploca elegans* por problemas metodológicos (fig. 3.1.4a). En cada caso, se colocó un volumen determinado de cultivo en una cámara de sedimentación, y se esperó a que las células se posaran sobre un plano (alrededor de dos horas). Al microscopio, se contó el número de células por campo en varios campos y se calculó el número total teniendo en cuenta el aumento empleado. En el caso del cultivo de *Stichococcus bacillaris* (fig. 3.1.4b), cuando había filamentos, las células se contaron individualmente dentro de cada uno. Según la siguiente expresión, se calculó qué volumen de cultivo se necesitaba para obtener la proporción requerida:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ células}}{\text{n}^\circ \text{ campos}} \times \frac{\text{sup. cámara}}{\text{sup. campo}} \times \frac{1}{V \text{ muestra (ml)}} = \text{céls /ml}$$

El factor correspondiente a la relación entre la cámara de sedimentación y el campo observado se determinó en:

- 2793 para un aumento de 40X
- 18953 para un aumento de 100X

Rosenberg *et al.* (1980) y, a partir de su trabajo, muchos autores, emplean para su experimento una concentración de 10^8 células/ ml, pero en su estudio se analizan las propiedades de distintas bacterias, cuyo tamaño es menor que el de las células aquí estudiadas. Por este motivo se decidió realizar la prueba de MATH con dos suspensiones celulares distintas: a) una estándar con 10^8 células suspendidas en 3 ml de PBS (*phosphate buffer solution*), para poder comparar los resultados con los obtenidos en los trabajos citados; y b) otra modificada en función del tamaño medio de las células en cada uno de los cultivos estudiados, con diferentes cantidades de células en cada suspensión, para obtener el mismo volumen celular total.

Las medidas de absorbancia se realizaron a 600 nm, con un espectrofotómetro Spectronic 20 Genesys, que se calibró empleando solución de PBS como blanco. Para preparar las muestras de los cultivos se tomaron los volúmenes necesarios en cada caso. Cada suspensión se centrifugó durante 5 minutos para eliminar el medio de cultivo y así lavar las células. El sedimento obtenido se diluyó en PBS de la casa Sigma. Se midió la absorbancia de estas primeras suspensiones. Posteriormente se añadió tolueno puro, de la firma Merck, de forma que por cada 3 ml de suspensión se tuvieran 0.15 ml de tolueno. Se agitó enérgicamente durante 10 segundos hasta homogeneizar la emulsión resultante. Se dejó reposar 10 minutos para permitir que las fases se separaran. Se colocó el tubo en el espectrofotómetro y se realizaron las medidas.

III.II. RESULTADOS

MEDIDA DE ÁNGULOS DE CONTACTO

En la medida de los ángulos de contacto descritos por los distintos líquidos predeterminados sobre las superficies estudiadas, correspondientes a las probetas realizadas en la primera fase de este trabajo, se obtuvieron los resultados que están recopilados en la tabla 3.2.1, en la que se ofrece además el coeficiente de variación de Pearson (CVP) correspondiente a cada caso. El CVP se emplea para analizar y contrastar medias diferentes entre sí, e indica el tanto por ciento de dispersión existente entre un grupo de valores y su media aritmética; se calcula a partir de la media y de la desviación típica:

$$\text{CVP} = \frac{S}{|\bar{X}|} \times 100$$

donde S es la desviación típica y $|\bar{X}|$ es el valor absoluto de la media aritmética.

probeta	AGUA	CVP- agua	FORMAMIDA	CVP- formamida	DI- YODOMETANO	CVP- diyodom.
CG	67.82	4.75	29.55	8.9	20.86	8.68
CP	64.86	1.73	45.62	4.76	19.00	7.89
MG	68.08	5.24	24.40	6.64	17.89	7.15
MP	85.88	5.79	40.82	5.61	17.10	9.24
C	26.00*	4.69	35.63	9.82	33.50	7.58
M	31.66*	6.48	33.37	7.91	35.82	7.31

Tabla 3.2.1- Valores medios en grados de los ángulos de contacto de cada líquido sobre cada material de la 1ª fase experimental, y valor del CVP en cada caso. Los valores señalados con un asterisco corresponden a los obtenidos en las mediciones efectuadas sobre los comprimidos de polvo de mármol. Acrónimos de los sustratos: CG: mármol de Carrara con Gel-Coat, CP: Carrara con resina de poliéster, MG: Macael con Gel-Coat, MP: Macael con poliéster, C: mármol de Carrara, M: mármol de Macael.

La sustitución de las incógnitas de la ecuación V (en este mismo capítulo, Materiales y Métodos) por estos valores, permite obtener los valores de las distintas componentes de γ que corresponden a cada superficie. Los valores obtenidos tras realizar los cálculos necesarios se ofrecen en la tabla 3.2.2, expresados en mJ/m^2 :

probeta	γ LW	γ +	γ -	γ total
CG	47.525	1.4762	5.4770	53.212
CP	48.070	0.0011	14.643	48.326
MG	48.373	1.9869	4.2390	54.178
MP	48.579	1.3164	0.0180	48.888
C	42.712	0.0020	57.740	43.405
M	41.646	0.1388	49.060	46.866

Tabla 3.2.2- Valores en mJ/m^2 de las componentes γ y γ total en cada material de la 1ª fase experimental.

Se observa que en estas primeras probetas analizadas, correspondientes a los mármoles naturales y los morteros de micronizados de hasta 350 micras, los valores correspondientes a los substratos artificiales son ligeramente superiores a los de los naturales, posiblemente debido a las irregularidades de las superficies.

De la misma manera, los valores correspondientes a las medidas y cálculos realizados para las probetas de la segunda fase del estudio se detallan en las siguientes tablas (3.2.3 y 3.2.4).

probeta	AGUA	CVP-agua	FORMAMIDA	CVP-form.	DI-YODOMETANO	CVP-diyodom.
CG50%	74.42	1.87	42.00	4.76	36.30	5.92
CG80%	80.88	2.57	32.90	6.57	34.91	7.05
CP50%	68.00	1.82	52.77	4.7	31.72	5.20
CP80%	69.16	2.13	51.75	3.21	33.80	6.15
MG50%	67.70	2.60	47.00	2.83	30.40	5.13
MG80%	60.50	1.79	39.63	4.54	35.66	5.10
MP50%	67.00	3.27	57.36	4.13	31.51	4.38
MP80%	70.37	1.99	54.41	4.32	31.80	4.15

Tabla 3.2.3- Valores medios en grados, agrupados por tipo de mezcla, de los ángulos de contacto de cada líquido sobre cada material de la 2ª fase experimental. Acrónimos: CG: probeta de mármol de Carrara con resina Gel-Coat, CP: Carrara con resina de poliéster, MG: mármol de Macael con Gel-Coat, MP: Macael con poliéster. Los porcentajes 50% y 80% indican la proporción de resina que se añadió en la elaboración de cada grupo de probetas.

probeta	γ_{LW}	γ_{+}	γ_{-}	γ_{total}
CG50%	41.419	1.3427	4.1370	46.133
CG80%	42.067	3.7770	0.1676	43.658
CP50%	43.492	0.0067	15.157	44.133
CP80%	42.577	0.0138	13.114	43.428
MG50%	44.056	0.1095	12.079	46.356
MG80%	41.718	0.6226	15.973	48.026
MP50%	43.543	0.2707	19.748	48.167
MP80%	43.461	0.0172	13.433	44.423

Tabla 3.2.4- Valores en mJ/m^2 de las componentes de γ y γ_{total} en los materiales de la 2ª fase experimental.

De estas tablas se desprende que las medidas tomadas sobre las segundas probetas dan valores más bajos que las precedentes. No obstante, en todos los casos se observa que los valores de γ^+ son menores que los de γ^- , y que ambos son distintos de cero para todas las probetas. Los valores de la componente LW son mayores que los anteriores para todas las probetas, y mayores en las de materiales artificiales que en las de mármol natural.

En cuanto a los ángulos de contacto medidos sobre los depósitos algales, la tabla 3.2.5 muestra los resultados medios obtenidos, además del coeficiente de variación de Pearson para cada valor medio:

cultivo	Filtro A				Filtro B			
	30 minutos		1 hora		30 minutos		1 hora	
	media aritm.	CVP						
<i>Symploca elegans</i>	22.0*	6.43	19,5*	6.64	-	-	-	-
<i>Stichoc. bacillaris</i>	23.3	11.96	22,7	10.75	23.3	11.17	24,5	12.07
<i>Chlorella</i> sp	19.5	9.24	17,0	82.66	15.5	19.22	20,6	7.26
<i>Tetracystis</i> sp	24.9	6.49	24,7	87.91	26.8	12.33	25,7	4.77
<i>Planophila</i> sp	13.5	10.25	13,0	7.01	13.3	13.25	13,0	29.98

Tabla 3.2.5- Valores medios en grados de los ángulos medidos para cada cultivo, tras 30 minutos y tras 1 hora de secado, sobre los depósitos filtrados con el filtro de fibra de vidrio (A) y el filtro de acetato de celulosa (B). En cada caso se da el valor del CVP. Los valores señalados con un asterisco corresponden a la película algal del primer cultivo, sobre la que, directamente y sin filtrar, se efectuaron las mediciones.

A partir de estos valores se obtiene el valor de W_{SML} en cada caso, mediante la ecuación

$$W_{SML} = \frac{1}{2} \gamma_L (1 - \cos \Phi_S) (1 - \cos \Phi_M) \quad (\text{ec. III})$$

Como se mencionó anteriormente, el valor de γ_{AGUA} es 72.8 mJ/m^2 (Pedri, 2002). Una vez obtenidos los valores de los cosenos de los ángulos, la ecuación se resuelve fácilmente. A partir de W_{SML} se accede a ΔG :

$$\Delta G = - W_{SML} \quad (\text{ec.II})$$

Los valores de ΔG se detallan en la tabla 3.2.6:

probetas	cultivos				
	<i>Symploca elegans</i>	<i>Stichococcus bacillaris</i>	3	<i>Tetracystis</i> sp	<i>Planophila</i> sp
CG	-1.46	-1.87	-1.12	-2.21	-0.60
CG50%	-1.72	-2.19	-1.32	-2.53	-0.70
CG80%	-1.98	-2.53	-1.52	-2.98	-0.81
CP	-1.35	-1.72	-1.04	-2.04	-0.55
CP50%	-1.47	-1.88	-1.13	-2.22	-0.60
CP80%	-1.51	-1.93	-1.16	-2.28	-0.62
MG	-1.47	-1.88	-1.13	-2.22	-0.60
MG50%	-1.46	-1.86	-1.12	-2.20	-0.60
MG80%	-1.19	-1.52	-0.91	-1.80	-0.49
MP	-2.18	-2.79	-1.67	-3.29	-0.89
MP50%	-1.43	-2.08	-1.10	-2.16	-0.58
MP80%	-1.56	-1.99	-1.20	-2.35	-0.64
C	-0.23	-0.30	-0.18	-0.39	-0.09
M	-0.35	-0.44	-0.26	-0.52	-0.14

Tabla 3.2.6– Valores de ΔG en la interacción entre los distintos materiales pétreos y las microalgas cultivadas. Los valores se han separado, dentro de cada cultivo, por grupos de materiales, diferenciando cada mezcla de resina con mármol y cada mármol natural.

Se observa que todos los valores son negativos, lo que implica que todos los sustratos estudiados propician la adhesión de microorganismos. Sin embargo, los valores obtenidos para los mármoles naturales resultan

mucho mayores que los obtenidos para todas las mezclas de resinas sintéticas con polvo de mármol. Por otra parte, llama la atención el hecho de al aumentar la proporción de resina en las mezclas con micronizado de Carrara (CG y CP), aumenta también el valor absoluto de ΔG , mientras que en las mezclas con micronizado de Macael (MG y MP) ocurre lo contrario en casi todos los casos: al aumentar la proporción de resina, disminuye el valor absoluto de ΔG .

ADHESIÓN DE MICROORGANISMOS A HIDROCARBUROS

La prueba de hidrofobicidad en un sistema bifásico, o prueba de adhesión de microalgas a un hidrocarburo, permitió obtener los porcentajes de células desplazadas de una fase a otra que se recogen en la siguiente tabla (3.2.7):

cultivo		<i>Symploca elegans</i>	<i>Stichococcus bacillaris</i>	<i>Chlorella</i> sp	<i>Tetracystis</i> sp	<i>Planophila</i> sp
% células desplazadas	V	-	41,82 %	2,21%	-11,11%	-
	V'	-	11,56 %	2,50%	25,91%	66,67%

Tabla 3.2.7- Valores de absorbancia para el volumen de muestra indicado en el protocolo estándar (V) y para el volumen resultante de adaptar dicho protocolo (V'). El porcentaje de células desplazadas se obtuvo a partir de las medidas de absorbancia correspondientes a la suspensión en PBS y la suspensión modificada con tolueno.

Un primer análisis de esta tabla obliga a desconfiar de los valores obtenidos con el volumen de cultivo establecido por el protocolo estándar: en el caso del cultivo de *Tetracystis* sp, el valor negativo del porcentaje de células desplazadas implicaría que en la segunda medida hay más células que en la primera, lo que resulta inadmisibles. Además, las mediciones realizadas sobre la primera concentración del cultivo de *Planophila* sp tuvieron que considerarse nulas, puesto que el espectrofotómetro no ofrecía respuesta. Sólo en las mediciones

efectuadas sobre el cultivo de *Chlorella* sp los dos valores obtenidos se asemejan.

Entonces, cabe pensar que los valores obtenidos en las medidas realizadas con la cantidad de cultivo que contenía el mismo volumen celular que el propuesto en la bibliografía fueran más fiables. Según estos, la hidrofobicidad de las distintas especies estudiadas varía mucho, siendo el cultivo de *Chlorella* sp el que presenta células más hidrófilas, y el de *Planophila* sp el más hidrófobo. Por su parte, *Stichococcus bacillaris* y *Tetracystis* sp muestran una hidrofobicidad relativamente baja.

Todos los datos completos referentes a este capítulo están recogidos en el anexo V.

III.III. DISCUSIÓN

MÉTODOS DE ANÁLISIS EMPLEADOS

Para el estudio de las cualidades superficiales de las probetas pétreas y las microalgas biodeteriorógenas, en este estudio se emplearon la medida de ángulos de contacto y la prueba de adhesión de microorganismos a hidrocarburos.

Medida de ángulos de contacto.

La medida de ángulos de contacto es un método de estudio que cuenta con gran aceptación en la comunidad científica, puesto que permite diversas aplicaciones, es de fácil ejecución, y ofrece resultados muy satisfactorios desde varios puntos de vista.

Busscher y sus colaboradores, en sus múltiples publicaciones, (Busscher, 1985; Busscher *et al.*, 1984-a y -b; van Oss, 1994; Busscher *et*

al., 1995; van der Mei *et al.*, 2002, entre otras), defienden los planteamientos en que se sostiene el método, aunque aceptan que existen otros más sofisticados y complejos, como la cámara de flujo con láminas paralelas (van Oss, 1994), que resultan más completos. Boonaert *et al.* (2002) consideran que el método es muy apropiado para realizar estudios teóricos abstractos, pero que los resultados que se obtienen al estudiar sistemas reales no son fiables. Argumentan que el método exige que las superficies a estudiar sean homogéneas y estén en contacto molecular formando un sistema que se encuentre en equilibrio, lo que en la realidad es difícil de garantizar. Según ellos, los cálculos que se realizan para obtener datos sobre la energía libre están basados en desarrollos teóricos insuficientes, pues no contemplan las influencias electrostáticas en los fenómenos estudiados.

En su estudio con diferentes resinas, Speranza *et al.* (2004) concluyen que las interacciones electrostáticas no tienen una importancia grande cuando el material a estudiar es un polímero neutro, y desprecian también el efecto de las fuerzas de van der Waals en esos casos, por ser insignificantes en el desarrollo de los fenómenos de adhesión. Estos investigadores, en cambio, hacen hincapié en la aportación de las interacciones químicas, y demuestran que los análisis que se realicen sobre superficies que no sean ideales no pueden considerarse válidos, puesto que, en superficies “impuras”, no se puede discernir qué valor tienen estas interacciones sobre las demás. En su estudio con polímeros advierten del riesgo que se corre al trabajar con polímeros comerciales, y recomiendan el empleo de materiales específicamente preparados.

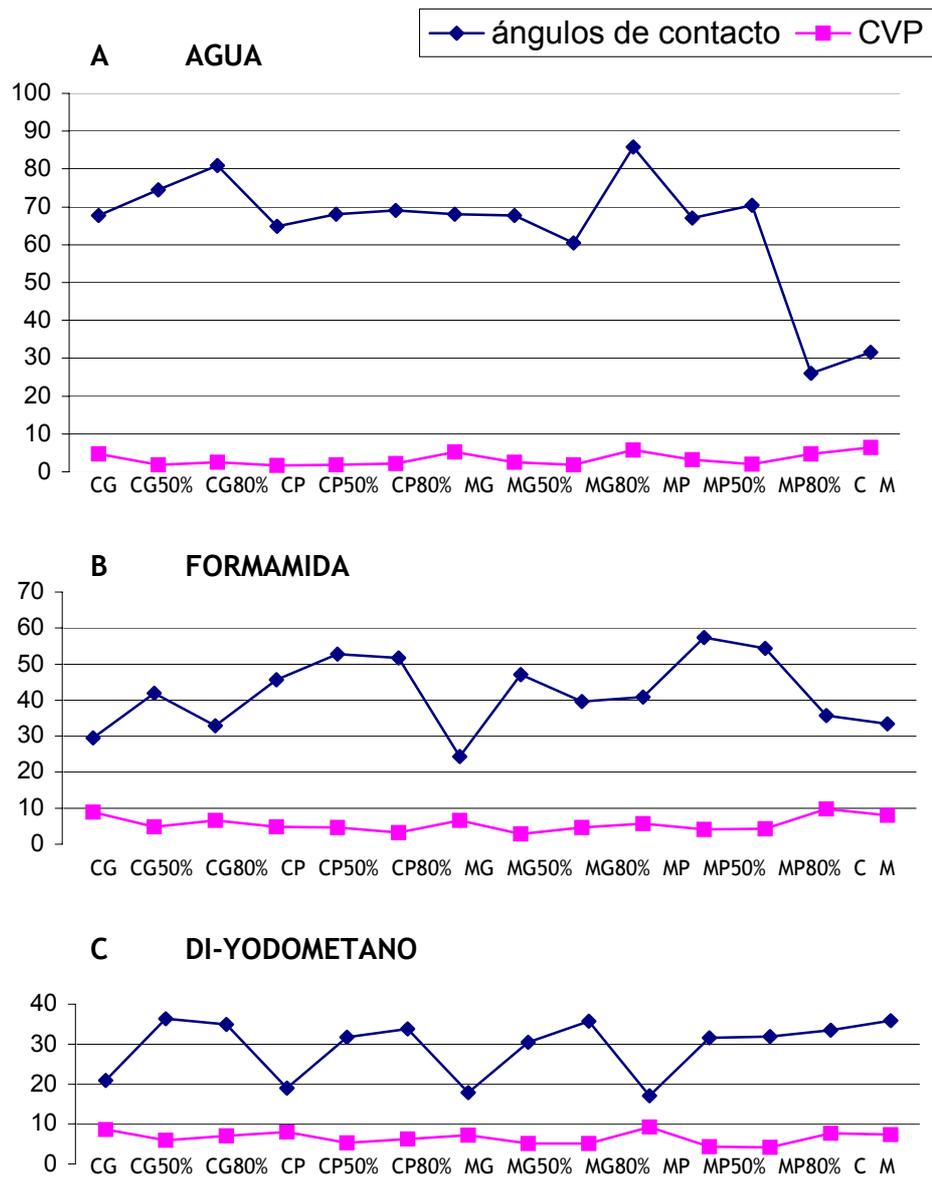
Brugnara *et al.* (2003), en su evaluación de las cualidades protectoras de las resinas sobre superficies pétreas, recuerdan que la interpretación de los resultados obtenidos por medida de ángulos de contacto sobre piedras y resinas es arriesgada, debido a las características de porosidad y heterogeneidad intrínsecas a estos materiales. Con todo, admiten que es el método más adecuado para estudiar su hidrofobicidad, en el sentido de que ofrece una descripción de las cualidades “medias” de la superficie.

Por otra parte, cuando se trata de analizar capas de microorganismos, Pembrey *et al.* (1999) critican la metodología estándar

por su imprecisión, alegando que el valor de los ángulos medidos dependerá enormemente del tiempo de secado y las condiciones de trabajo. Busscher *et al.* (1984-b) comparan los ángulos de contacto obtenidos para distintos tiempos de secado, y establecen el tiempo idóneo en 30 minutos a contar desde la deposición total de las células sobre el filtro. Este es el tiempo que emplean también Ahimou *et al.* (2001); estos investigadores, tras realizar diferentes pruebas, concluyen que la medida de ángulos de contacto es la que ofrece resultados más fiables, puesto que incluye implícitamente todas las contribuciones de las diferentes interacciones que conducen a la adhesión. En el presente trabajo, los depósitos algales se dejaron secar durante 30 minutos antes de realizar las primeras mediciones, y luego otros 30 minutos para tomar una segunda serie de medidas y comparar los resultados. Como se vio, los cambios no fueron significativos (tabla 3.2.5).

En el presente estudio, los resultados obtenidos mediante el análisis por medición de ángulos de contacto sobre las probetas pétreas pueden considerarse altamente reproducibles y representativos, especialmente en el caso de las mediciones efectuadas con agua. Las siguientes gráficas (figs. 3.3.1a, b y c) representan la comparación de los valores de la media de los ángulos obtenidos sobre los distintos materiales pétreos de las dos fases experimentales y el coeficiente de variación de Pearson (CVP) en cada caso.

Los datos completos a partir de los cuales se elaboraron las gráficas de las figuras 3.3.1a, b y c están recogidos en el anexo V. Del análisis de estas gráficas se infiere que el coeficiente de variación de Pearson tiene, en términos absolutos, valores menores en todas las mediciones realizadas con agua. Si se consideran estos valores en términos relativos, es decir, comparándolos con los valores medios de los ángulos medidos, los valores del CVP son muy pequeños en relación con los de los ángulos medios del agua; en los casos de la formamida y, particularmente, del di-yodometano, la relación es menos favorable.



Figs. 3.3.1a, b y c- Comparación entre los valores de los ángulos del agua, formamida y diyodometano con el CVP sobre cada uno de los materiales pétreos estudiados. Los valores medios de los ángulos están expresados en grados. El CVP representa el % de desviación típica por valor medio de los ángulos. El empleo de un solo eje de valores para ambas magnitudes pretende facilitar la comparación de los datos. Acrónimos de los sustratos: CG: mármol de Carrara con Gel-Coat, CP: Carrara con resina de poliéster, MG: Macael con Gel-Coat, MP: Macael con poliéster, C: mármol de Carrara, M: mármol de Macael. Los porcentajes 50% y 80% indican la proporción de resina que se añadió en la elaboración de las probetas de la segunda fase experimental.

Las gráficas permiten también hacer una evaluación general del comportamiento de cada material respecto a cada líquido. En este sentido, se observa que el agua produce ángulos de valores entre los 60° y 90° para los sustratos artificiales, variando el valor medio en función de la mezcla, pero sin mostrar las variaciones un comportamiento lineal. En este caso hay que destacar, además, el valor claramente menor de los ángulos tomados sobre los mármoles naturales.

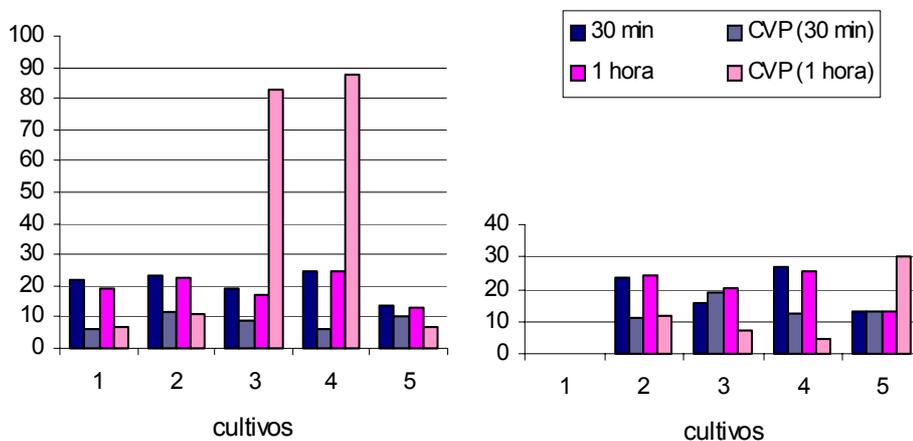
La formamida presenta, en general, más irregularidades, aunque son las del di-yodometano las más elocuentes: los ángulos medidos son sensiblemente menores sobre las probetas artificiales de la primera fase, sin excepción. Al aumentar la proporción de resina, los ángulos crecen, y alcanzan valores relativos más altos cuando la cantidad de resina en la mezcla es mayor. Estos valores, sin embargo, son muy parecidos a los obtenidos sobre los sustratos naturales.

En el caso de las microalgas los ángulos fueron mucho más inestables que sobre las probetas artificiales, lo que obliga a interpretar los resultados obtenidos con más prudencia que los referentes a los sustratos pétreos. Las siguientes gráficas revelan la relación existente entre los valores medios de los ángulos y el coeficiente de variación de Pearson en cada caso (fig. 3.3.2).

La relación entre los valores medios de los ángulos y el CVP sugiere, sin duda, que los resultados de estas medidas no deben considerarse tan representativos como los de los sustratos: en varios casos el CVP tiene un valor muy parecido al de la media de los ángulos medidos, como en las mediciones realizadas sobre el cultivo de *Planophila* sp en ambos filtrados; en otros casos su valor es mucho mayor que el de los ángulos, como ocurre para las mediciones sobre los cultivos de *Chlorella* sp y *Tetracystis* sp filtrados con el filtro de fibra de vidrio (A); sólo en algunas ocasiones se obtiene un coeficiente de variación relativamente pequeño respecto al valor medio del ángulo, como en la segunda medición realizada sobre el cultivo de *Tetracystis* sp (filtro B).

MEDICIONES SOBRE FILTRO A

SOBRE FILTRO B



Figs. 3.3.2- Comparación entre los valores medios, en grados, de los ángulos medidos con agua sobre cada cultivo tras 30 minutos de secado y tras 1 hora, y el CVP para cada caso. La numeración de los cultivos corresponde a: 1) *Symploca elegans*, 2) *Stichococcus bacillaris*, 3) *Chlorella* sp, 4) *Tetracystis* sp, y 5) *Planophila* sp. Se dan los valores correspondientes a las mediciones realizadas sobre el filtro de fibra de vidrio (A) y el de acetato de celulosa (B), excepto en el caso del cultivo 1 (*Symploca elegans*), en que las mediciones se efectuaron directamente sobre una película algal, cuyo valor se ofrece en la gráfica correspondiente al filtro A.

Adhesión de microorganismos a hidrocarburos.

El empleo del método de estudio por adhesión de partículas a hidrocarburos se limitó en este estudio al análisis de las microalgas. El fundamento del MATH permitiría aplicarlo también a sustancias inorgánicas, siempre que cumplieran ciertos requisitos; sin embargo, en la bibliografía consultada no se han encontrado trabajos en que se aplique a materiales inorgánicos. De este modo, al no contar con un

protocolo de referencia, se optó por emplearlo únicamente para estudiar las propiedades superficiales de los microorganismos.

La elección del método de adhesión microbiana a hidrocarburos, o adhesión bifásica, responde al hecho de que, comparando con otros métodos posibles, ha sido aplicado anteriormente con aparente éxito al estudio de microalgas (Fattom y Shilo, 1984; Lamenti *et al.*, 2000; Tomaselli *et al.*, 2000-b), mientras que los demás se han empleado sobre todo en el estudio de bacterias (Ahimou *et al.*, 2001; Boonaert *et al.*, 2001; Dufrêne *et al.*, 1999 y 2001; Pedri, 2002, entre otros). Además, tiene la ventaja de que, según el protocolo estándar descrito por Rosenberg *et al.* (1980), resulta relativamente sencillo de desarrollar, lo que garantiza la reproducibilidad de los resultados. No obstante, el método tiene limitaciones que es preciso tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos.

Algunas de estas limitaciones vienen dadas por la propia impostación teórica de que deriva el método. Las teorías de DLVO están desarrolladas a partir del supuesto de que las superficies que se estudian son químicamente homogéneas, perfectamente lisas y rígidas, e impermeables a iones. Estas cualidades no pueden esperarse de una pared celular, puesto que las células tienen características distintas en cada zona de su superficie, con lo que la adhesión puede estar provocada por algún factor localizado y concreto, como la presencia de un flagelo o apéndice, por ejemplo. Boonaert *et al.* (2001) detectan un carácter adhesivo localizado, no general, en las células de una bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, lo que les hace dudar de la eficacia de este método para el estudio de los fenómenos de adhesión relativos a microorganismos.

El método de MATH, por otra parte, aunque considera la acción de fuerzas de largo alcance como las electrostáticas y las de van der Waals, no recoge los efectos de otras fuerzas de corto alcance, como las interacciones ácido-base y los puentes de hidrógeno. La teoría DLVO, en su versión extendida, considera también las interacciones ácido-base, definitivas en los fenómenos de hidrofobicidad, y algunos autores han desarrollado el método experimental MATH para abarcar estas fuerzas (en Boonaert *et al.*, 2002). Sin embargo, las modificaciones introducidas

dificultan la puesta a punto del método, ya que resulta muy sensible a factores como el tiempo de mezcla de las dos fases (acuosa y orgánica), el área de superficie de las gotas del hidrocarburo (que depende de la temperatura), y el tipo de recipiente empleado, entre otros parámetros. Esta hipersensibilidad representa un problema que afecta a la fiabilidad y reproducibilidad de los resultados, por lo que el protocolo más comúnmente usado no incorpora las modificaciones que permiten considerar las interacciones ácido-base.

La realización del método conlleva otros problemas prácticos. Por ejemplo, la formación de una emulsión como paso previo a su separación en dos fases hace que en la interfase se pierda definición. Si se piensa que muchas células podrían ser afines a esa fase de polaridad confusa, el resultado final del ensayo resultaría altamente impreciso (Boonaert *et al.*, 2002). Además, las células pueden tener un carácter anfifílico, esto es, mostrarse afines a uno u otro medio en función de factores externos. Ahimou *et al.* (2001) y Boonaert *et al.* (2001) encuentran diferentes comportamientos en células de la misma especie dependiendo del medio de cultivo en que hayan crecido y del tiempo que hayan permanecido en ese medio. May (2003) advierte de la poca semejanza que tienen los microorganismos cultivados en laboratorio con los que se encuentran en medios naturales. Fattom y Shilo (1984) encuentran que el comportamiento de los filamentos maduros de una cianobacteria, *Calothrix desertica*, es claramente hidrófobo, mientras que el de sus hormogonios es hidrófilo. Experimentan con la adición de sales, y concluyen que algunos cationes, como el magnesio y el calcio, alteran las propiedades superficiales de los microorganismos. Lamenti *et al.* (2000), que también consideran esta cuestión, observan que sus resultados son distintos si se realiza la prueba añadiendo una sal de magnesio a la suspensión celular, y apuntan que, según sus estimaciones, esa adición proporciona datos más veraces. Esto parece indicar que las interacciones electrostáticas tienen, efectivamente, un papel relevante en los fenómenos de adhesión, papel que mediante el análisis MATH queda puesto de manifiesto, aunque no se puede describir de forma cuantitativa.

Pembrey y sus colaboradores (1999) llaman la atención sobre el hecho de que el protocolo de ejecución de la prueba resulta dañino para las células de los microorganismos, con lo que los resultados que se obtienen no corresponderían a células en estado natural, sino a células deterioradas. El centrifugado de la suspensión celular, preciso para el lavado de las células, puede provocar roturas; la adición posterior al lavado de un medio diferente al de cultivo conlleva cambios de presión osmótica; el empleo de disolventes fuertes como son los hidrocarburos altera enormemente las cualidades de los microorganismos. Esto les hace concluir que no es un método apto para el estudio de las propiedades superficiales de las células. Con todo, el MATH resulta menos agresivo que otros métodos de estudio que requieren de estos y otros pasos de preparación de las muestras.

Por último, hay que considerar los problemas específicos que surgieron en este estudio al aplicar el MATH al análisis de microalgas. Aunque, como se dijo, ya ha sido empleado por algunos autores (Fattom y Shilo, 1984; Lamenti *et al.*, 2000), en sus trabajos no se mencionan ciertos puntos que resultan de gran interés metodológico. El MATH fue diseñado para el estudio de las propiedades de células bacterianas (no en vano es muy frecuente encontrar en la bibliografía relacionada las siglas BATH -*Bacterial Adhesion To Hydrocarbon*-), cuyo tamaño es menor que el de las células de las microalgas. El problema es aun mayor cuando se trabaja con especies filamentosas. Esto supone un inconveniente a la hora de ejecutar el método con vistas a obtener resultados comparables, tanto con los de otros autores como con los relativos a especies algales cocoides, o de menor tamaño. Si el volumen de las gotas de disolvente, como se ha visto, va a influir sobre los resultados, cabe suponer que el del microorganismo también lo hará. Además, el protocolo estándar indica una concentración celular determinada, que da lugar a un volumen celular total de valor más o menos acotado. Pero, al ser mayor el volumen celular con el que se trabaja, se puede considerar que no se está respetando el protocolo si se mantiene la concentración celular, puesto que el volumen total resultante será mucho mayor que en el caso de las células bacterianas. Esta es la razón de que en este trabajo se optara por realizar dos tipos de mediciones: una serie con suspensiones de

concentración estándar, y una serie con suspensiones de concentración adaptada para respetar el volumen celular estándar (véase el apartado de Materiales y Métodos correspondiente).

CUALIDADES SUPERFICIALES, HIDROFOBICIDAD Y ADHESIÓN

Materiales pétreos.

Los ángulos de contacto medidos sobre las probetas pétreas permitieron caracterizarlas en términos de energía libre superficial. Los valores de la energía libre obtenidos para los diversos sustratos son parecidos entre sí, aunque las probetas de mármoles naturales dieron valores más bajos que las de mármoles artificiales. En el caso de las mezclas más refinadas, estos valores se acercan más a los de las probetas naturales que a los de las artificiales de la primera fase.

Los valores de las componentes positiva y negativa de γ indican que las muestras estudiadas tienen cierto carácter polar, y que existe una contribución ácido-base a la energía superficial (González-Caballero y García López-Durán, 2000). El hecho de que γ^- ofrezca valores más altos significa que la tendencia de los sustratos es, en una interacción, a donar electrones. Esto va a influir de forma determinante en el tipo de microorganismos que tendrán tendencia a adherirse. Speranza *et al.* (2004) analizaron la adhesión de un bacteria Gram -, *Escherichia coli*, sobre distintos sustratos, unos ácidos y otros básicos, concluyendo que la composición química de los sustratos estudiados definía la carga superficial, y con ello los fenómenos de adhesión.

Los mismos autores señalan que en superficies poliméricas, las fuerzas de van der Waals no tienen gran incidencia en los procesos de adhesión. No obstante, entre los valores relativos de las distintas componentes de γ obtenidos aquí, el valor de la componente Lifshitz - van der Waals es más alto que el de las restantes. Esto hace pensar que la energía superficial de estos materiales viene dada, principalmente, por las interacciones entre las moléculas. El mayor valor en el caso de los materiales artificiales se explica si se tiene en cuenta la naturaleza orgánica de las resinas constituyentes, cuyas moléculas tienen largas

cadena hidrocarbonada. Esto coincide con la tesis de Speranza *et al.* (2004) de que la energía superficial depende en gran medida de la composición química del sólido considerado, pero se contradice con sus resultados.

Otro factor que parece haber intervenido en los resultados obtenidos es la rugosidad superficial, un factor exclusivamente físico. En una cierta medida de área de un sustrato rugoso, hay más superficie que en la misma medida de área de un sustrato pulido. Esto, lógicamente, favorece la colonización, al ofrecer un espacio mayor en la misma área (Hazlett, 1993). Este factor, que para algunos autores es definitivo (Tomaselli *et al.*, 2000-b; Brugnara *et al.*, 2003), según otros tiene, sin embargo, menos peso que el anterior: Müller-Steinhagen *et al.* (2000) demuestran que sin variar la rugosidad de un sólido puede disminuir su energía superficial, de la misma manera que disminuyendo la rugosidad, la energía superficial puede mantenerse. En su trabajo concluyen que tanto la energía superficial como la rugosidad tienen un efecto sobre la resistencia a la colonización, pero demuestran que éste es mucho más significativo en el caso de la energía superficial. Otro trabajo en que se trata la cuestión es el de Krumbein *et al.* (1993), donde se comprobó la escasa colonización de sustratos de mármol gracias a lavados sucesivos con agua de cal. Los investigadores llegaron a la conclusión de que la cal, lejos de atraer a las microalgas (como cabría esperar, atendiendo a razones puramente químicas), hacía invulnerable al sustrato en la medida en que había tapado sus poros, convirtiendo su superficie en lisa y uniforme. Eginton *et al.* (1995), en cambio, tras estudiar la adhesión de varias bacterias a distintos sustratos, concluyen que la rugosidad no influyó en los resultados obtenidos en todos los casos. Ese mismo estudio les permitió observar que tampoco la hidrofobicidad, factor cuya importancia se discutirá más adelante, tenía un papel determinante en la adhesión de todas las bacterias, sino que sólo en caso encontraron relación entre la hidrofobicidad del sustrato y la mayor tendencia a la adhesión del microorganismo.

En el caso del presente estudio, la observación de las probetas empleadas a la lupa binocular reveló que su superficie, aunque estaba finamente pulida, presentaba numerosos poros como consecuencia del

proceso de polimerización de las resinas constituyentes. Las superficies de los mármoles naturales, en cambio, se mostraron lisas y homogéneas, lo que podría explicar que el proceso de colonización fuera más lento sobre ellos; de hecho, los valores de γ obtenidos son menores en el caso de estos materiales. Como se desprende de la expresión que relaciona el valor de γ con el de la energía libre total de sistema,

$$\Delta G_{adh} = \gamma_{MS} - \gamma_{ML} - \gamma_{SL} \quad (\text{ec. I})$$

cuanto mayor sea el valor de γ_{SL} (γ de interacción entre el sustrato y el líquido), menor será el de ΔG_{adh} , si los otros dos factores se mantienen estables. Como se expuso anteriormente (véase el apartado de Materiales y Métodos de este capítulo), un valor negativo de este parámetro implica que la adhesión se ve favorecida. De todas maneras, Speranza *et al.* (2004) insisten en la necesidad de diseñar cuidadosamente las superficies a analizar, puesto que el método analítico de medida de ángulos de contacto exige que las superficies sean ideales. Sin esa exigencia, los resultados que se obtengan deben considerarse con reserva.

Por lo que se refiere a la hidrofobicidad, la figura 3.3.3 muestra los valores comparados de los ángulos de contacto del agua obtenidos sobre los distintos sustratos pétreos. Se observa claramente que los ángulos sobre las rocas naturales son mucho menores que los medidos sobre los sustratos artificiales, con diferencias de hasta 40°. Los valores para los sustratos artificiales rondan los 70° en todos los casos. Esto significa que todos estos materiales tienen una hidrofobicidad muy alta, tanto en términos absolutos como en relación con los valores de los mármoles, lo cual se explica por su composición química y su forma molecular, donde grupos apolares ocupan los extremos de las largas cadenas hidrocarbonadas (fig. 2.2.1). Hay que resaltar que su alta hidrofobicidad coincide con el alto índice de colonización que sufrieron las probetas correspondientes (fig. 2.2.5).

Por otra parte, la adición de mayor proporción de resinas a micronizados provoca resultados contrarios para cada tipo de mármol. Las mezclas elaboradas con micronizado de Carrara se muestran más

hidrófobas a medida que se añade resina, al contrario de lo que ocurre con las de Macael, donde el valor de los ángulos medidos desciende en casi 20° en las probetas con mayor proporción de resina de poliéster, y presentan un descenso más ligero en las de Gel-Coat. Esto indica que el carácter hidrófobo de estos materiales no viene dado exclusivamente por la presencia de resina, sino que también es significativa la proporción de cada componente en la mezcla.

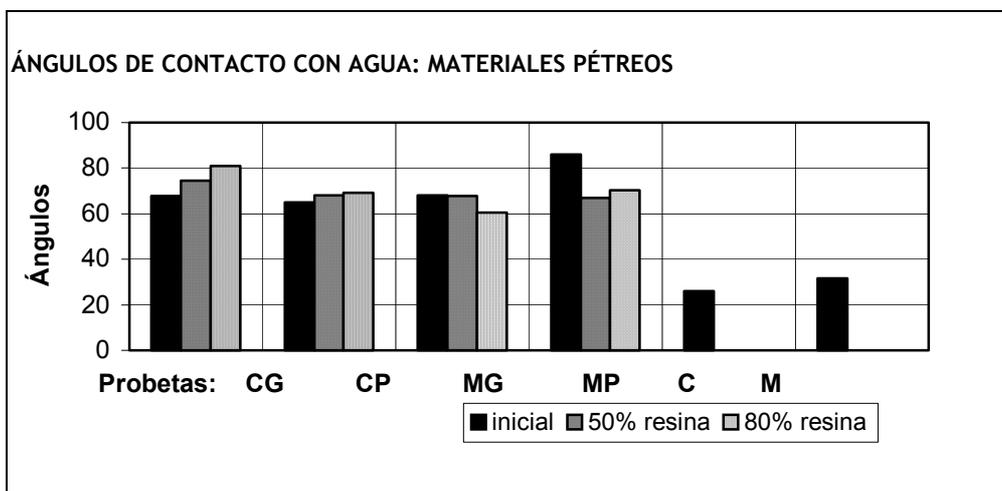


Fig. 3.3.3- Valor medio en grados de los ángulos de contacto del agua sobre las distintas superficies estudiadas. Acrónimos de los sustratos: CG: mármol de Carrara con Gel-Coat, CP: Carrara con resina de poliéster, MG: Macael con Gel-Coat, MP: Macael con poliéster, C: mármol de Carrara, M: mármol de Macael.

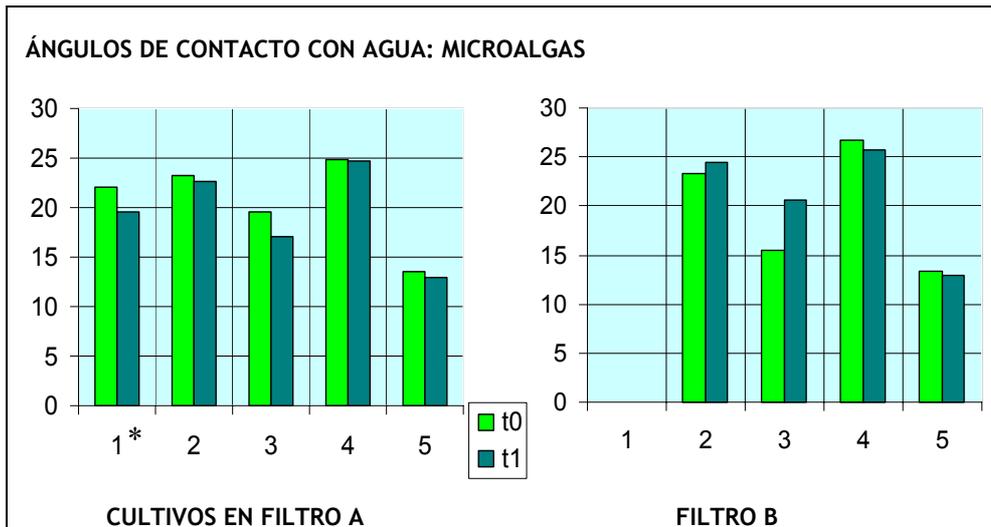


Fig. 3.3.4- Valor medio en grados de los ángulos de contacto del agua sobre los varios depósitos algales, filtrados con filtro de fibra de vidrio (A) y de acetato de celulosa (B). La numeración de los cultivos corresponde a: 1) *Symploca elegans*, 2) *Stichococcus bacillaris*, 3) *Chlorella* sp, 4) *Tetracystis* sp, y 5) *Planophila* sp. El cultivo 1, señalado con un asterisco, no fue filtrado, como ya se indicó anteriormente; por tanto los valores dados en esta tabla corresponden a las mediciones efectuadas directamente sobre una película algal. Los tiempos de secado son: t0= 30 min. después del filtrado, t1= 60 min.

Microalgas.

Las propiedades superficiales de los organismos implicados resultan otro factor a considerar. Como se viene diciendo, la bibliografía disponible relativa a organismos fotoautótrofos es muy escasa; al respecto se puede citar el trabajo pionero de Fattom y Shilo (1984), y los del equipo de Luisa Tomaselli (Lamenti *et al.*, 2000; Tomaselli *et al.*, 2000-b), más cercanos en el tiempo. No obstante, se han publicado infinidad de trabajos que abordan el tema desde la óptica de la industria, sobre todo de la farmacéutica y de tecnología de los alimentos, estudiando especialmente las propiedades de algunas bacterias (algunos entre los recientes, Eginton *et al.*, 1995; Baldi *et al.*, 1999; Bowen *et al.*, 1999; Ahimou *et al.*, 2001; Boonaert *et al.*, 2001; Hsu y Huang, 2002; van der Mei *et al.*, 2002; Krepsky *et al.*, 2003; Speranza *et al.*, 2004).

Los valores de los ángulos de contacto de agua medidos sobre los depósitos filtrados de microalgas están reflejados de forma comparada en la figura 3.3.4. Los ángulos oscilan entre una media de 15° y 35°, es decir, valores relativamente bajos, indicadores de una alta hidrofilia. Son valores similares a los obtenidos por Ahimou *et al.* (2001) sobre capas de la bacteria *Bacillus subtilis*, o los de Boonaert *et al.* (2001) sobre *Lactococcus lactis*. Sin embargo, hay que ser cautos ante esta similitud, ya que las condiciones de cultivo -tiempo de desarrollo, medio de cultivo, condiciones del filtrado, secado, etc.- afectan enormemente a los resultados de las medidas (Pembrey *et al.*, 1999; Ahimou *et al.*, 2001), con lo que cualquier diferencia mínima en la aplicación del protocolo podría significar que los datos obtenidos no son comparables. Parece más prudente, por tanto, tomar los datos ajenos como referencias, y limitar la comparación y la extracción de conclusiones al caso concreto de este estudio, contrastando entre sí los datos propios.

Por otro lado, los valores obtenidos en la prueba de adhesión a hidrocarburos son muy dispares entre sí, e indican una hidrofobicidad distinta de la que se desprende de la medida de ángulos de contacto del agua. Mientras que algunos de los cultivos aparecen como muy hidrófilos, otros lo hacen como muy hidrofóbicos. Esto contradice los valores del análisis por ángulos de contacto, según los cuales todas las especies estudiadas serían hidrófilas. Los resultados obtenidos parecen corroborar la presunción de que el método no está diseñado para trabajar con ciertos volúmenes celulares, y por tanto el protocolo original ha de ser adaptado específicamente al estudio de algas.

Si las microalgas implicadas en procesos de biodeterioro tuvieran carácter hidrofóbico, quedaría explicada en gran parte su tendencia a la adhesión a sustratos artificiales como los aquí estudiados. Este carácter, sumado al mismo carácter de los sustratos artificiales propuestos, y comparando éste con el de los mármoles naturales, más hidrófilos, sería la razón de que estos microorganismos prefirieran adherirse y colonizar los morteros artificiales, puesto que serían más afines a ellos que a los naturales o incluso que al agua en que se hallan suspendidas. Este razonamiento se corresponde con los resultados experimentales obtenidos en la prueba de biorreceptividad y susceptibilidad a la colonización

realizada sobre todos los sustratos considerados, pero no coincide con los resultados obtenidos en la prueba de medida de ángulos de contacto ni con todos los de la prueba de adhesión a hidrocarburos. Si, como indican estos resultados, los microorganismos estudiados son hidrofílicos, tenderían a permanecer en suspensión en el agua o a adherirse a los sustratos naturales, y no colonizarían los sustratos artificiales en primer lugar.

Las conclusiones emitidas a este respecto en estudios similares de otros autores difieren enormemente de las que podrían extraerse en este. En su análisis mediante MATH de filamentos de la cianobacteria *Phormidium* sp, Fattom y Shilo (1984) encuentran que son muy hidrófobos, y que este carácter está presente a lo largo de todo el filamento, no localizado en ninguna zona concreta. Estos autores introducen una serie de modificaciones al protocolo de Rosenberg *et al.* (1980), y concluyen, tras distintas pruebas, que la hidrofobicidad no la están dando las células que conforman los filamentos, sino la vaina mucilaginososa que los envuelve. La pared celular de estas microalgas está compuesta, principalmente, de celulosa (Lee, 1989; Canter-Lund y Lund, 1995), de modo que cabría esperar un comportamiento hidrófilo de ellas. La existencia de un entramado de sustancias poliméricas de excreción (EPS) recubriendo a las células podría explicar que se mostraran hidrófobas. En nuestro estudio se trabajó con el género *Symploca*, uno de los más presentes en las fuentes analizadas, y de características muy similares a *Phormidium*. Como se explicó, la especie cultivada no se estudió mediante la prueba de MATH, pero sí mediante ángulos de contacto, y los valores obtenidos apuntan claramente a una alta hidrofilia de los filamentos. El cultivo analizado no fue tratado para eliminar las EPS, ni siquiera fue lavado o filtrado, sino que las mediciones se realizaron directamente sobre una natural película de filamentos. Con todo, los resultados son diametralmente opuestos a los obtenidos en el trabajo de Fattom y Shilo.

Tomaselli *et al.* (2000-b) ponen de manifiesto que las células de algas verdes que estudiaron presentaban, contrariamente a lo que podría pensarse *a priori*, una muy alta hidrofobicidad. Sin embargo, los mismos autores obtuvieron resultados opuestos en un trabajo con cianobacterias,

lo que parece corresponderse con los resultados obtenidos aquí, y tan sólo después de eliminar el envoltorio celular observaron comportamientos ligeramente hidrofóbicos en ellas, justo al contrario que en el trabajo de Fattom y Shilo antes mencionado.

Lamenti *et al.* (2000), del mismo grupo de trabajo, estudiaron la hidrofobicidad de distintas cianobacterias y algas verdes mediante MATH, aportando otras modificaciones, diferentes de las de Fattom y Shilo, al protocolo original de Rosenberg *et al.* (1980). Sus resultados son, por motivos distintos, sorprendentes. En su estudio analizaron un cultivo de alga verde del género *Chlorella*, muy común en monumentos pétreos situados al aire libre, y presente también en las fuentes objeto de este estudio; encuentran que es *completamente* hidrofílica, es decir, que en la prueba de adhesión a hidrocarburos no hubo desplazamiento celular alguno, todas las células permanecieron en la fase acuosa. Las especies *Chlorella* sp, *Tetracystis* sp y *Planophila* sp son parecidas a la estudiada por Lamenti *et al.*, y en los tres casos hubo desplazamiento celular. Si bien es cierto que en el cultivo de *Chlorella* sp tan sólo un 2,5 % de las células se desplazó, el porcentaje es mucho mayor para los cultivos de *Tetracystis* sp (25,91%) y *Planophila* sp (66,67%). Estos datos se oponen a los resultados del equipo de G. Lamenti. También en ese estudio los investigadores analizaron un cultivo de *Ulothrix* sp, un alga verde filamentosa muy similar a *Stichococcus bacillaris*. El tanto por ciento de células desplazadas en ambos casos coincide casi exactamente: 11,1% para *Ulothrix* sp en el trabajo de Lamenti y sus colaboradores, 11,56% para la segunda medición realizada sobre *Stichococcus bacillaris* en el presente estudio. Si se tiene en cuenta que los protocolos seguidos difieren en cada trabajo, cabe pensar que esto sea una mera coincidencia.

Las divergencias y coincidencias entre los resultados que pueden encontrarse en la bibliografía y los que se obtuvieron en este estudio sugieren que los métodos actuales para el estudio de la hidrofobicidad en microalgas deben ser revisados, rediseñados, y comprobados hasta que se demuestre su eficiencia y la reproducibilidad de sus resultados, ya que por ahora ninguno de ellos puede considerarse concluyente.

Interacciones.

La gráfica de la figura 3.3.5 representa, en valor absoluto, las variaciones de energía libre que se dan en cada sistema sustrato-alga-agua. Los valores, reportados en la tabla 3.2.6, se obtuvieron mediante la medición de ángulos de contacto con agua sobre cada sustrato pétreo y cada depósito algal, según la relación descrita en la ecuación III.

La gráfica es elocuente: para todas las microalgas cultivadas, ΔG tiene un valor mayor (más cercano a 0) en combinación con los mármoles naturales, y es mucho más negativo en todas las demás combinaciones. Esto se traduce en el fenómeno que se pudo observar en el experimento de resistencia a la colonización de cada sustrato; los sustratos elaborados con resinas sintéticas propician la adhesión de microalgas en mucha mayor medida que los naturales.

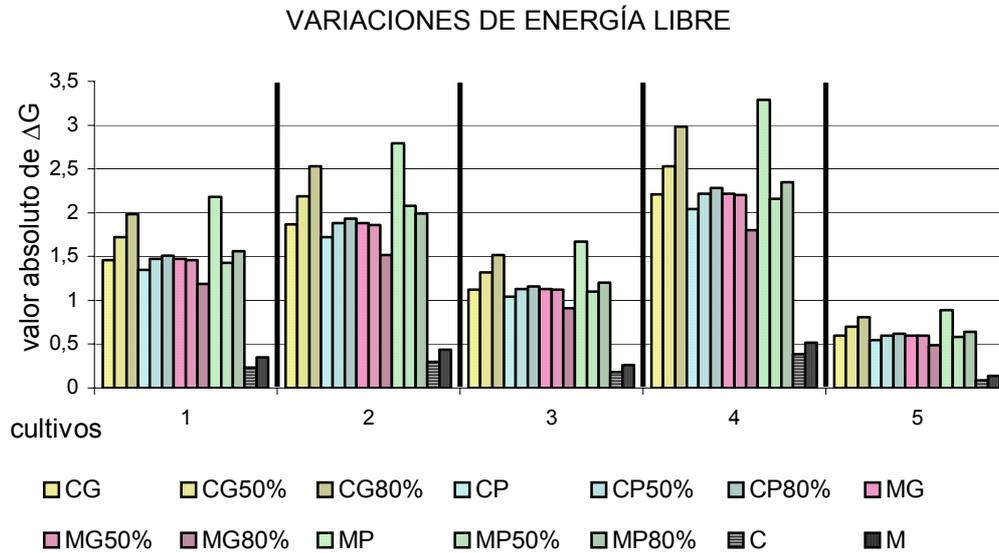


Fig. 3.3.5- ΔG , en kJ/m^2 , para cada microalga estudiada en interacción con cada sustrato pétreo considerado. ΔG se representa en su valor absoluto (el valor real, en todos los casos, es negativo). Los valores referentes a cada familia de sustratos pétreos se han agrupado por gamas de color. Acrónimos de los sustratos: CG: mármol de Carrara con Gel-Coat, CP: Carrara con resina de poliéster, MG: Macael con Gel-Coat, MP: Macael con poliéster, C: mármol de Carrara, M: mármol de Macael. Los porcentajes 50% y 80% indican la proporción de resina que se añadió en la elaboración de las probetas de la segunda fase experimental. Numeración de los cultivos a: 1) *Symploca elegans*, 2) *Stichococcus bacillaris*, 3) *Chlorella* sp, 4) *Tetracystis* sp, y 5) *Planophila* sp.

Entonces, los resultados de los distintos análisis chocan de nuevo. La causa de este choque podría residir en una incorrecta puesta a punto de los métodos de análisis. Como se dijo, tanto la prueba de MATH como la medida de ángulos de contacto son métodos que vienen empleándose desde hace décadas para el estudio de capas bacterianas, pero sólo raramente se han aplicado a microalgas. Por tanto, cabe pensar que deban realizarse algunas modificaciones en los protocolos (por ejemplo, en el tiempo de secado en la medida de ángulos de contacto, o la concentración celular en el MATH) para adaptarlos a estos microorganismos. En el caso de la prueba de adhesión a hidrocarburos, parece obvio que el método precisa de algunas modificaciones. Sin embargo, en el caso de la medida de ángulos de contacto, resulta paradójico que mientras los valores brutos de los ángulos contradicen las expectativas respecto al carácter hidrófobo de las algas, los mismos valores, en relación con los de los ángulos medidos sobre los sustratos pétreos, ofrecen una descripción cuantitativa fiel de un fenómeno observado experimentalmente, la colonización más rápida de los sustratos artificiales.

Como refleja la gráfica 2.2.4 del segundo capítulo de este trabajo, las probetas artificiales elaboradas a partir de mármol de Macael (MP y MG), y la de Carrara y Gel-Coat (CG), fueron las que más rápidamente sufrieron la colonización algal. En la gráfica 3.3.5 se observa que los valores más negativos de ΔG corresponden, para todos los cultivos (aunque en distinta medida para cada uno de ellos), a las mezclas de polvo de Macael con resina de poliéster (MP), seguidas de cerca por las mezclas de Macael y Carrara con resina Gel-Coat y las mezclas de Carrara con poliéster. Los valores relativos a los mármoles naturales quedan muy alejados de todos ellos. Esto se ajusta, pues, a la evolución del experimento realizado en los semilleros de Generalife.

El dispositivo experimental que se diseñó entonces no incluía probetas de mezclas de composición alterada a favor de la resina, por no ser estas mezclas aptas para su uso en restauración. Así, sólo se estudió la colonización en probetas elaboradas con una proporción óptima de resina / mármol. Sin embargo, las mediciones de ángulos de contacto se realizaron también sobre probetas elaboradas con mezclas forzadas, con

el fin de conocer la influencia de la resina en los fenómenos relacionados con la colonización. A este respecto, los resultados obtenidos son muy llamativos.

Como se observa en la gráfica 3.3.5, la adición de más resina produjo resultados opuestos con cada mármol. En su interacción con las microalgas estudiadas, las mezclas de mármol de Carrara con las dos resinas sintéticas consideradas propiciarían la adhesión de forma más significativa a mayor proporción de resina en la mezcla. Esto es más acusado en el caso de la combinación con Gel-Coat, combinación que estaba entre las más rápidamente colonizadas (fig. 2.2.4). Por el contrario, la interacción de las microalgas con las mezclas de polvo de mármol de Macael y resina no se ven afectadas de la misma manera. La adición de resina a la mezcla original no provoca alteraciones importantes en el caso del Gel-Coat, aunque los cambios siempre son de signo opuesto a los que se daban con las mezclas de Carrara. El fenómeno es mucho más notable en las mezclas con resina de poliéster, donde su mayor proporción conlleva una caída dramática en el valor de ΔG . Según esto, las mezclas de micronizado de mármol de Macael y resinas sintéticas serían menos atractivas para las microalgas si la proporción de resina fuera excesiva. Sin embargo, los valores de la energía superficial γ se acercaban más a los de los sustratos naturales cuanto mayor era la proporción de resina en esas mezclas, al igual que en las mezclas elaboradas con Carrara (tablas 3.2.2 y 3.2.4). Esto parece indicar que la rugosidad superficial, que influyó de forma determinante en los valores de γ , queda relegada a un segundo plano cuando se trata de interacciones con microorganismos, teniendo protagonismo la composición química del sustrato. Speranza *et al.* (2004) estudiaron los fenómenos de adhesión de bacterias a sustratos poliméricos, concluyendo que, efectivamente, la composición química del sustrato era definitiva.

Relacionando estos datos con los valores de los ángulos medidos con agua sobre las distintas probetas pétreas (fig. 3.3.3), resulta evidente que la hidrofobicidad del sustrato influye de forma determinante en la adhesión: las probetas elaboradas a partir de mármol de Carrara son más hidrófobas a medida que se incrementa la proporción de resina en la mezcla, especialmente en el caso de la resina de Gel-Coat. Por el

contrario, la adición de más resina en las mezclas de Macael disminuye su hidrofobicidad. Aunque el valor más alto de ΔG fue el relativo a las probetas de mármol de Macael y resina de poliéster en combinación con las algas del cultivo de *Tetracystis* sp (fig. 3.3.5), al aumentar la cantidad de resina en la mezcla hasta el 50%, el valor de ΔG cae hasta igualar al de las probetas iniciales de Carrara, mientras que en estas probetas el valor asciende y casi alcanza al primero, de MP, cuando la proporción de resina (en este caso, Gel-Coat) es del 80%.

Puesto que las probetas artificiales con mayor porcentaje de resina no fueron sometidas a la prueba de resistencia a la colonización de microalgas, no se conoce qué influencia real tendría la hidrofobicidad sobre el desarrollo de la colonización en cada caso, ya que podrían intervenir otros factores en el proceso, como la rugosidad superficial. Hay que recordar que las probetas empleadas en la segunda fase de este trabajo estaban realizadas con micronizados de mármol más finos que los de las mezclas de la primera fase; sin duda, el tamaño del grano influye en los valores de los parámetros que se analizaron. No obstante, aunque no se puedan extraer conclusiones sobre la relevancia de la hidrofobicidad en los fenómenos de adhesión, los datos experimentales obtenidos en las distintas pruebas realizadas sí permiten emitir la hipótesis sólida de que la hidrofobicidad del sustrato favorece su colonización.

CONCLUSIONES

1- En las fuentes estudiadas se identificaron algas verde-azuladas, diatomeas y algas verdes como principales agentes de biodeterioro. Las cianofíceas predominaban en la fuente de Bibatauín y en las de los Reales Alcázares, mientras que en las fuentes de la Alhambra y el Generalife son las clorofíceas las más abundantes. En los tres casos, las diatomeas son también muy numerosas.

2- Las especies presentes en las fuentes monumentales consideradas pertenecen a distintos biotipos. En la Alhambra, el biotipo más representativo es el de agregados gelatinosos (II), seguido de los filamentos con vaina (VI). Este último biotipo (VI) fue el más abundante en las especies de las fuentes de Bibatauín y los Alcázares, donde además se identificaron especies unicelulares que viven aisladas (I).

3- La formación de costras carbonatadas supone la alteración biogénica más significativa. Estas costras, de difícil eliminación, pueden constar de varias capas de materias mineral y orgánica, que se disponen alternadamente. En su cara externa, este tipo de alteración muestra una superficie lisa que puede llegar a confundirse con el propio sustrato

pétreo cuando su coloración se asemeja. Debido a su génesis, los estratos de estas costras van perdiendo definición en sus capas más internas, de modo que la materia inorgánica se entremezcla con los microorganismos.

4- Como alternativa a las intervenciones tradicionales de conservación y restauración, se propuso el empleo de materiales pétreos sintéticos, cuyas cualidades físicas y químicas, en comparación con las de los mármoles naturales, los hace idóneos para este fin, excepto en el caso de los elaborados con resina epoxi.

5- En la prueba de colonización sobre distintos sustratos pétreos, las algas pioneras fueron, en todos los casos, las diatomeas. Posteriormente aparecieron, mayoritariamente, algas verdes, lo que dio lugar a un inicio de mineralización.

6- La respuesta a la colonización algal por parte de los materiales sintéticos fue, sin embargo, más desfavorable que en el caso de los mármoles, especialmente en los materiales compuestos de micronizado de mármol de Macael, y en la mezcla de resina Gel-Coat con mármol de Carrara.

7- Se realizó un estudio de superficie de los distintos materiales estudiados mediante medida de ángulos de contacto, que puso de manifiesto que la energía libre superficial era mayor en los sustratos artificiales, incluso cuando las mezclas estaban más refinadas, que en los naturales, lo que favorece la adhesión de microorganismos sobre los primeros.

8- El estudio efectuado para conocer la interacción entre los distintos sustratos y cinco microalgas de especies representativas demostró que la adhesión se ve favorecida en el caso de los materiales sintéticos. Con todo, estos materiales mostraron comportamientos distintos: los elaborados con micronizado de mármol de Carrara son más susceptibles de ser colonizados a mayor proporción de resina en la mezcla, lo contrario que en los elaborados con mármol de Macael.

9- La prueba complementaria de hidrofobicidad de las microalgas ofrece resultados cualitativos, que ponen de relieve el papel protagonista de la hidrofobicidad en los fenómenos de adhesión. De las cuatro especies analizadas en esta prueba, tres muestran un comportamiento eminentemente hidrófilo, mientras que una presenta alta hidrofobicidad.

10- En este trabajo se pone de manifiesto el interés en profundizar en las técnicas de análisis superficial de los sistemas implicados en procesos de deterioro, que han de particularizarse para cada caso concreto, conociendo a fondo sus limitaciones, presentes de ordinario en las aproximaciones exigidas cuando se trata de sistemas vivos y, por tanto, muy sensibles a los agentes externos. La aplicación de estas técnicas es indispensable para establecer las características ideales de los materiales a emplear en intervenciones de conservación y restauración.

BIBLIOGRAFÍA

- AHIMOU, F., PAQUOT, M., JACQUES, Ph., THONART, Ph. and ROUXHET, P.G. (2001) Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiological Methods*, 45: 119-126.
- AIT-LANGOMAZINO, N., SELIER, R., JOUQUET, G. and TRESCINSKI, M. (1991) Microbialdegradation of bitumen. *Experientia* 47, pp: 533-539.
- ALAKOMI, H.L., ARRIEN, N., GORBUSHINA, A.A., KRUMBEIN, W.E., MAXWELL, I., MCCULLAGH, C., ROBERTSON, P., ROSS, N., SAARELA, M., VALERO, J., VENDRELL, M. and YOUNG, M.E. (2004) Inhibitors of biofilm damage on mineral materials (Biodam). In: M. Klingspor Rotstein (ed.) *Proceedings of the 10th Int. Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, Stockholm, in press.
- ALBERTSSON, A-C. and KARLSSON, S. (1993) Aspects of biodeterioration of inert and degradable polymers. *International Biodeterioration and Biodegradation* 31 (3): 161-170.
- ALVÁREZ, A., ARGEMI, M., DE LAORDEN, V., DOMENECH, X., GERBAL, J., NAVARRO, A., PRADA, J.L., PUGES, M., ROCABAYERA, R. And VILASECA, L. (1994) Physical, chemical and biological weathering detected in the romanic portal of the Sant Quirze de Pedret church (XlIc.) In: V. Fassina, H. Ott, F. Zezza (eds.), *Conservation of Monuments in the Mediterranean Basin, Proceedings of the Third International Symposium*, Venice, June 22-25, pp: 365- 369.
- AMOROSO, G.G. and FASSINA, V. (1983) *Stone decay and conservation*. Materials Science Monographs II. New York, Elsevier.
- ARIÑO, X., HERNÁNDEZ-MARINÉ, M.C. and SAIZ-JIMENEZ, C. (1997) Colonization of Roman tombs by calcifying cyanobacteria. *Phycologia* 36 (5): 366-373.

- ASCASO, C., GALVAN, J. and RODRIGUEZ, C. (1982). The Weathering of Calcareous Rocks by Lichens. *Pedobiologia* 24: 219-229.
- ASCASO, C., WIERZCHOS, J. and CASTELLO, R. (1998) Study on the biogenic deterioration on calcarenite stone caused by endolithic lichens and microorganisms. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 42: 29-38.
- ASHURST, J. and ASHURST, N. (1988) *Practical building conservation*. Gower Technical Press, Aldershot, England.
- ATLAS, R.M., CHOWDHURY, A.N. and GAURI, K.L. (1988) Microbial calcification of gypsum-rock and sulphated marble. *Studies in Conservation* 33 (3):149-153.
- ATTRIDGE, G.G. (2002) La importancia del color. En: R.E. Jacobson, S.F. Ray, G.G. Attridge y N.R. Axford. *Manual de Fotografía*. Ed. Omega SA, Barcelona.
- BALDI, F.; IVOSEVIC, N.; MINACCI, A.; PEPI, M.; FANI, R.; SVETLICIC, V. and ZUTIC, V. (1999) Adhesion of *Acinetobacter venetianus* to diesel fuel droplets studied with in situ electrochemical and molecular probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 65-5: 2041-2048.
- BELLINZONI, A.M., CANEVA, G. and RICCI, S. (2003) Ecological trends in travertine colonisation by pioneer algae and plant communities. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51: 203-210.
- BERMÚDEZ PAREJA, J. (1972) *Palacios de Comares y Leones*. Obra Cultural de la Caja de Ahorros de Granada.
- BERMÚDEZ PAREJA, J. (1974) *El Generalife*. Caja General de Ahorros y Monte de Piedad, Granada.
- BERMÚDEZ PAREJA, J. (1977) *El Partal y la Alhambra alta*. Caja General de Ahorros y Monte de Piedad, Granada.
- BOCK, E., SAND, W., MEINCKE, M., WOLTERS, B., AHLERS, B., MEYER, C. and SAMELUCK, F. (1987). Biologically induced corrosion of natural stones-Strong contamination of monuments with Nitrifying organisms. In: D.R. Houghton, R.N. Smith and H.O.W. Eggins (eds.), *Biodeterioration 7*. Elsevier Applied Science, pp: 436-440.
- BOLÍVAR GALIANO, F.C. (1994) *Diagnosis y tratamiento del deterioro por microalgas en los Palacios Nazaríes de la Alhambra*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

- BOLÍVAR GALIANO, F. y GARCÍA ROWE, J. (1994) Biodeterioro en la Fuente del Claustro Pricipal del Hospital San Juan de Dios (Granada). *Cuadernos de Arte de la Universidad de Granada*, 24: 197- 203.
- BOLÍVAR, F.C. and SANCHEZ-CASTILLO, P.M. (1995) Preliminary results on the study of the algae biodeterioration within the Alhambra. In: A. Boshier, M.Chandra Ad R. Edyvean (eds.), *The 9th International Biodeterioration & Biodegradation Symposium*. Institution of Chemical Engineers, Rugby, pp: 210-217.
- BOLÍVAR, F.C. y SÁNCHEZ CASTILLO, P.M. (1996) Evaluación de los Tratamientos Algicidas realizados en la Alhambra. En: E. Sebastián Pardo, I. Valverde Espinosa y U. Zezza (eds.), *Libro de Comunicaciones del III Congreso Internacional de Rehabilitación del Patrimonio Arquitectónico y Edificación*. CEDES-MOPTA y Universidad de Granada, pp: 494-498.
- BOLÍVAR, F.C. y SANCHEZ-CASTILLO, P.M. (1997) Biomineralization Proceses in the Fountains of the Alhambra, Granada, Spain. *International Biodeterioration and Biodegradation* 40 (2-4): 205-215.
- BOLÍVAR, F.C. y SANCHEZ-CASTILLO, P.M. (1998) Biodeterioro del patrimonio artístico por cianobacterias, algas verdes y diatomeas. *Boletín PH*, 24: 52-63.
- BOONAERT, C.J.P., ROUXHET, P.G. and DUFRÊNE, Y.F. (2000) Surface properties of microbial cells probed at the nanometre scale with atomic force microscopy. *Surface and Interface Analysis*, 30, 1, p 32-35.
- BOONAERT, C.J.P., DUFRÊNE, Y.F., DERCLAYE, S.R. and ROUXHET, P.G. (2001) Adhesion of *Lactococcus lactis* to model substrata: direct study of the interface. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 22: 171-182.
- BOONAERT, C.J.P., DUFRÊNE, Y.F. and ROUXHET, P.G. (2002) Adhesion (primary) of microorganisms onto surfaces, In: H.C. Flemming (ed.), *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, G. Bitton (ed.), *Biofilms*, Wiley, New York, pp: 113-132.
- BOROWITZKA, M.A. (1989) Calcification in Algae: initiation and control. In: S. Mann, J. Webb and R.J.P. Williams (eds.), *Biomineralization, chemical and biochemical perspectives*. VCH Verlag, Weinheim, pp: 63-94.
- BOS, R., VAN DER MEI, H. C. and BUSSCHER, H. J. (1999) Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions- its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews*, 23:179-229.
- BOURRELY, P. (1966) *Les algues d'eau douce. Les algues vertes*. Ed. Boubée & Cie., Paris

- BOURRELY, P. (1968) *Les algues d'eau douce. Les algues jaunes et brunes*. Ed. Boubée & Cie., Paris.
- BOURRELY, P. (1970) *Les algues d'eau douce. Les algues bleues et rouges*. Ed. Boubée & Cie., Paris.
- BOWEN, W.R., HILAL, N., LOVITT, R.W. and WRIGHT, C.J. (1999) Characterisation of membrane surfaces: direct measurement of biological adhesion using an atomic force microscope. *Journal of Membrane Science*, 154: 205-212.
- BRUEGGERHOFF, S., CHEBA, S., LEISEN, H. and WARSCHEID, T. (1999) Carbonate crusts on marble fragments of the excavation site in Milet, Turkey: examination of crust formation and first results of a cleaning concept. In: *ICOM-CC 12th Triennial Meeting, Lyon*. Vol.II, pp: 731-736.
- BRUGNARA, M., DELLA VOLPE, C., PENATI, A., SIBONI, S., POLI, T. and TONIOLO, L. (2003) Correct use of the contact angle in the evaluation of the protective action induced from polymer coating on the stone. *Annali di Chimica* 93 (11): 881-888.
- BURFORD, E.P., FOMINA, M. and GADD, G.M. (2003) Fungal involvement in bioweathering and biotransformation of rocks and minerals. *Mineralogical Magazine* 67 (6): 1127 -1155 (29).
- BUSSCHER, H.J. (1985) *Surface free energies and the adhesion of oral bacteria*. Rijksuniversiteit te Groningen
- BUSSCHER, H.J.; VAN PELT, A.W.J., DE BOER, P.; DE JONG, H.P. and ARENDS, J. (1984-a) The effect of surface roughening of polymers on measured contact angles of liquids. *Colloids and Surfaces*, 9: 319-331.
- BUSSCHER, H.J.; WEERKAMP, A.H.; VAN DER MEI, H.C.; VAN PELT, A.W.J.; DE JONG, H.P. and ARENDS, J. (1984-b) Measurement of the Surface Free Energy of Bacterial Cell Surfaces and Its Relevance for Adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, 48 (5): 980-983.
- BUSSCHER, H.J., VAN DE BELT-GRITTER, B. and VAN DER MEI, H.C. (1995) Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity. 1.Zeta potential of hydrocarbons droplets. *Colloids and Surfaces B*, 5: 111-116.
- CABRERA GARRIDO, J.M. (1979) Causas de alteración y métodos de conservación aplicables a monumentos hechos con piedra. *Revista Materiales de Construcción*, nº 147, p.8

- CANEVA, G. and ALTIERI, A. (1988) Biochemical mechanisms of stone weathering induced by plant growth. In: J. Ciabach (comp.), *6th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, vol.1 Nicholas Copernicus University Press Department, Torun, pp: 32-44.
- CANEVA, G. and SALVADORI, O. (1988) Biodeterioration of Stone. In: L. Lazzarini and R. Pieper (eds.), *Deterioration and Conservation of Stone*, Studies and Documents on Cultural Heritage 16, Unesco, Paris, pp:182-234.
- CANEVA, G., NUGARI, M.P., RICCI, S. and SALVADORI, O. (1992) Pitting of marble roman monuments and the related microflora. In: J. Delgado Rodrigues, F. Henriques and F. Telmo Jeremias (eds.), *7th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, Lisbon; pp: 521-529.
- CANEVA G., NUGARI M.P. e SALVADORI O. (1994). *Biologia nella conservazione delle opere d'arte*. Ed. Nardini, Firenze.
- CANTER-LUND, H. and LUND, W.G.J. (1995) *Freshwater algae*. Biopress Ltd., Bristol.
- CAPPITELLI, F., ZANARDINI, E. and SORLINI, C. (2004) The Biodeterioration of Synthetic Resins Used in Conservation. *Macromolecular Bioscience* 4 (4): 399-406.
- CARDIANO, P. (2003) Epoxy-silica hybrids as stone restoration materials. *Annali di Chimica* 93 (11): 947-958.
- CARO YUSTA, M.J. (2001) *Paseo por las fuentes del Alcázar de Sevilla*. Fundación Aparejadores, Sevilla
- CIARALLO, A., FESTA, L., PICCIOLI, C. and RANIELLO, M. (1985) Microflora action in the decay of stone monuments. In: G. Felix (ed.), *Proceedings of the 5th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, Press Polytechniques Romandes, Lausanne, vol 2, pp: 607-616.
- DANIN, A. (1983) Weathering of limestone in Jerusalem by cyanobacteria. *Journal of Geomorphology*, 27: 413-421.
- DARLEY, J.M. (1982) *Silicification and Calcification: mineralization in the Algae*. Algal biology: a physiological approach. Blackwell Scientific Publishers, London.
- DE LA TORRE, M.A., GOMEZ-ALARCON, G., MELGAREJO, P. and SAIZ-JIMENEZ C. (1991) Fungi in weathered sandstone from Salamanca cathedral, Spain. *The Science of the Total Environment* 107:159-168.

- DE WITTE, E., CHAROLA, A.R. and SHERRYL, R.P. (1985) Preliminary tests on commercial stone consolidants. In: *Vith International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, Laussane, pp: 709-718.
- DEL MONTE, M., SABBIONI, C. and ZAPPIA, G. (1987). A study of the patina called "scialbatura" on imperial roman marbles. *Studies in Conservation* 32: 114-121.
- DESIKACHARY, T.V. (ed.) (1980) *Taxonomy of the Algae*. University of Madras, India
- DORNIEDEN, T., GORBUSHINA, A. and KRUMBEIN, W.E. (2000) Patina: Physical and Chemical interactions of sub-aerial Biofilms with Objects of Art. In: O.Ciferri, P.Tiano and G. Mastromei (eds.), *Of Microbes and Art*, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, pp: 105-120.
- DUFRÊNE, Y.F., BOONAERT, C.J.P., GERIN, P.A., ASTHER, M. and ROUXHET, P.G. (1999) Direct probing of the surface ultrastructure and molecular interactions of dormant and germinating spores of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*, 181 (17), 5350-5354.
- DUFRÊNE, Y.F., BOONAERT, C.J.P., VAN DER MEI, H.C., BUSSCHER, H.J. and ROUXHET, P.G. (2001) Probing molecular interactions and mechanical properties of microbial cell surfaces by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 86 1-2, 113-120.
- DUKES, W.H. (1972) Conservation of Stone: Causes of decay. *Archeological Journal* 156: 429-432.
- EGINTON, P.J., GIBSON, H., HOLAH, J., HANDLEY, P.S. and GILBERT, P. (1995) The influence of substratum properties on the attachment of bacterial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 5:153-159.
- FATTOM, A. and SHILO, M. (1984) Hydrophobicity as an adhesion mechanism of benthic cyanobacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 47:135-143.
- FAVALI, M.A., BARBIERI, N. and BASSI, M. (1978) A green alga growing on a plastic film used to protect archeological remains. *International Biodeterioration Bulletin* 14: 89-93.
- FOGED, N. (1983) Diatoms of fountains, reservoirs and some other humid and dry localities in Rome (Italy). *Nova Hedwigia*, 38:433-470.
- FREDIANI, P, MANGANELLI DEL FA', C., MATTEOLI, U., TIANO, P. and GALLI, G. (1978). A methodological approach to the study of the deterioration of the

- stone in Boboli Garden. In: *UNESCO-RILEM International Symposium on Deterioration and Protection of Stone Monuments*, Paris, 7.4.
- FUSEY, P. et HYVERT, G. (1964) Les altérations physicochimiques et biologiques des gres des monuments Khmers. *Compets Rendus des Séances de l'Académie des Sciences*, 258: 6573-6575.
- FUSEY, P. and HYVERT, G. (1966) Biological deterioration of stone monuments in Cambodia. *Monograph of the Society for Chemical Industry*, 23: 125-129.
- GALLEGO Y BURÍN, A. (1996) *Granada; guía artistica e histórica de la ciudad*. Comares Ed., Granada.
- GARCÍA-PICHEL and CASTENHOLZ. (1991) Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *Journal of Phycology* 27: 395-409.
- GARCÍA-VALLÈS, M., URZÌ, C., DE LEO, F., SALAMONE, P. and VENDRELL-SAZ, M. (2000) Biological weathering and mineral deposits of the Belevi marble quarry (Ephesus, Turkey). *International Biodeterioration and Biodegradation*, 46 (3): 221-227.
- GARCIA-ROWE, J. and SAIZ-JIMENEZ, C. (1991) Lichens and Bryophytes as Agents of Deterioration of Building Materials in Spanish Cathedrals. *International Biodeterioration* 28: 151-163.
- GAYLARDE, P.M. and GAYLARDE, C.C. (1999) Algae and Cyanobacteria on Painted Surfaces in Southern Brazil. *Revista de Microbiologia*, 30: 209-213.
- GEHRMANN, C.K., PETERSEN, K. and KRUMBEIN, W.E. (1989). Silicole and calcicole lichens on jewish tombstones - Interactions with environment and biocorrosion, In: *Vith International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, Torun, Suppl. Vol., pp: 33-38.
- GIACCONE, G. VELLOCCIA RINALDI, M.L. and GIACOBINI, C. (1976). Forme biologiche delle alghe esistenti sulle sculture all'aperto. In: R. Rossi-Manaresi (Ed.), *The Conservation of Stone I*, Bologna, pp: 245-266.
- GIACOBINI, C., ANDREOLI, C., CASADORO, G., FUMANTI, B., LANZARA, P. and RASCIO, N. (1979) Una caratteristica alterazione delle murature e degli intonaci. In: *3° Congresso Internazionale sul Deterioramento e Conservazione della Pietra*, Venezia, pp: 289-299.
- GIACOBINI, C., ROCCARDI, A. e TIGLIÉ, I. (1986) Introduzione. Ricerche sul biodeterioramento. In: G. Biscoutin, *Manutenzione e conservazione del costruito fra tradizione ed innovazione*. Scienza e Beni Culturali, LP Ed., Padova, pp: 687, 690.

- GIACOBINI, C. e GIULIANI, M.R. (1987) Analisi biologiche. *Il restauro della "Barcaccia" in Piazza di Spagna*, M.G. Tolomeo Speranza (ed), La Repubblica, Assessorato alla Cultura, Comune di Roma, pp: 39-40.
- GIACOBINI, C., de CICCO, M.A., TIGLIE, I. and ACCARDO, G. (1987). Actinomycetes and Biodeterioration in the Field of Fine Art. In: D.R. Houghton, R.N. Smith and H.O.W. Eggins (Eds.), *Biodeterioration 7*. Elsevier Applied Science, pp: 418-427.
- GOLUBIC, S. (1969) Cyclic and noncyclic mechanisms in the formation of travertine. *Verh. International Verein. Limnology* 17: 956-961.
- GOLUBIC, S. (1973) The relationship between blue-green algae and carbonate deposits. In: NG Carr and BA Whitten (eds.), *The Biology of Blue Green Algae*, Blackwell, London, pp: 434-472.
- GOLUBIC, S. (1987) The role of Diatoms in Stromatolite growth from modern freshwater settings. *Journal of Phycology*, 23: 195-201.
- GOLUBIC, S., FRIEDMANN, I., and SCHNEIDER, J. (1981) The lithobiotic niche, with special reference to microorganisms. *Journal of Sedimentary Petrology*, 51: 475-478.
- GÓMEZ MORENO, M. (1994) *Guía de Granada*. Universidad de Granada.
- GONZÁLEZ, M.A., PARRA, O.O. y CIFUENTES, A.S. (1995) Técnicas de cultivo de microalgas en laboratorio. En: K.Alveal, M.E. Ferrario, E.C. Oliveira y E. Sar (eds.), *Manual de Métodos Ficológicos*, Universidad de Concepción, Chile, pp: 219-250.
- GONZALEZ ALCANTUD, J.A. y MALPICA CUELLO, A. (coords.) (1995) *El agua: mitos, ritos y realidades*. Anthropos, Barcelona.
- GONZÁLEZ-CABALLERO, F. and GARCÍA LÓPEZ-DURÁN, J.D. (2000) Suspensión Formulation. In: F. Nielloud and G.Marti-Mestres (eds.), *Pharmaceutical Emulsions and Suspensions*, Laboratoire de Technique Pharmaceutique Industrielle, Univ. Montpellier I, pp:127-190.
- GONZÁLEZ RAMÍREZ, M.I. (1995) *El trazado geométrico en la ornamentación del Alcázar de Sevilla*. Universidad de Sevilla. Consejería de Obras Públicas y Transportes. Sevilla.
- GORBUSHINA, A.A. and KRUMBEIN, W.E. (2000) Microbial effects on subaerial rock surfaces. In: R.E. Riding and S.M. Awramik (eds.), *Microbial Sediments*, Spinger, Berlin, pp: 161-170.

- GORBUSHINA, A.A., LYAKOVA, N.N., VLASOV, D.Yu. and KHIZHNYAK, T.V. (2002) Microbial Communities on the Monuments of Moscow and St. Petersburg: Biodiversity and Trophic Relations. *Microbiology*, 71 (3): 350-356.
- GRABAR, O. (1986) *La Alhambra: iconografía, formas y valores*. Alianza Forma, Madrid.
- GRIFFIN, P.S., INDICTOR, N. and KOESTLER, R.J. (1991) The biodeterioration of stone, a review of deterioration mechanisms: Conservation case histories and treatment. *International Biodeterioration*, 28: 187-207.
- GROTH, I. and SAIZ-JIMENEZ, C. (1999) Actinomycetes in hypogean environments. *Geomicrobiology Journal*, 16:1-8.
- GU, J.D. (2003) Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 52: 69-91.
- GU, J.D. and MITCHELL, R. (1996). Microbial degradation of fiber-reinforced polymers. *American Society of Microbiology Proceedings Q-237*.
- HAZLETT, R.D. (1993) On surface roughness effects in wetting phenomena. In: K.L. Mittal (ed.), *Contact angle, wettability and adhesion*, VSP, Utrecht, pp: 173-181.
- HITA VILLAVERDE, E. (2001) *El mundo del color. Desde lo perceptivo y artístico a lo científico*. Univ. de Granada.
- HSU, B.M. and HUANG, C. (2002) Influence of ionic strength and pH on hydrophobicity and zeta potential of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Colloids and Surfaces, Physicochemical and Engineering Aspects*, 201: 201-206.
- HUECK-VAN DER PLAS, E.H. (1965) The biodeterioration of materials as a part of hydrobiology. *Material und Organismen* 1 (1):5-34.
- HUECK-VAN DER PLAS, E.H. (1968) The microbiological deterioration of porous building materials. *International Biodeterioration Bulletin* 4(1):11-28.
- IONITA, I. (1971) Contributions to the study of the biodeterioration of works of art and historic monuments, 3: Species of fungi isolated from stone monuments. *Reviste Roum. Biologie Botanique* 16(6): 433-436.
- ITAVAARA, M. and VIKMAN, M. (1995) A simple screening test for studying the biodegradability of insoluble polymers. *Chemosphere*, 31(11-12): 4359-4373.
- JAIN, K.K, MISHRA, A.K. and SINGH, T. (1993) Biodeterioration of Stone: a review of mechanisms involved. In: K.L.Garg, Neelima Garg, and K.G.Mukerji

(eds.), *Recent Advances in Biodeterioration and Biodegradation*, vol.1, Naya Prokash, Calcutta, pp: 323-354.

- KAWAGUCHI, T. and DECHO, A.W. (2002) A laboratory investigation of cyanobacterial extracellular polymeric secretions (EPS) in influencing CaCO₃ polymorphism. *Journal of Crystal Growth*, 240: 230-235.
- KELLER, W.D. and FREDERICKSON, A.F. (1952) Role of plants and colloidal acids in the mechanisms of weathering. *American Journal of Science* 250: 594-608.
- KOESTLER, R.J. (2000) Polymers and resins as food for microbes. In: O.Ciferri, P.Tiano and G. Mastromei (eds.), *Of Microbes and Art*, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, pp: 153-168.
- KOESTLER, R.J. and SANTORO, E.D. (1988) Assessment of the susceptibility to biodeterioration of selected polymers and resins. In: *Project Report to the Getty Conservation Institute*, Los Angeles, CA. xi, p.98.
- KOESTLER, R.J., CHAROLA, A.E., WYPSKI, M. and LEE, J.J. (1985) Microbiologically induced deterioration of dolomitic and calcitic stone as viewed by scanning electron microscopy. In: G. Felix (ed.), *Proceedings of the 5th Int. congress on deterioration and conservation of stone*, Presses Polytechniques Romandes, Lausanne, Vol. 2., pp. 617-626.
- KREPSKY, N., BARRETO ROCHA FERREIRA, R., FERREIRA NUNES, A. P., GARCIA CASADO LINS, U., COSTA E SILVA FILHO, F., DE MATTOS-GUARALDI, A. L. and REGINA NETTO-DOSSANTOS, K. (2003) Cell Surface Hydrophobicity and Slime Production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian Isolates. *Current Microbiology* 46 (4) : 280 - 286.
- KRETZ, R. (1983) Symbols for rock-forming minerals. *American Mineralogist*, 68: 277-279.
- KRUMBEIN, W.E. (1991) Studies on the Biodeterioration of Marbles and colour changes related to it. En: *Simposio Internacional sobre Biodeterioro*. Libro de Resúmenes, Madrid, 25-27 Septiembre, p. 33.
- KRUMBEIN, W.E. (2003) Patina and cultural heritage-a geomicrobiologist's perspective. In: R. Kozłowski (ed.), *Proceedings of the 5th European Commission Conference "Cultural Heritage Research: a Pan European Challenge"*, Cracow, 16-18 May 2002, pp: 39-47.
- KRUMBEIN, W.E. and URZÌ, C. (1993) Biodeterioration processes of monuments as a part of (man-made?) global climate change. In: M.J. Thiel (ed.), *Conservation of Stone and other Materials*, vol. 2: Prevention and treatments, Paris, pp: 558-564.

- KRUMBEIN, W.E., DIAKUMAKU, PETERSON, WARSCHEID and URZÌ, C. (1993) Interactions of microbes with consolidants and biocides used in the Conservation of rocks and mural paintings. In: M.J. Thiel (ed.), *Conservation of Stone and Other Materials*, Vol. 2: Prevention and treatments, Paris, pp: 589 - 596.
- LAMENTI, G., TIANO, P. And TOMASELLI, L. (2000) Biodeterioration of ornamental marble statues in the Boboli Gardens (Florence, Italy). *Journal of Applied Phycology*, 12:427- 433.
- LEE, R.E. (1989) *Phycology*. Cambridge Universty Press, New York.
- LEZNICKA, S., STRZELCZYK, A. and WANDRYCHOWSKA, D. (1988). Removing fungal stains from stone works. In: *Vith International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, Torun, Suppl. Vol., pp: 102-110.
- LEZNICKA, S., KUROCZKIN, J., KRUMBEIN, W.E., STRZELCZYK, A.B. and PETERSEN, K. (1991) Studies on the growth of selected fungal strains on limestones impregnated with silicone resins (Steinfestiger H and Elastosil E-41). *International Biodeterioration* 28 (1-4):91-111.
- LOBATO DOMÍNGUEZ, J. y MARTÍN ESTEBAN, Á. (1999) *Reales Alcázares de Sevilla*. Ed. Escudo de Oro, Barcelona.
- LOWENSTAM, H.A. (1981) Minerals formed by organisms. *Science*, 211: 1126-1131.
- MATTEINI, M. e MOLES, A. (1998) *Scienza e Restauro. Metodi di indagine*. Nardini ed., Firenze.
- MARÍN FIDALGO, A. (1992) *El Alcázar de Sevilla*. Guadalquivir Ed., Sevilla.
- MARTÍN RAMOS, J.D. (1990) *Programa de control y análisis del difractorómetro de rayos X*. Dep. Leg. M-11719.
- MARTINES, G.G. (1983) Marmo e restauro dei monumenti antichi: Estetica delle rovine, degrado delle strutture all'aperto, un'ipotesi di lavoro. In: Enrico Dolci (ed.), *Marmo Restauro-Situazioni e Prospettive: Atti del convegno*, Carrara, 31 maggio 1983, Internazionale Marmi e Macchine, Carrara, pp:83-92.
- MARTÍNEZ JUSTICIA, M.J. (trad.) (1990) *Carta del Restauro de 1987*. Colegio de Arquitectos de Málaga.
- MARTÍNEZ JUSTICIA, M.J. (1996) *Antología de textos sobre restauración*. Universidad de Jaén.
- MATTEINI, M. e MOLES, A. (1990) *Scienza e Restauro*. Ed. Nardini, Firenze.

- MAY, E. (2003). Microbes on building stone- for good or ill? *Culture*, 24 (2): 5-8.
- MAY, E., LEWIS, F.J., PEREIRA, S., TAYLER, S., SEAWARD M.R.D. and ALLSOPP, D. (1993) Microbial deterioration of building stone: a review. *Biodeterioration Abstracts* 7 (2): 109-123.
- MAZZOLA, M. FREDIANI, P., BRACCI, S. and SALVINI, A. (2003) New strategies for the síntesis of partially fluorinated acrylic polymers as posible materials for the protection of stone monuments. *European Polymer Journal* 39 :1995-2003.
- MELO, M.J., BRACCI, S., CAMAITI, M., CHIANTORE, O. and PIACENTI, F. (1999) Photodegradation of acrylic resins used in the conservation of stone. *Polymer Degradation and Stability* 66: 23-30.
- MISHRA, A.K., GARG, K.L., JAIN, K.K., KAMLAKAR, G. and RAO, V.P. (1995) Microbiological deterioration of stone: an overview. In: G.Kamlakar and V. Pandit Rao (eds.), *Conservation, Preservation and Restoration: Traditions, Trends and Techniques*, Birla Archeological and Cultural Reseach Institute, Hyderabad, pp:217-228.
- MONTE SILA, M. and TARANTINO, G. (1981). The metabolic state of microorganisms of the genus Thiobacillus on stone monuments. In: R. Rossi-Manaresi (Ed), *The Conservation of Stone II - Part A*, Bologna, pp: 117-138.
- MORTON, I.H.G.; GREENWAY, D.L.A.; GAYLARDE, C.C. and SURMAN, S.B. (1998) Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *International Biodeterioration and Biodegradation* 41: 247-259.
- MÜLLER-STEINHAGEN, H., ZHAO, Q. HELALI-ZADEH, A. and REN, X.G. (2000) The effects of surface properties on CaSO₄ scale formation during convective heat transfer and subcooled flow boiling. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 78: 12-20.
- ORTEGA-CALVO, J.J., HERNÁNDEZ-MARINÉ, M.C. y SAIZ-JIMÉNEZ, C. (1991) Biodeterioro de Edificios Históricos por Cianobacterias y Algas. En: *Simposio Internacional sobre Biodeterioro*. Madrid, 25-27 Septiembre, Libro de Resúmenes, p. 61.
- ORTEGA-CALVO, J.J., HERNÁNDEZ-MARINÉ, M.C. and SAIZ-JIMENEZ, C. (1993) Cianobacteria and algae on historic buildings and monuments. *Recent advances in Biodeterioration and Biodegradation*, 1: 173-203.
- PAPIDA, S.; MURPHY, W. and MAY, E. (2000) Enhancement of physical weathering of building stone by microbial populations. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 46: 305-317.

- PERAZA-ZURITA, Y., BOLÍVAR-GALIANO, F. and SÁNCHEZ-CASTILLO, P. (2004) Artificial marble stones as a solution for biodeterioration by microalgae on monumental fountains (abstract). In: *International Biodeterioration and Biodegradation* 53, p. 257.
- PEDRI, L. (2002) *Interaction of Bacteria with Hydrophobic and Hydrophilic interfaces*. PhD Thesis, Lakehead University, Ontario, Canada.
- PEMBREY, R.S., MARSHALL, K.C. and SCHNEIDER, R.P. (1999) Cell Surface Analysis Techniques: What do Cell Preparation Protocols do to Cell Surface Properties? *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (7): 2877- 2894.
- PETUSHKOVA, J. and KANDYBA, P. (1999) Aeromicrobiological studies in the Moscow cathedrals. *Aerobiologia* 15: 193- 201.
- PIERRES, A., BENOLIEL, A.M. and BONGRAND, P. (2002) Cell fitting to adhesive surfaces: a prerequisite to firm attachment and subsequent events. *European Cells and Materials* 3: 31-45.
- PINCHUK, L.S., MAKAREVICH, A.V., VLASOVA, G.M., KRAVTSOV, A.G. and SHAPOVALOV, V.A. (2004) Electret-thermal analysis to assess biodegradation of polymer composites. *International Biodeterioration and Biodegradation* 54 (1): 13-18.
- PLENDERLEITH, H.J. (1968) Problems in the preservation of monuments. In: *The Conservation of Cultural Property, with special reference to Tropical Conditions*, Unesco, Paris, pp: 124-134.
- POCHON, J. and JATON, C. (1967) The role of microbiological agencies in the deterioration of stone. *Chemistry and Industry*, 9: 1587-1589.
- POLI, T., TONIOLO, L. and CHIANTORE, O. (2004) The protection of different Italian marbles with two partially flourinated acrylic copolymers. *Applied Physics A: Materials Science & Processing* 79: 347-351.
- POWERS, J. M., HOSTETLER, R.W. and DENNISON, J.B. (1979) Thermal expansion of composite resins and sealants. *Journal of Dental Research* 58(2): 584-587.
- RAMCHANDRAN, T.N. (1953) Preservation of monuments. *Ancient India*, 9: 170-198.
- RASHMI R.D., MAJI, T.K. and BANERJEE, A. N. (2004) Studies on dimensional stability and thermal properties of rubber wood chemically modified with

- styrene and glycidyl methacrylate. *Journal of Applied Polymer Science* 93 (4): 1938-1945.
- RAYNAL, F. (1999) Science for the rescue of old building. *Label France*, 35/4. Ministry of Foreign Affairs, France.
- RICCI, S. and PIETRINI, A.M. (1994). Characterization of the microfloral algae present on the Fountain of Four Rivers, Rome. In: V. Fascina, H. Ott, F. Zezza (eds.), *III International Symposium on the Conservation of Monuments in the Mediterranean Basin*, 22-25 June, Venice, pp. 353-357.
- RICHARDSON, B.A. (1976). Control of moss, lichen and algae on stone. In: R. Rossi-Manaresi (Ed.), *The Conservation of Stone I*, Bologna, pp: 225- 231.
- RODRÍGUEZ-NAVARRO, C., RODRÍGUEZ-GALLEGO, M., BEN CHEKROUM, K. and GONZÁLEZ-MUÑOZ, M.T. (2003) Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus* -Induced carbonate biomineralization. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (4): 2182-2193.
- ROIG SALOM, J.L. (1995) *Estudio de la alteración de materiales pétreos en los monumentos de la ciudad de Valencia. Posibles tratamientos de conservación*. Tesis Doctoral. Univ. Politécnica de Valencia.
- ROIG-SALOM, J.L., DOMÉNECH-CARBÓ, M.T., DE LA CRUZ-CAÑIZARES, J., BOLÍVAR-GALIANO, F., PELUFO-CARBONELL, M.J. and PERAZA-ZURITA, Y. (2003) SEM/EDX and vis spectrophotometry study of the stability of resin-bound mortars used for casting replicas and filling missing parts of historic stone fountains. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 375 (8): 1176-1181.
- RÖNNER, U., HUSMARK, U. and HENRIKSSON, A. (1990) Adhesion of *Bacillus* spores in relation to hydrophobicity. *Journal of Applied Bacteriology*, 69: 550-556.
- ROSENBERG, M., GUTNICK, D.L. and ROSENBERG, E. (1980) Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9: 29-33.
- ROUND, F.E., CRAWFORD, R.M. and MANN, D.G. (1990) *The diatoms: biology and morphology of the genera*. Cambridge University Press.
- SAIZ-JIMENEZ, C. (1999) Biogeochemistry of Weathering processes in monuments. *Geomicrobiology Journal*, 16: 27-37.
- SÁNCHEZ CASTILLO, P.M. y BOLÍVAR GALIANO, F.C. (1997) Caracterización de comunidades algales epilíticas en fuentes monumentales y su aplicación a la diagnosis del biodeterioro. *Limnética* 13 (1): 31-46.

- SAND, W. (1997) Microbial Mechanisms of Deterioration of Inorganic Substrates- a general mechanistic overview. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 40 (2-4): 183-190.
- SARRÓ, M.I.; GARCÍA, A.M.; RIVALTA, V.M.; MORENO, D.A.; ARROYO, I. (2004) Bioensuciamiento de la Fuente de los Leones de la Alhambra de Granada (España). En: *Actas del VIII Congreso Nacional de Materiales*, Valencia, 15-17 jun: 263-272.
- SCHAFFER, R.J. (1972) *The Weathering of Natural Building Stones*. Building Research Special Report, 18. Her Majesty's Stationery Office, London.
- SEAL, K.J. (1988) The biodeterioration and biodegradation of naturally occurring and synthetic plastic polymers. *Biodeterioration Abstracts* 2: 295-317.
- SECO de LUCENA, L. (1919) *Guía breve de Granada*. Sta. Paula, Granada.
- SELWITZ, Ch. (1992) *Epoxy resins in Stone Conservation*. Research in Conservation, The Getty Conservation Institute, Los Angeles.
- SENGUPTA, R. (1979) Protecting our stone monuments. *Science Reports* (April): 230-236.
- SORLINI, C., FALAPPI, D. and RANALLI, G. (1991) Biodeterioration Preliminary Tests on Serena Stone treated with Resins. *Annals of Microbiology* 41: 71-79.
- SPERANZA, G., GOTTARDI, G., PEDERZOLLI, C., LUNELLI, L., CANTERI, R., PASQUARDINI, L., CARLI, E., LUI, A., MANIGLIO, D., BRUGNARA, M. and ANDERLE, M. (2004) Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces. *Biomaterials* 25: 2029-2037.
- STAMBOLOV, T. and van ASPEREN de BOER, J.R.J. (1967) *The deterioration and conservation of porous building materials in monuments: A preliminary review*. ICOM, Brussels.
- STOKEN, K. and COBIAN, K. (1982) Polyether polyurethanes for implantable pacemaker leads. *Biomaterials* 3(4): 225-31.
- STREVETT, K.A. and CHEN, G. (2003) Microbial surface thermodynamics and applications. *Research in Microbiology*, 154 (5): 329-335(7).
- STRZELCZYK, A.B. (1981) Stone. In: A.H. Rose (ed.), *Microbial Deterioration*, Vol.6 of Economic Microbiology. Academic Press, London, pp: 61-80.

- TAKAMURA, N., FUNIE, K. and WATANABE, M.M. (1989) Effects of Cu, Cd and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae. *Journal of Applied Phycology*, 1: 39-52.
- TAKAMURA, N., FUNIE, K. and WATANABE, M.M. (1990) Unique response of Cyanophyceae to copper. *Journal of Applied Phycology*, 2: 293-296.
- TIANO, P. (1986) Problemi biologici nella conservazione delle opere in marmo esposte all'aperto. In: *Restauro del marmo. Opere e problemi*, OPD Restauro, Ministero per i Beni Culturali ed Ambientali, Firenze, pp: 47-53.
- TIANO, P. (1987) Biological deterioration of exposed works of art made of stone. In: LHG Morton (ed.), *The biodeterioration of constructional materials*, Biodeterioration Society. Lancashire Pol., pp: 37-44.
- TIANO, P., ACCOLLA, P. and TOMASELLI, L. (1993) Effectiveness of some biocides against algal biodeterioration. In: M.J. Thiel (ed.), *Conservation of Stone and other Materials*, vol. 2: Prevention and treatments, Paris, pp: 573-580.
- TIANO, P., CAMAITI, M., and ACCOLLA, P. (1995) Methods for the evaluation of products against algal biocoenosis of monumental fountains. In: *ICCROM Int. Colloquium on Methods of Evaluating Products for the Conservation of Porous Building Materials in Monuments*, Roma, pp: 75-86.
- TOMASELLI, L., MARGHERI, M.C. and FLORENZANO, G. (1979). Indagine sperimentale sul ruolo dei cianobatteri e delle microalghe nel deterioramento di monumenti e affreschi. In: *3° Congresso Internazionale sul Deterioramento e Conservazione della Pietra*, Venezia, pp: 313- 325.
- TOMASELLI, L., LAMENTI, G., BOSCO, M. and TIANO, P. (2000-a) Biodiversity of photosynthetic micro-organisms dwelling on stone monuments. *International Biodeterioration and Biodegradation. Special Issue- Biodeterioration of Cultural Property* 46: 251-258.
- TOMASELLI, L., TIANO, P. and LAMENTI, G. (2000-b) Occurrence and fluctuation in photosynthetic biocoenoses dwelling on stone monuments. In: O.Ciferri, P.Tiano and G. Mastromei (eds.), *Of Microbes and Art*, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, pp: 63-76.
- URZÌ, C. and KRUMBEIN, W.E. (1994) Microbial impacts on the Cultural Heritage. In: *Durability and Change: The Science, Responsibility, and Cost of Sustaining Cultural Heritage*. W.E. Krumbein, P. Brimbelcombe, D.E. Cosgrove and S. Staniforth (eds.), Wiley and Sons Ltd., Chichester, pp: 107-135.

- URZÌ, C. and DE LEO, F. (2001) Sampling with adhesive tape strips: an easy and rapid method to monitor microbial colonization on monument surfaces. *Journal of Microbiology Methods* 44:1-11.
- URZÌ, C., BRUSETTI, L., SALAMONE, P., SORLINI, C., STACKEBRANDT, E. and DAFFOMCHIO, D. (2001-a) Biodiversity of Geodermatophilaceae isolated from altered stones and monuments in the Mediterranean basin. *Environmental Microbiology*, 3(7): 471-479.
- URZÌ, C., DE LEO, F., SALAMONE, P. and CRISEO, G. (2001-b). Airborne fungal spores connected with marble colonisation, monitored in the terrace of Messina Museum. *Aerobiologia* 17:11-17.
- VAN DEN HOEK, C., MANN, D.G. and JAHNS, H.M. (1995) *Algae. An introduction to Phycology*. Cambridge University Press.
- VAN DER MEI, H.C., VAN DE BELT-GRITTER, B., POUWELS, P.H. and BUSSCHER, H.J. (2002) Cell surface hydrophobicity is conveyed by S-layer proteins- a study in recombinant *Lactobacilli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 28 (2-3): 127-134.
- VAN OSS, C. J. (1994) *Interfacial Forces in Aqueous Media*. Marcel Dekker (ed.), New York.
- VILES, H.A. and MOSES, C.A. (1996) SEM based studies of the combined effects of salt and biological weathering on calcareous building stones. In: J. Riederer (ed.), *Deterioration and Conservation of Stone, Proceedings of the Eight International Congress*, Berlin, September 30- October 4, pp: 557- 561.
- WARKE, P.A. and SMITH, B.J. (1998) Effects of direct and indirect heating on the validity of rock weathering simulation studies and durability tests. *Geomorphology* 22: 347-357.
- WARSCHEID, T., BARROS, D., BECKER, T.W., ELIASARO, S., GROTE, G., JANSSEN, D., JUNG, L., MASCARENHAS, S.P.B., MAZZONI, M.L., PETERSEN, K., SIMONOES, E.S., MOREIRA, Y.K. and KRUMBEIN, W.E. (1992) Biodeterioration studies on soapstone, quartzite and sandstone of historical monuments in Brazil and Germany: Preliminary results and evaluation for restoration practices. In: J. Delgado Rodrigues, F. Henriques and F. Telmo Jeremias (eds.), *7th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone, Lisbon, Portugal*, pp: 491-500.
- WEBER, H. and ZINSMEISTER, K. (1991) *Conservation of Natural Stone*. Expert-Verlag, Ehningen.

- WEBLEY, D.M., HENDERSON, M.E.F. and TAYLOR, E.F. (1963). The microbiology of rocks and weathered stones. *Journal of Soil Science* 14: 102-112.
- WEGE, H.A. (2002) *Interacciones Físicas en Interfases de Interés Biológico. Estudio Termodinámico y Cinético*. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- WENDLER, E. and PRASARTSET, C. (1999) Lichen growth on old Khmer-style sandstone monuments in Thailand: damage factor or shelter? In: *ICOM-CC 12th Triennial Meeting, Lyon*. Vol.II, pp: 750-755.
- WETHERBEE, R., LIND, J.L., BURKE, J. and QUATRANO, R.S. (1998) The first kiss: establishment and control of initial adhesion by raphid diatoms. *Journal of Phycology* 34: 9-15.
- WILLIAMS, D.F. and ZHONG, S.P.(1994) Biodeterioration /biodegradation of polymeric medical device in situ. *International Biodeterioration and Biodegradation* 34: 95-130.
- WINKLER, E.M. (1975) Stone decay by plants and animals. *Stone: Properties, durability in man's environment*, pp: 154-163.
- WOLLENIEN, U., DE HOOG, G.S., KRUMBEIN, W.E. and URZÌ C. (1995) On the isolation of microcolonial fungi occurring on and in marble and other calcareous rocks. *The Science of the Total Environment* 167: 287-294.
- YATES, T. and BUTLIN, R. (1996) Predicting the weathering of Portland limestone buildings. In: B.J. Smith, P.A. Warke (eds.), *Processes of Urban Stone Decay, Proceedings of SWAPNET '95*, Belfast, May 19-20, pp: 194-204.
- YOUNG, G.S. and WAINWRIGHT, I.N.M. (1995) The control of algal biodeterioration of a marble petroglyph site. *Studies in Conservation*, 40:82-92.
- ZANARDINI, E., ABBRUSCATO, P., GHEDINI, N., REALINI, M. and SORLINI, C. (2000) Influence of atmospheric pollutants on the biodeterioration of stone. *International Biodeterioration & Biodegradation*, (45): 35-42.
- ZHANG, Y. and MILLER, R. M. (1992) Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Applied and Environment Microbiology* 58: 3276-3282.
- ZEZZA, U. y SEBASTIÁN PARDO, E. (1992) El mármol de Macael (Almería) en los monumentos históricos de Granada (España). En: *I Congreso Internacional de Rehabilitación del Patrimonio Arquitectónico y Edificación, I. Canarias*, pp:153-160.

ANEXOS

ANEXO I

ESPECIES EN FUENTES: CATALOGACIÓN

Géneros algales identificados en los distintos puntos de muestreo: el complejo monumental de la Alhambra, la fuente de Bibatauín, y los Reales Alcázares de Sevilla.

Leyenda:

N- N° de muestreo

M- N° de muestra

P- Proporción de cada género en la muestra analizada:

- 1: del 1 al 10%
- 2: del 10 al 25%
- 3: del 25 al 50%
- 4: del 50 al 75%
- 5: del 75 al 100%

B- Biotipos:

I- unicelulares

III- agrs. no gelatinosos

V- filamentos sin vaina

II- agregados gelatinosos

IV- pseudoparénquimas

VI- filamentos con vaina

Alhambra.

N	M	CLASE	GÉNERO	P	B	OBSERVACIONES
1	1	Diatomeas	<i>Navicula</i>	2	I	Estratos finos diferenciados. Presencia de quistes naranjas.
		Clorofíceas	<i>Chroococcus</i>	2	II	
			<i>Chlorosarcinopsis</i>	3	II	
			<i>Chlorosarcina</i>	2	II	
			<i>Apatococcus</i>	+	III	
	2	Diatomeas	<i>Nitzschia</i>	+	I	Idem.
		Clorofíceas	<i>Planophila sp</i>	1	II	
		Cianofíceas	<i>Phormidium</i>	1	VI	
	3	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	4	II	Materia mineral en estratos finos, casi fundidos entre sí. Presencia de quistes naranjas.
			<i>Chlorella</i>	+	VI	
			<i>Coccomyxa</i>	1	VI	
		Cianofíceas	<i>Calothrix</i>	2		
		<i>Phormidium</i>	+			
4	Diatomeas	<i>Nitzschia</i>	+	I	Estratos bien diferenciados. Quistes naranjas.	
		<i>Navicula</i>	1	I		
	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	3	II		
	Cianofíceas	<i>Calothrix</i>	+	VI		
5	Diatomeas	<i>Cymbella</i>	+	I	Estratos bien diferenciados.	
		<i>Amphora</i>	+	I		
	Clorofíceas	<i>Tetracystis</i>	4	II		
		<i>Apatococcus</i>	1	III		
		<i>Chlorella</i>	+	III		
	Cianofíceas	<i>Phormidium</i>	3	VI		
		<i>Symploca</i>	+	VI		
6	Diatomeas	<i>Navicula</i>	+	I	Estratos bien diferenciados. Quistes naranjas. Costra compacta.	
	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	2	II		
		<i>Coccomyxa</i>	2	III		
7	Cianofíceas	<i>Phormidium</i>	3	VI	Costra compacta.	
8	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	3	II	Estratos bien diferenciados. Quistes naranjas.	
		<i>Planophila</i>	1	II		
		<i>Chlorella</i>	1	I		
9	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	2	II	Estratos bien diferenciados.	
	Cianofíceas	<i>Phormidium</i>	3	VI		
		<i>Calothrix</i>	1	VI		
10	Clorofíceas	<i>Tetracystis</i>	3	II	Idem.	
	Cianofíceas	<i>Phormidium</i>	1	VI		
		<i>Symploca</i>	+	VI		
11	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	3	II	Estratos bien diferenciados. Quistes naranjas.	
		<i>Planophila</i>	1	II		
	Cianofíceas	<i>Phormidium</i>	2	VI		
12	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	5	II	Idem.	
2	1	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	3	II	Materia mineral sin estratos.
	2	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	5	II	Estratos bien diferenciados.

3	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	+	II	Materia mineral sin estratos. Quistes naranjas.
	Cianofíceas	<i>Phormidium</i>	1	VI	
		<i>Symploca</i>	1	VI	
4	Diatomeas	<i>Navicula</i>	1	I	Presencia de quistes naranjas.
	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	3	II	
	Cianofíceas	<i>Phormidium</i>	+	VI	
5	Diatomeas	<i>Navicula</i>	+	I	Estratos bien diferenciados.
	Clorofíceas	<i>Chlorosarcinopsis</i>	1	II	
		<i>Chlorosarcina?</i>	3	II	
	Cianofíceas	<i>Scenedesmus?</i>	1	III	
		<i>Phormidium</i>	2	VI	
6	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	4	II	Estratos bien diferenciados. Quistes naranjas.
	Cianofíceas	<i>Phormidium</i>	1	VI	
7	Diatomeas	<i>Nitzschia</i>	2	I	
	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	4	II	
8	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	3	II	Estratos bien diferenciados. Cianofíceas en cara interna: color marrón. Quistes naranjas.
		<i>Apatococcus</i>	+	III	
	Cianofíceas	<i>Phormidium</i>	4	VI	
		<i>Symploca</i>	1	VI	
9	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	1	II	Estratos bien diferenciados. Presencia de quistes naranjas.
	Cianofíceas	<i>Phormidium</i>	4	VI	
10	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	+	II	Estratos bien diferenciados. Quistes naranjas. Poca mat. org.
	Cianofíceas	<i>Phormidium</i>	2	VI	
11	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	3	II	Estratos bien diferenciados. Quistes naranjas.
12	Diatomeas	<i>Nitzschia</i>	1	I	Sin estratos. Muy poca materia orgánica.
	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	+	II	
		<i>Chlorella</i>	+	III	
	Cianofíceas	<i>Phormidium</i>	+	VI	

Bibatauín.

N	M	CLASE	GÉNERO	P	B	OBSERVACIONES	
	1	Clorofíceas	<i>Ulothrix</i>	+	V		
			<i>Stichococcus</i>	+	V		
	2	Cianofíceas	<i>Chlorogloea</i>	4	II		Material mineral sin estratos. Color pardo.
			<i>Chroococciopsis</i>	2	II		
			<i>Phormidium</i>	1	VI		
	3	Clorofíceas Cianofíceas	<i>Cosmarium</i>	1	I		Pústulas marrones. Primeras etapas de carbonatación.
			<i>Chlorogloea</i>	1	II		
			<i>Chroococciopsis</i>	1	II		
			<i>Phormidium</i>	3	VI		
	4 - 10	Clorofíceas Cianofíceas	<i>Cosmarium</i>	4	I		
			<i>Phormidium</i>	1	VI		
	11	Diatomeas Clorofíceas Cianofíceas	<i>Achnantes</i>	+	I		Estratos minerales diferenciados
			<i>Navicula</i>	+	I		
			<i>Chroococcus</i>	1	II		
			<i>Ulothrix</i>	+	V		
			<i>Chamaesiphon</i>	3	IV		
	12	Clorofíceas Cianofíceas	<i>Cosmarium</i>	+	I		Material mineral sin estratos
			<i>Ulothrix</i>	+	V		
			<i>Chamaesiphon</i>	3	IV		
13	Cianofíceas	<i>Chlorogloea</i>	2	II	Estratos diferenciados		
		<i>Chamaesiphon</i>	3	IV			
		<i>Phormidium</i>	1	VI			
14	Clorofíceas Cianofíceas	<i>Stichococcus</i>	+	V			
		<i>Phormidium</i>	4	VI			
		<i>Symploca</i>	1	VI			
15	Cianofíceas	<i>Phormidium</i>	3	VI	Material mineral sin estratos		
		<i>Symploca</i>	2	VI			
16	Clorofíceas	<i>Chroococcus</i>	1	II	Material mineral sin estratos		
		<i>Planophila</i>	1	II			
17	Diatomeas Clorofíceas Cianofíceas	<i>Navicula</i>	1	I	Primeras etapas de carbonatación		
		<i>Nitzschia</i>	1	I			
		<i>Cosmarium</i>	+	I			
		<i>Chamaesiphon</i>	+	IV			
		<i>Phormidium</i>	3	VI			
18	Clorofíceas Cianofíceas	<i>Cosmarium</i>	2	I			
		<i>Chamaesiphon</i>	1	IV			
		<i>Phormidium</i>	2	VI			
19	Cianofíceas	<i>Chlorogloea</i>	2	II	Estratos bien diferenciados		
		<i>Pleurocapsa</i>	+	IV			
		<i>Phormidium</i>	2	VI			
		<i>Phormidium</i>	2	VI			
		<i>Symploca</i>	2	VI			

	20	Diatomeas Cianofíceas	<i>Tabellaria</i> <i>Chlorogloea</i> <i>Phormidium</i> <i>Symploca</i>	+ 1 2 2	I II VI VI	
	21	Diatomeas Cianofíceas	<i>Navicula</i> <i>Chroococidiopsis</i> <i>Phormidium</i> <i>Microcoleus</i>	+ 1 3 1	I II VI VI	Pústulas ligeramente carbonatadas
	22	Clorofíceas Cianofíceas	<i>Cosmarium</i> <i>Gloeocapsa</i> <i>Phormidium</i>	+ 3 1	I II VI	
	23	Clorofíceas Cianofíceas	<i>Chroococidiopsis</i> <i>Phormidium</i>	1 2	II VI	
	24	Cianofíceas	<i>Phormidium</i>	3	VI	
	25	Diatomeas	<i>Navicula</i>	1	I	
		Cianofíceas	<i>Chroococidiopsis</i> <i>Pleurocapsa</i> <i>Phormidium</i>	2 1 3	II IV VI	

Reales Alcázares.

N	M	CLASE	GÉNERO	P	B	OBSERVACIONES
1	1	Diatomeas	<i>Epitemia</i>	2	I	Sin estratos
		Clorofíceas	<i>Nitzschia</i>	+	I	
			<i>Chroococcus</i>	1	II	
	Cianofíceas	<i>Chlorella</i>	1	III		
		<i>Calothrix</i>	3	VI		
	<i>Phormidium</i>	2	VI			
	2	Cianofíceas	<i>Calothrix</i>	4	VI	Materia mineral en estratos muy finos, casi fundidos entre sí.
	<i>Phormidium</i>	1	VI			
	3	Diatomeas	<i>Epitemia</i>	+	I	Presencia de quistes naranjas.
		Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	2	II	
			<i>Planophila</i>	1	II	
			<i>Tetracystis</i>	3	II	
Cianofíceas		<i>Phormidium</i>	1	VI		
<i>Calothrix</i>	+	VI				
4	Diatomeas	<i>Epitemia</i>	2	I	Mucha materia mineral, sin formar costras ni estratos	
	Cianofíceas	<i>Nitzschia</i>	+	I		
5	Cianofíceas	<i>Phormidium</i>	+	VI		
		<i>Phormidium</i>	+	VI		
6	Diatomeas	<i>Epitemia</i>	3	I	Sin estratos	
	Clorofíceas	<i>Nitzschia</i>	4	I		
		<i>Ulothrix</i>	1	V		
		<i>Stichococcus</i>	+	V		
	Cianofíceas	<i>Phormidium</i>	1	VI		
		<i>Phormidium</i>	1	VI		
2	1	Diatomeas	<i>Nitzschia</i>	+	I	Materia mineral sin formar costra ni estratos.
		Clorofíceas	<i>Chlorella?</i>	2	III	
		Cianofíceas	<i>Calothrix</i>	3	VI	
			<i>Symploca</i>	1	VI	
	2	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	2	II	Quistes naranjas.
			<i>Planophila</i>	1	II	
			<i>Calothrix</i>	3	VI	
		Cianofíceas	<i>Phormidium</i>	2	VI	
			<i>Symploca</i>	1	VI	
	3	Clorofíceas	<i>Tetracystis</i>	1	II	Muestra seca. Muy poca mat.org.
4	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	3	II	Muestra seca. Quistes naranjas.	
		<i>Tetracystis</i>	2	II		
5	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	1	II	Muestra seca. Muy poca mat.org. Estratos bien diferenciados.	
		<i>Chroococcus</i>	2	II		
		<i>Planophila</i>	1	II		

6	Diatomeas	<i>Nitzschia</i>	+	I	
		<i>Epitemia</i>	+	I	
	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	3	II	
		<i>Chlorella?</i>	2	III	
	Cianofíceas	<i>Calothrix</i>	4	VI	
7	Diatomeas	<i>Synedra</i>	+	I	Materia mineral sin estratos.
		<i>Nitzschia</i>	+	I	
	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	2	II	
	Cianofíceas	<i>Calothrix</i>	4	VI	
		<i>Phormidium</i>	3	VI	
8	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	+	II	Muestra seca. Estratos muy finos. Costra frágil.
	Cianofíceas	<i>Calothrix</i>	2	VI	
		<i>Symploca</i>	3	VI	
9	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	1	II	Materia mineral sin estratos.
	Cianofíceas	<i>Calothrix</i>	2	VI	
		<i>Phormidium</i>	+	VI	
10	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	1	II	
	Cianofíceas	<i>Calothrix</i>	4	VI	
		<i>Phormidium</i>	3	VI	
11	Diatomeas	<i>Nitzschia</i>	1	I	Materia mineral sin estratos. Quistes naranjas.
		<i>Navicula</i>	+	I	
	Clorofíceas	<i>Tetracystis</i>	1	II	
	Cianofíceas	<i>Calothrix</i>	3	VI	
		<i>Phormidium</i>	4	VI	
12	Cianofíceas	<i>Calothrix</i>	5	VI	Idem.
13	Clorofíceas	<i>Chroococcus?</i>	3	II	Materia mineral sin estratos.
	Cianofíceas	<i>Calothrix</i>	4	VI	
		<i>Phormidium</i>	1	VI	
14	Diatomeas	<i>Nitzschia</i>	1	I	Idem.
	Clorofíceas	<i>Tetracystis?</i>	+	II	
	Cianofíceas	<i>Calothrix</i>	3	VI	
		<i>Phormidium</i>	2	VI	
15	Diatomeas	<i>Nitzschia</i>	+	I	Costra frágil.
		<i>Navicula</i>	+	I	
		<i>Cymbella</i>	+	I	
	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	2	II	
		<i>Apatococcus?</i>	1	III	
		<i>Chlorella</i>	+	III	
	Cianofíceas	<i>Calothrix</i>	2	VI	
	<i>Phormidium</i>	1	VI		
16	Diatomeas	<i>Epitemia</i>	2	I	Materia mineral sin estratos. Quistes naranjas.
	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	2	II	
	Cianofíceas	<i>Calothrix</i>	2	VI	
		<i>Phormidium</i>	2	VI	
		<i>Symploca</i>	2	VI	
17	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	1	II	Materia mineral en estratos muy finos. Quistes naranjas.
		<i>Stichococcus</i>	+	V	
	Cianofíceas	<i>Calothrix</i>	4	VI	

18	Diatomeas	<i>Navicula</i>	+	I	Sin estratos.
		<i>Cymbella</i>	+	I	
	Cianofíceas	<i>Calothrix</i>	+	VI	
		<i>Phormidium</i>	+	VI	
19	Diatomeas	<i>Epitemia</i>	1	I	Quistes naranjas.
		<i>Nitzschia</i>	2	I	
		<i>Melosira</i>	+	IV	
		<i>Synedra</i>	+	I	
	Clorofíceas	<i>Chlorosarcina</i>	2	II	
	Cianofíceas	<i>Calothrix</i>	+	VI	
		<i>Phormidium</i>	3	VI	

ANEXO II

COLORIMETRÍA

Datos obtenidos en el análisis colorimétrico para las distintas muestras estudiadas.

Patrón Photo-Research

Colorimetric-Data

1.736e+002 1.841e+002 1.566e+002 (X,Y,Z) 0.3375 0.3580 0.3045 (x,y,z)
0.2039 0.3244 (u,v)
0.2039 0.4866 (u',v')

A03ex1 Photo-Research

Colorimetric-Data

6.679e+001 7.233e+001 4.999e+001 (X,Y,Z) 0.3532 0.3825 0.2644 (x,y,z)
0.2052 0.3334 (u,v)
0.2052 0.5001 (u',v')

A03in1 Photo-Research

Colorimetric-Data

2.916e+001 3.174e+001 1.753e+001 (X,Y,Z) 0.3718 0.4046 0.2236 (x,y,z)
0.2091 0.3414 (u,v)

A08001 Photo-Research

Colorimetric-Data

4.684e+001 4.991e+001 3.047e+001 (X,Y,Z) 0.3682 0.3923 0.2395 (x,y,z)
0.2113 0.3376 (u,v)
0.2113 0.5065 (u',v')
0.2091 0.5121 (u',v')

A08002 Photo-Research

Colorimetric-Data

2.113e+001 2.272e+001 1.216e+001 (X,Y,Z) 0.3773 0.4056 0.2171 (x,y,z)
0.2122 0.3422 (u,v)

B09ex1 Photo-Research

Colorimetric-Data

9.001e+001 9.578e+001 6.358e+001 (X,Y,Z) 0.3609 0.3841 0.2550 (x,y,z)
0.2096 0.3346 (u,v)
0.2096 0.5019 (u',v')

B09in1 Photo-Research**PR-704**

Colorimetric-Data

3.854e+001 4.024e+001 2.227e+001 (X,Y,Z) 0.3814 0.3982 0.2204 (x,y,z)
0.2175 0.3406 (u,v)
0.2175 0.5108 (u',v')

B09in2 Photo-Research

Colorimetric-Data

3.603e+001 3.553e+001 1.737e+001 (X,Y,Z) 0.4051 0.3996 0.1953 (x,y,z)
0.2320 0.3432 (u,v)
0.2320 0.5149 (u',v')

B10ex1 Photo-Research

Colorimetric-Data

9.834e+001 1.025e+002 6.404e+001 (X,Y,Z) 0.3713 0.3869 0.2418 (x,y,z)
0.2153 0.3364 (u,v)
0.2153 0.5046 (u',v')
0.2122 0.5132 (u',v')

B10in1 Photo-Research

Colorimetric-Data

1.102e+002 1.136e+002 5.651e+001 (X,Y,Z) 0.3930 0.4053 0.2016 (x,y,z)
0.2221 0.3436 (u,v)
0.2221 0.5154 (u',v')

B10in2 Photo-Research

Colorimetric-Data

1.098e+002 1.139e+002 7.031e+001 (X,Y,Z) 0.3734 0.3874 0.2391 (x,y,z)
0.2164 0.3368 (u,v)
0.2164 0.5052 (u',v')

B13ex1 Photo-Research

Colorimetric-Data

1.254e+002 1.307e+002 8.113e+001 (X,Y,Z) 0.3719 0.3876 0.2405 (x,y,z)
0.2153 0.3367 (u,v)
0.2153 0.5050 (u',v')

B13in1 Photo-Research

Colorimetric-Data

6.459e+001 6.720e+001 3.724e+001 (X,Y,Z) 0.3821 0.3976 0.2203 (x,y,z)
0.2181 0.3405 (u,v)
0.2181 0.5107 (u',v')

B15Aex1 Photo-Research

Colorimetric-Data

5.623e+001 5.741e+001 3.444e+001 (X,Y,Z) 0.3797 0.3877 0.2326 (x,y,z)
0.2204 0.3375 (u,v)
0.2204 0.5062 (u',v')

B15Aex2 Photo-Research

Colorimetric-Data

5.415e+001 5.429e+001 2.695e+001 (X,Y,Z) 0.4000 0.4010 0.1991 (x,y,z)
0.2282 0.3431 (u,v)
0.2282 0.5147 (u',v')

B15Ain1 Photo-Research

Colorimetric-Data

1.496e+002 1.568e+002 1.250e+002 (X,Y,Z) 0.3467 0.3635 0.2898 (x,y,z)
0.2080 0.3270 (u,v)
0.2080 0.4906 (u',v')

B15Ain2 Photo-Research

Colorimetric-Data

6.278e+001 5.998e+001 1.669e+001 (X,Y,Z) 0.4502 0.4301 0.1197 (x,y,z)
0.2480 0.3554 (u,v)
0.2480 0.5331 (u',v')

B15Ain3 Photo-Research

Colorimetric-Data

1.577e+002 1.604e+002 9.459e+001 (X,Y,Z) 0.3822 0.3886 0.2292 (x,y,z)
0.2216 0.3380 (u,v)
0.2216 0.5070 (u',v')

B15Bex1 Photo-Research

Colorimetric-Data

5.599e+001 5.743e+001 3.307e+001 (X,Y,Z) 0.3822 0.3920 0.2258 (x,y,z)
0.2203 0.3389 (u,v)
0.2203 0.5084 (u',v')

B15Bin1 Photo-Research

Colorimetric-Data

6.264e+001 6.234e+001 2.440e+001 (X,Y,Z) 0.4193 0.4173 0.1633 (x,y,z)
0.2340 0.3493 (u,v)
0.2340 0.5239 (u',v')

B15Bin2 Photo-Research

Colorimetric-Data

1.302e+002 1.321e+002 8.198e+001 (X,Y,Z) 0.3781 0.3837 0.2381 (x,y,z)
0.2209 0.3362 (u,v)
0.2209 0.5043 (u',v')

B15Bin3 Photo-Research

Colorimetric-Data

8.824e+001 9.267e+001 7.046e+001 (X,Y,Z) 0.3510 0.3687 0.2803 (x,y,z)
0.2089 0.3291 (u,v)
0.2089 0.4936 (u',v')

B15Bin4 Photo-Research

Colorimetric-Data

8.369e+001 8.466e+001 3.709e+001 (X,Y,Z) 0.4073 0.4121 0.1806 (x,y,z)
0.2285 0.3468 (u,v)
0.2285 0.5201 (u',v')

B17001 Photo-Research

Colorimetric-Data

1.051e+002 1.092e+002 7.169e+001 (X,Y,Z) 0.3675 0.3818 0.2507 (x,y,z)
0.2147 0.3346 (u,v)
0.2147 0.5019 (u',v')

B17002 Photo-Research

Colorimetric-Data

8.122e+001 7.772e+001 3.234e+001 (X,Y,Z) 0.4246 0.4063 0.1691 (x,y,z)
0.2417 0.3470 (u,v)
0.2417 0.5204 (u',v')

B20ex1 Photo-Research

Colorimetric-Data

6.213e+001 6.539e+001 4.619e+001 (X,Y,Z) 0.3577 0.3764 0.2659 (x,y,z)
0.2104 0.3321 (u,v)
0.2104 0.4981 (u',v')

B20in1 Photo-Research

Colorimetric-Data

1.770e+001 2.048e+001 8.611e+000 (X,Y,Z) 0.3783 0.4377 0.1840 (x,y,z)
0.2019 0.3504 (u,v)
0.2019 0.5255 (u',v')

B20in2 Photo-Research

Colorimetric-Data

5.999e+001 6.228e+001 3.561e+001 (X,Y,Z) 0.3800 0.3945 0.2256 (x,y,z)
0.2179 0.3394 (u,v)
0.2179 0.5091 (u',v')

C05ex1 Photo-Research

Colorimetric-Data

5.308e+001 5.228e+001 2.779e+001 (X,Y,Z) 0.3987 0.3926 0.2087 (x,y,z)
0.2307 0.3407 (u,v)
0.2307 0.5111 (u',v')

C05ex2 Photo-Research

Colorimetric-Data

8.048e+001 8.310e+001 5.267e+001 (X,Y,Z) 0.3722 0.3843 0.2436 (x,y,z)
0.2168 0.3358 (u,v)
0.2168 0.5036 (u',v')

C05ex3 Photo-Research

Colorimetric-Data

4.960e+001 5.343e+001 3.654e+001 (X,Y,Z) 0.3554 0.3828 0.2618 (x,y,z)
0.2065 0.3337 (u,v)
0.2065 0.5006 (u',v')

C05in1 Photo-Research

Colorimetric-Data

1.563e+002 1.638e+002 1.123e+002 (X,Y,Z) 0.3614 0.3789 0.2597 (x,y,z)
0.2119 0.3332 (u,v)
0.2119 0.4997 (u',v')

C05in2 Photo-Research

Colorimetric-Data

9.097e+001 1.013e+002 6.584e+001 (X,Y,Z) 0.3524 0.3925 0.2551 (x,y,z)
0.2012 0.3362 (u,v)
0.2012 0.5043 (u',v')

C13001 Photo-Research

Colorimetric-Data

6.910e+001 7.811e+001 5.375e+001 (X,Y,Z) 0.3438 0.3887 0.2675 (x,y,z)
0.1971 0.3343 (u,v)
0.1971 0.5014 (u',v')

C13002 Photo-Research

Colorimetric-Data

4.779e+001 5.285e+001 3.253e+001 (X,Y,Z) 0.3588 0.3969 0.2443 (x,y,z)
0.2038 0.3380 (u,v)
0.2038 0.5070 (u',v')

DCex1 Photo-Research

Colorimetric-Data

6.374e+001 6.689e+001 4.219e+001 (X,Y,Z) 0.3688 0.3871 0.2441 (x,y,z)
0.2136 0.3362 (u,v)
0.2136 0.5043 (u',v')

Dlex1 Photo-Research

Colorimetric-Data

1.435e+002 1.506e+002 1.081e+002 (X,Y,Z) 0.3568 0.3745 0.2687 (x,y,z)
0.2105 0.3314 (u,v)
0.2105 0.4971 (u',v')

Dlex2 Photo-Research

Colorimetric-Data

1.238e+002 1.242e+002 7.336e+001 (X,Y,Z) 0.3852 0.3866 0.2282 (x,y,z)
0.2243 0.3377 (u,v)
0.2243 0.5065 (u',v')

Dlex3 Photo-Research

Colorimetric-Data

8.556e+001 9.201e+001 5.218e+001 (X,Y,Z) 0.3724 0.4005 0.2271 (x,y,z)
0.2110 0.3403 (u,v)
0.2110 0.5105 (u',v')

Dlin1 Photo-Research

Colorimetric-Data

8.740e+001 9.041e+001 5.166e+001 (X,Y,Z) 0.3809 0.3940 0.2251 (x,y,z)
0.2187 0.3393 (u,v)
0.2187 0.5090 (u',v')

Dlin2 Photo-Research

Colorimetric-Data

3.226e+001 3.596e+001 1.681e+001 (X,Y,Z) 0.3794 0.4229 0.1977 (x,y,z)
0.2074 0.3468 (u,v)
0.2074 0.5202 (u',v')

DJex1 Photo-Research

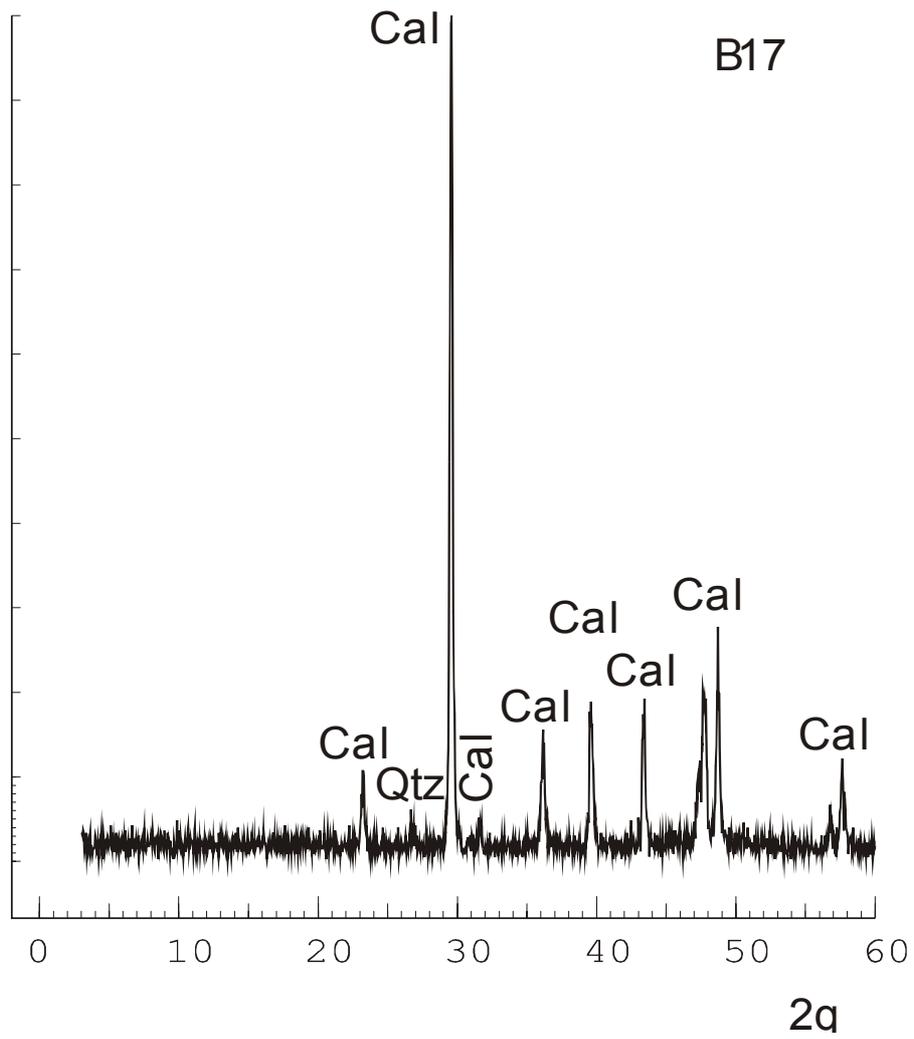
Colorimetric-Data

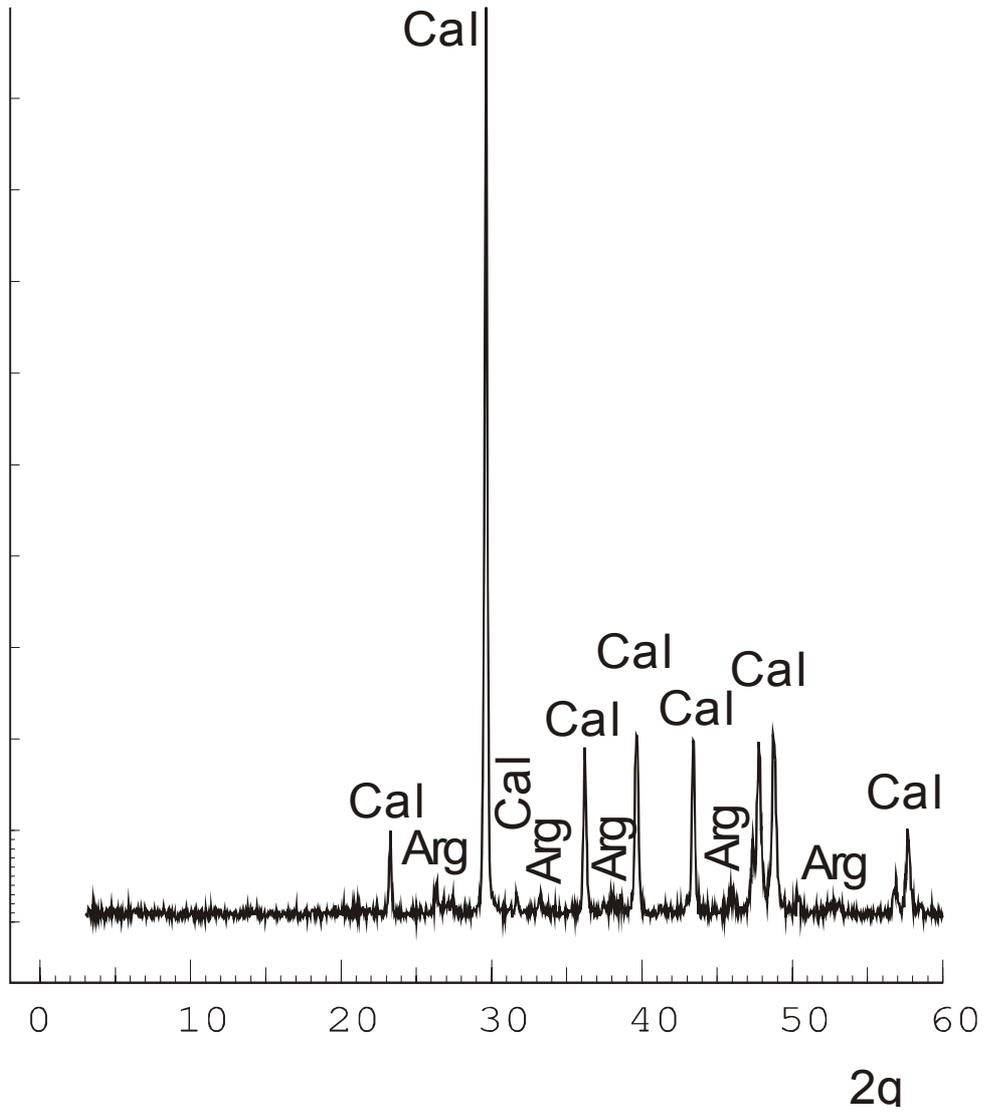
7.576e+001 7.822e+001 4.557e+001 (X,Y,Z) 0.3797 0.3920 0.2284 (x,y,z)
0.2187 0.3387 (u,v)
0.2187 0.5080 (u',v')

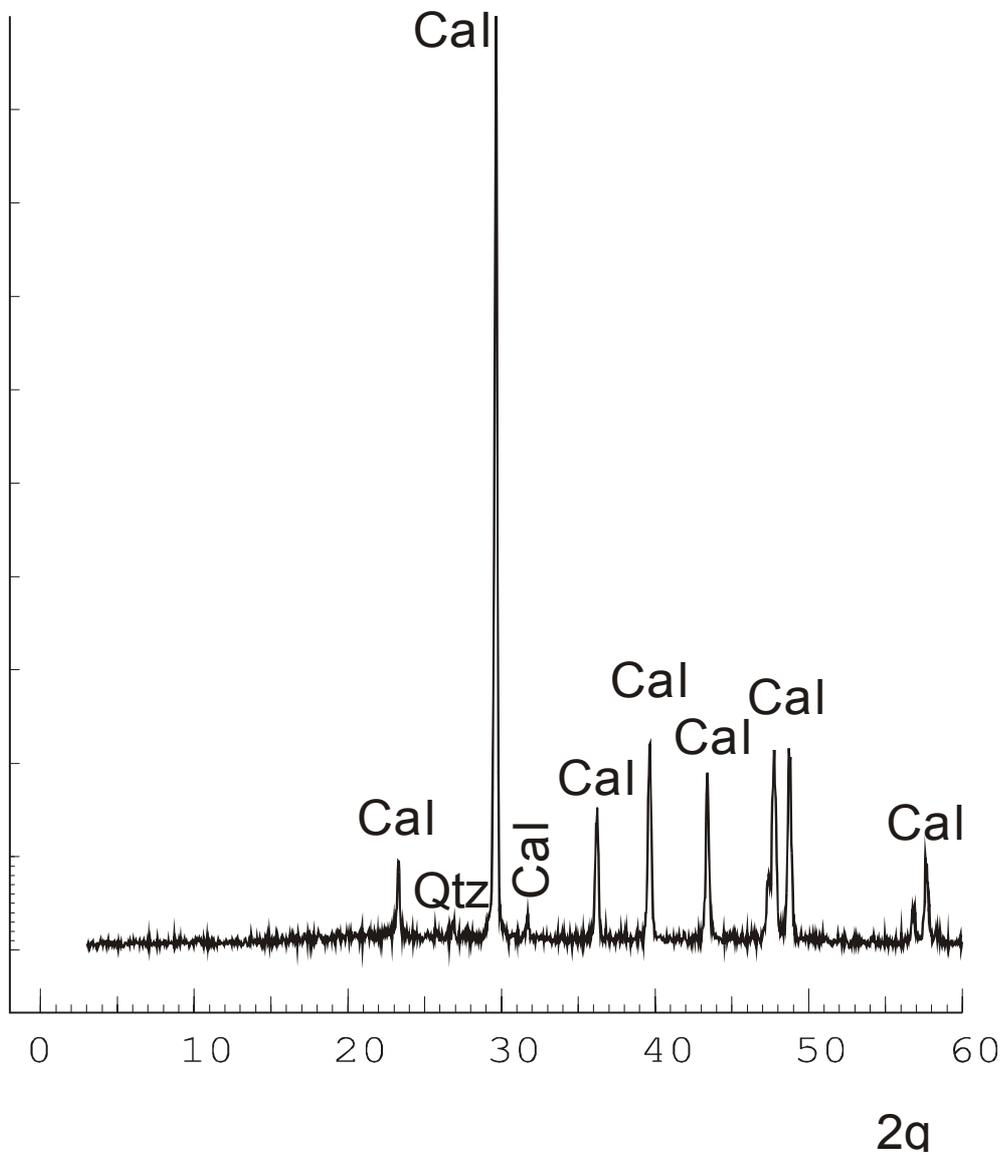
ANEXO III

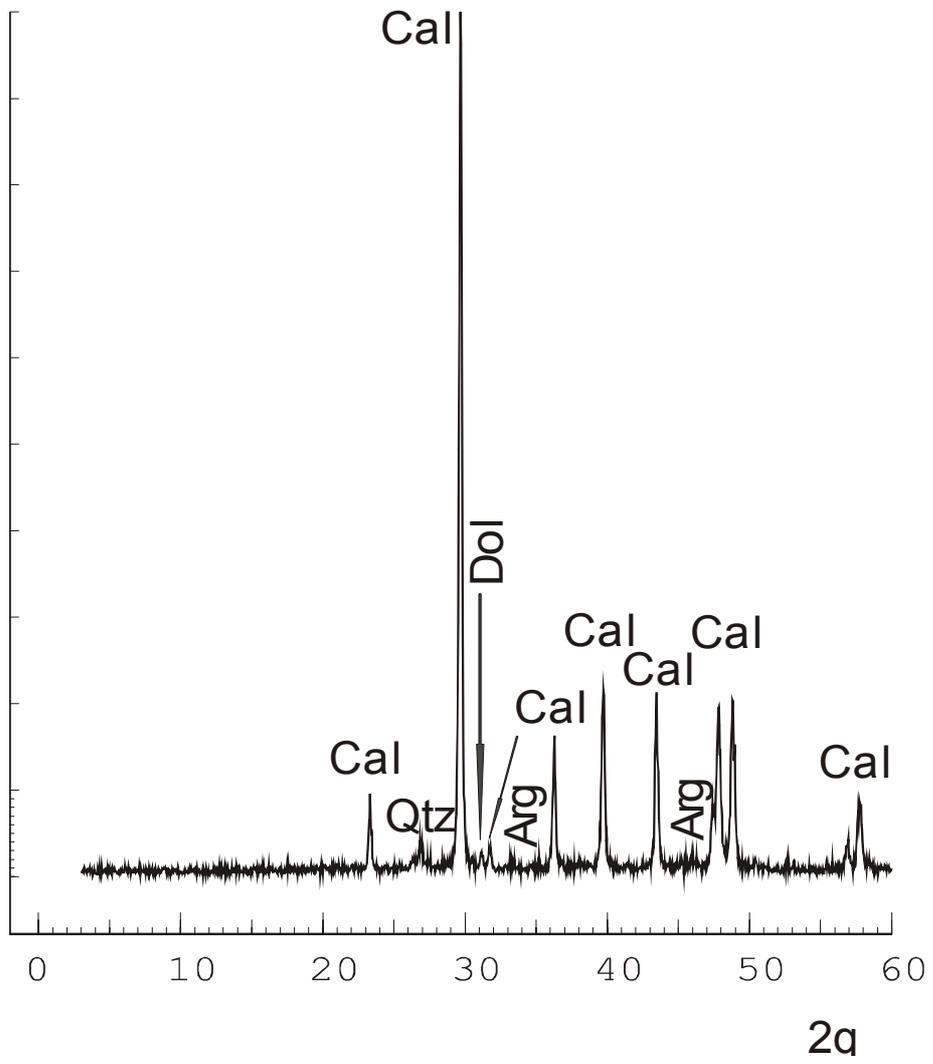
DIFRACTOGRAMAS

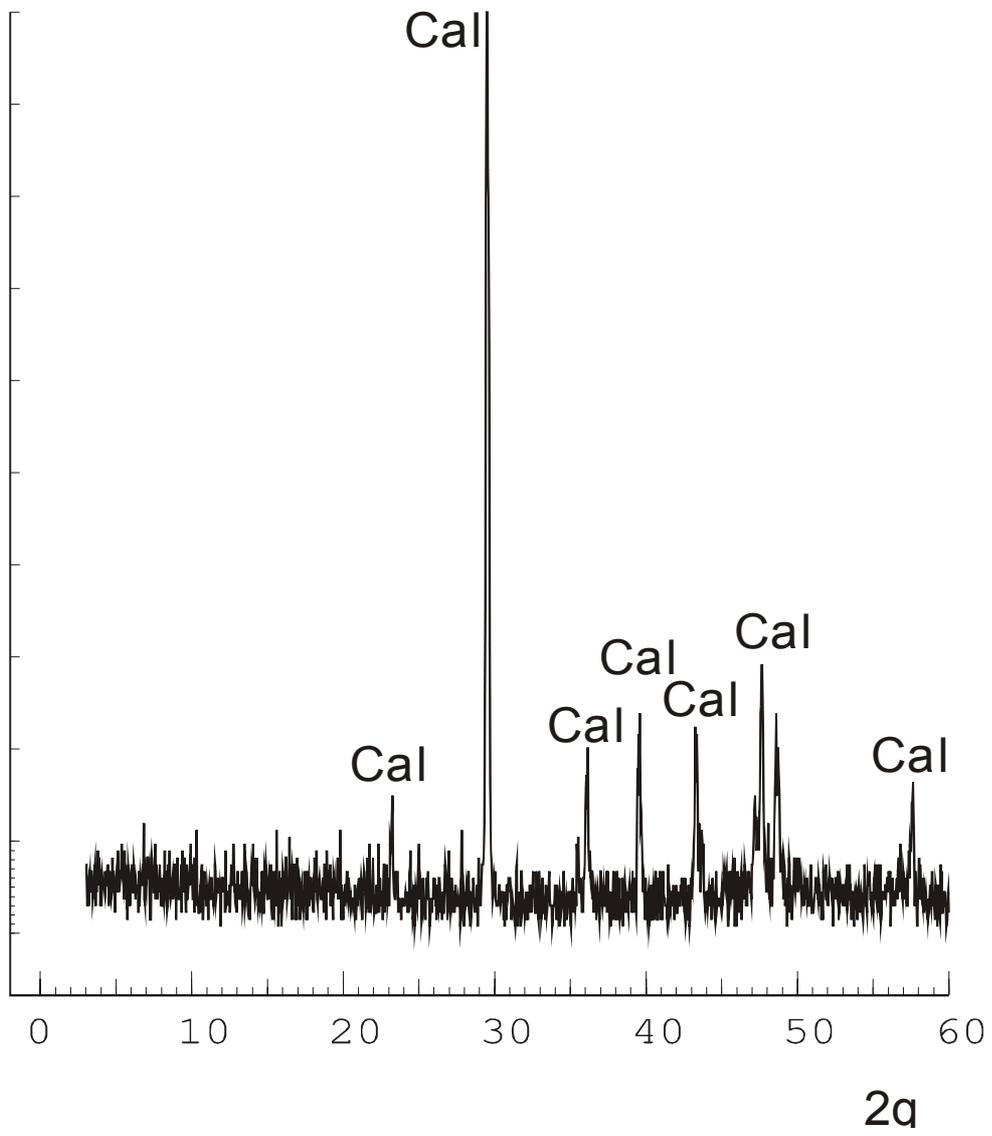
ALHAMBRA



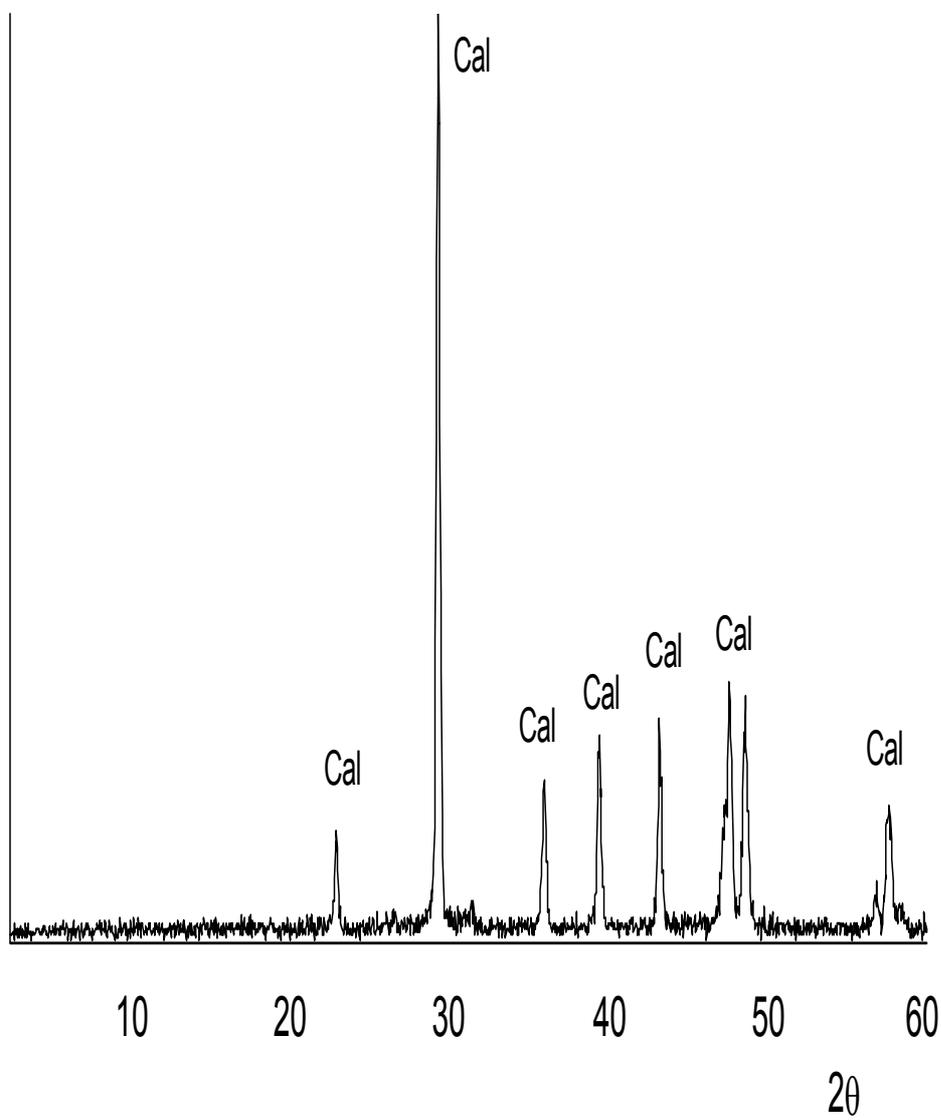


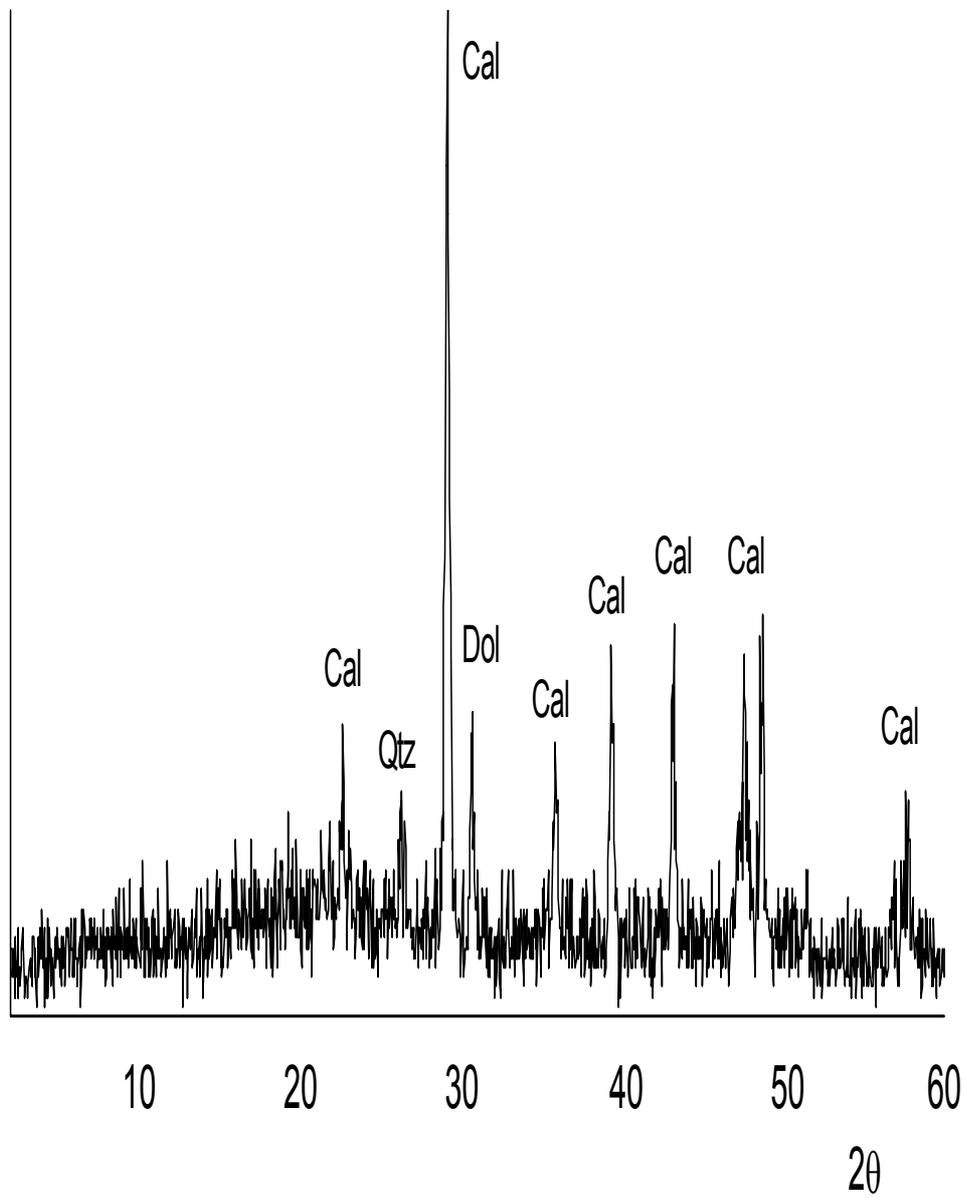


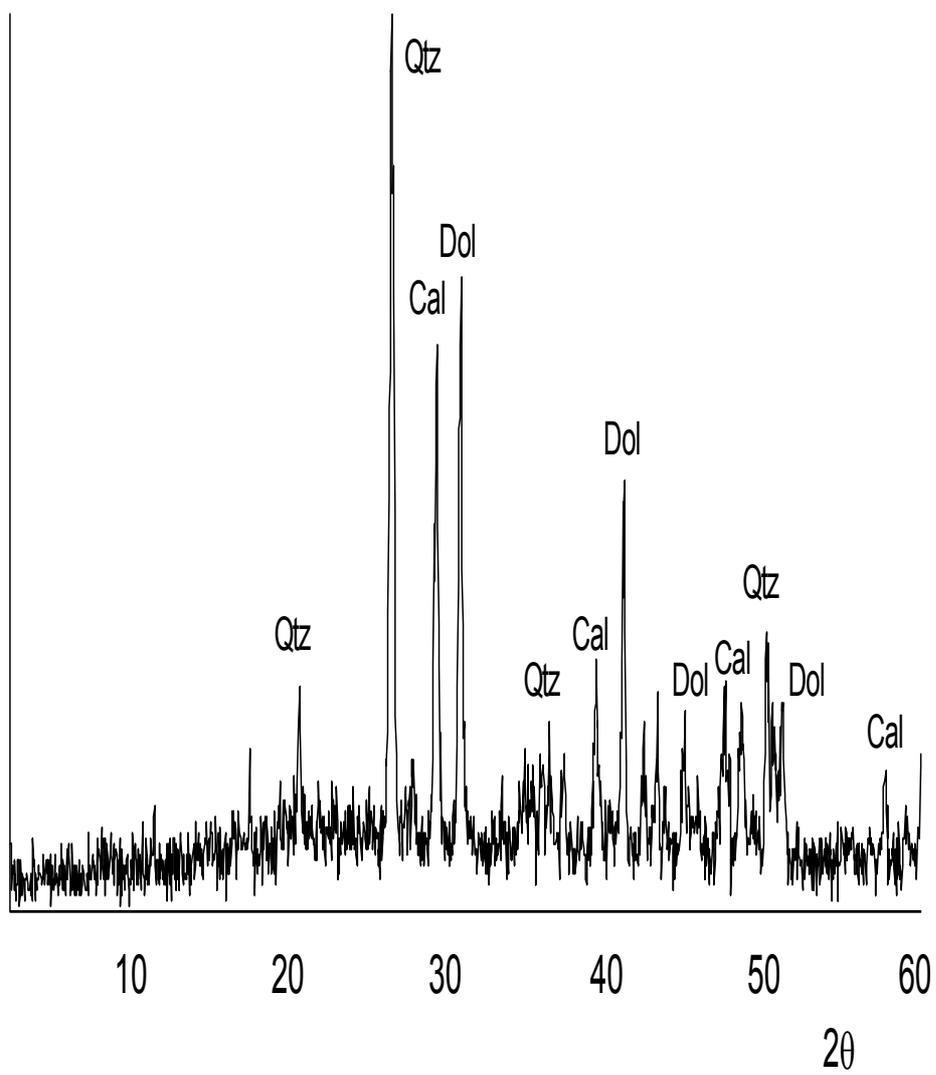


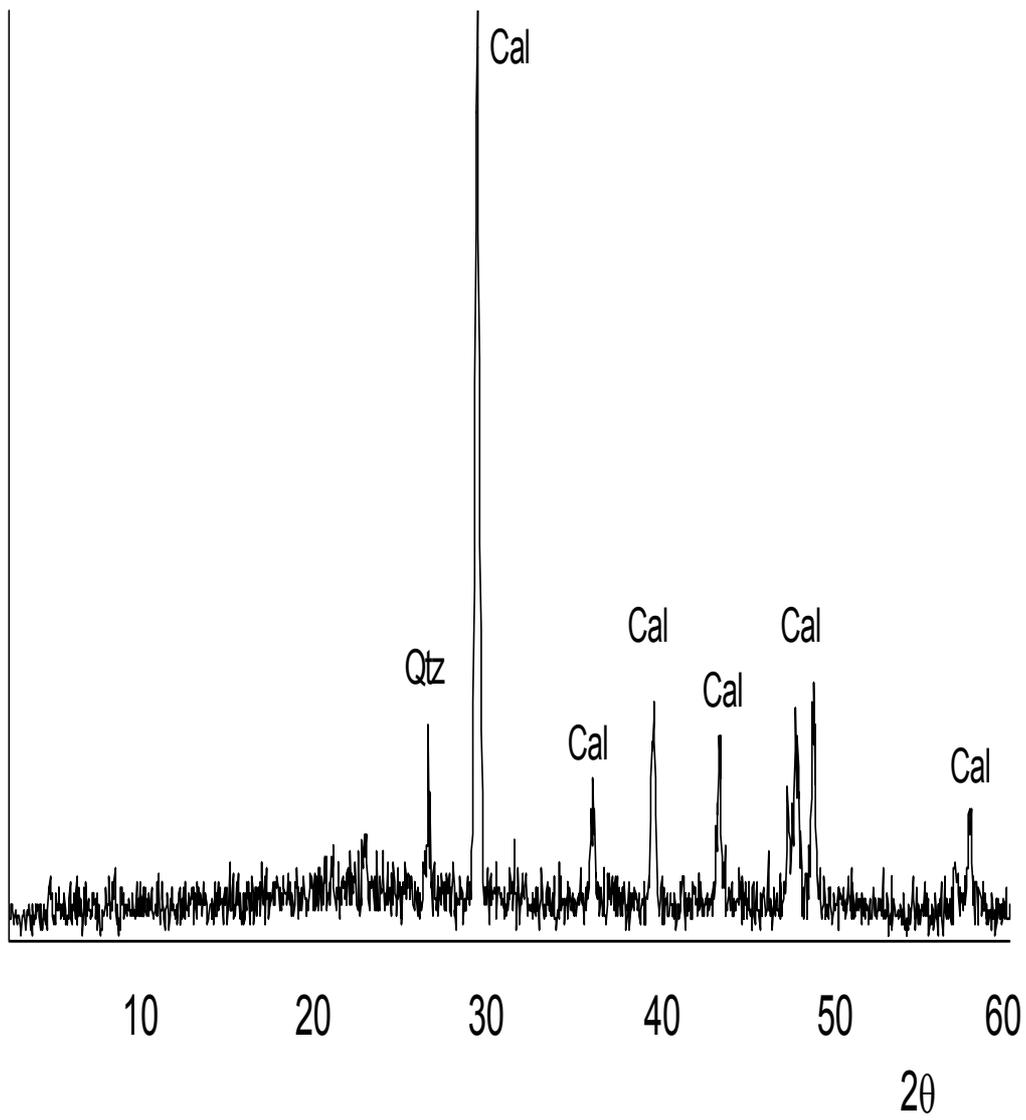


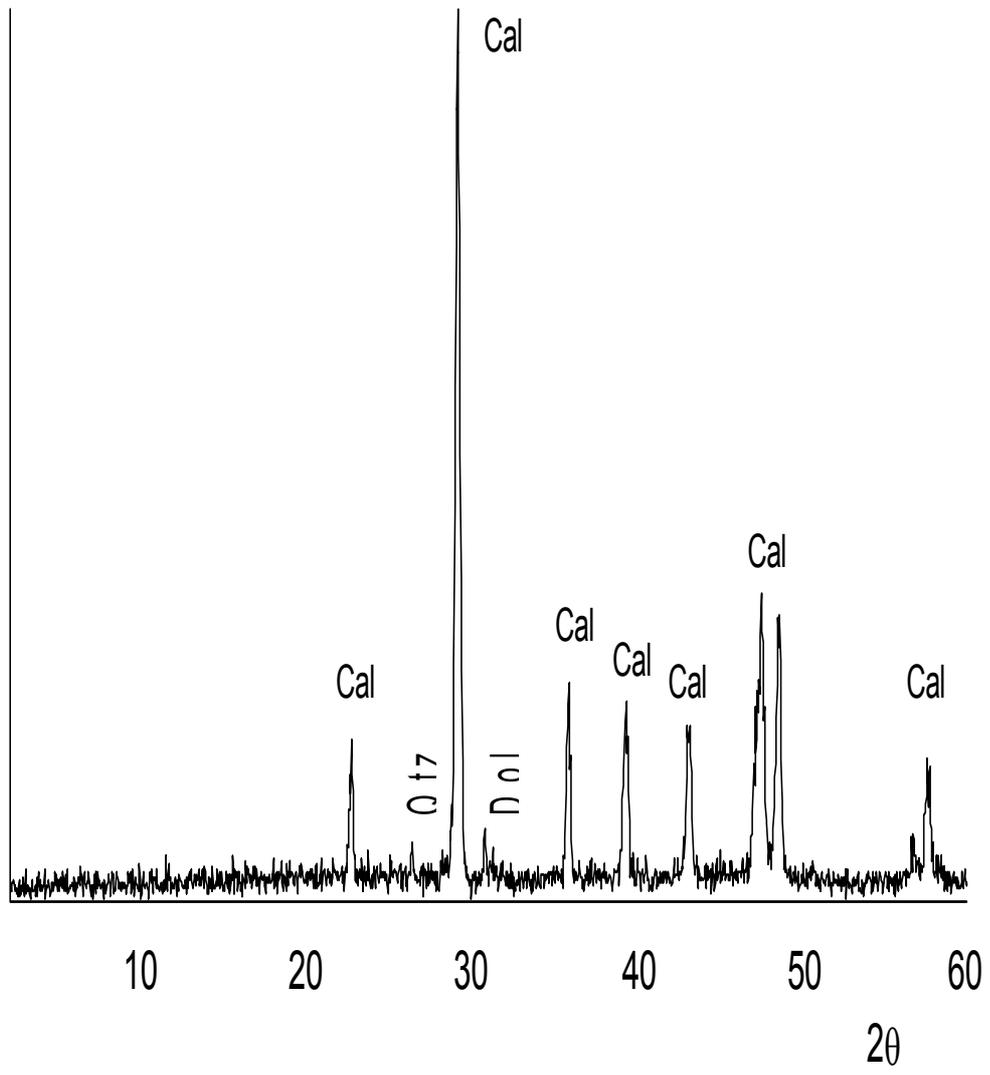
BIBATAUÍN



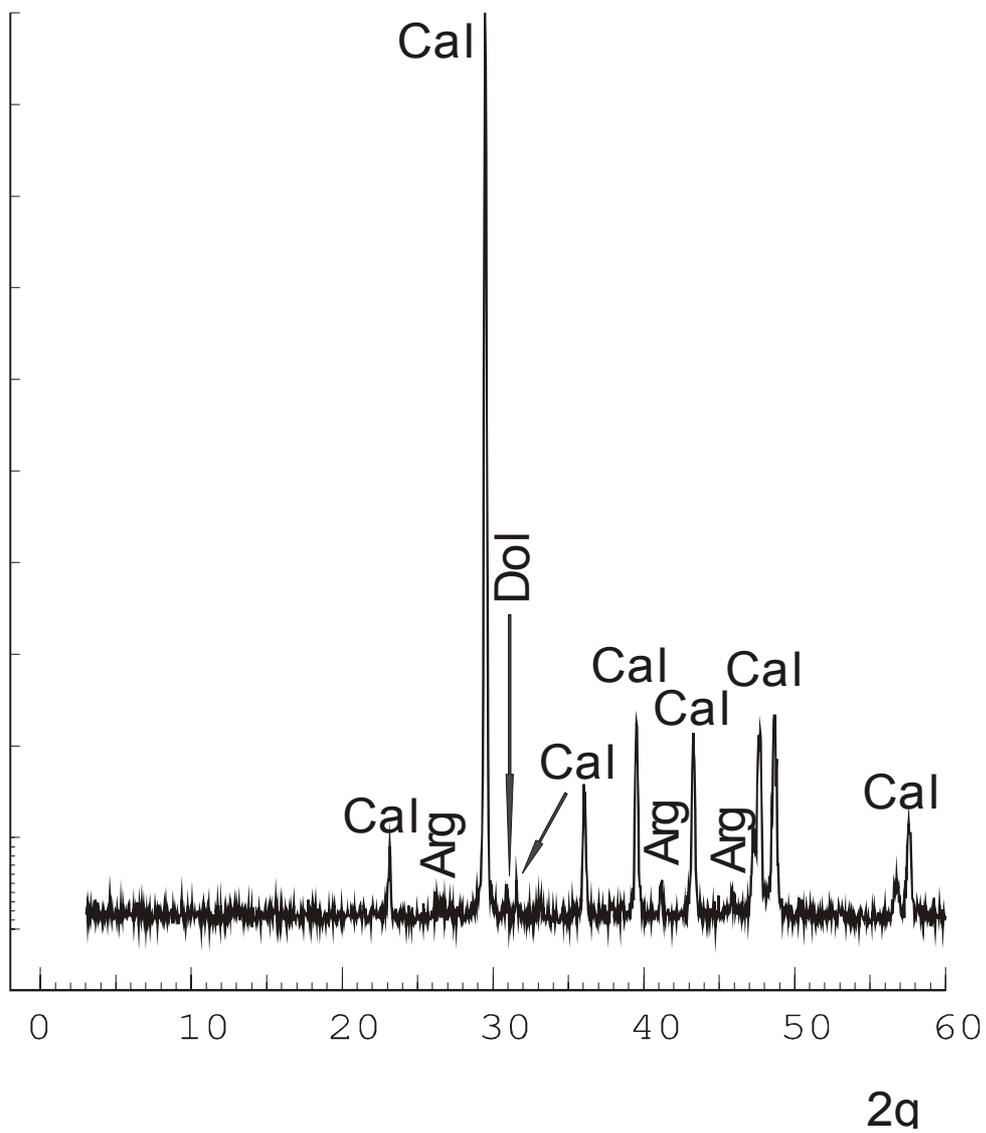


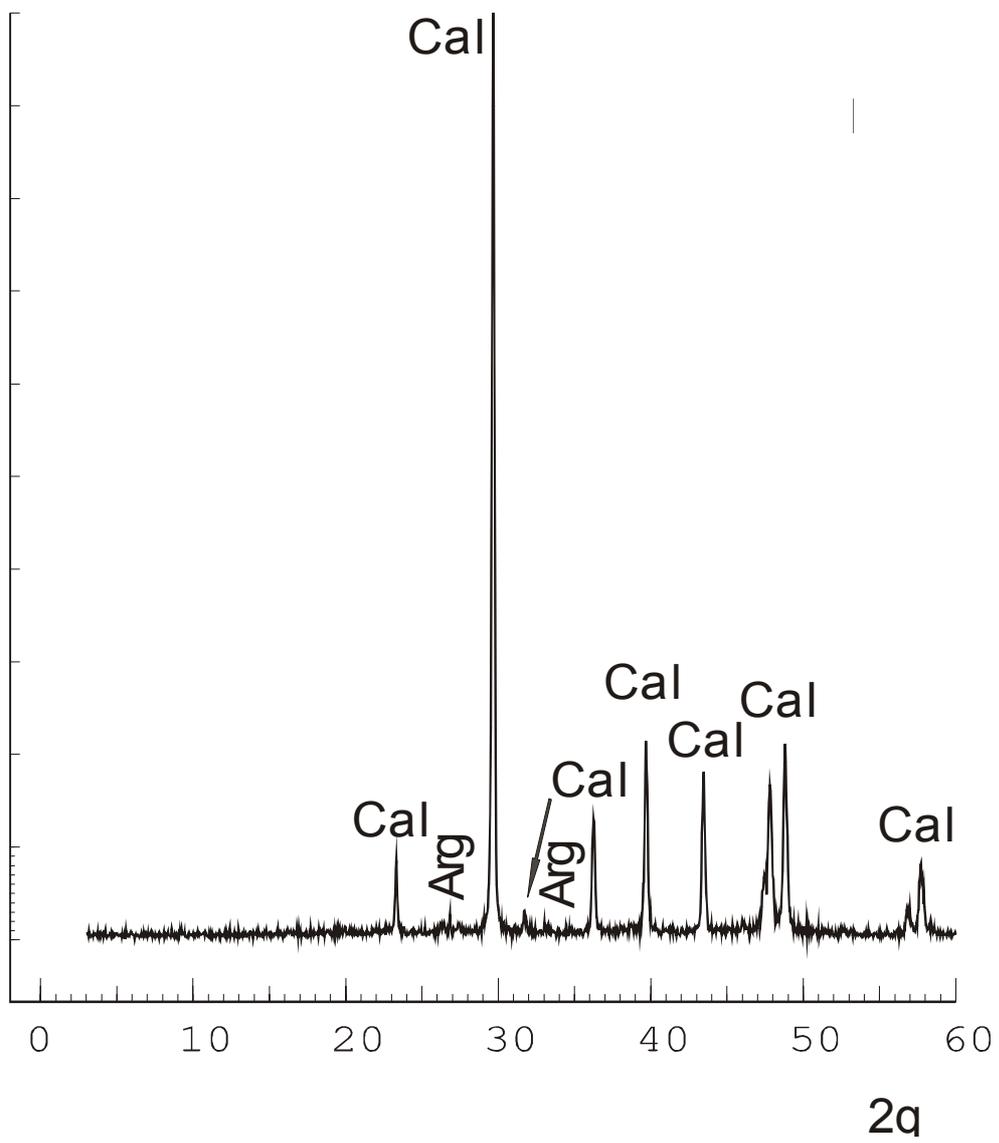


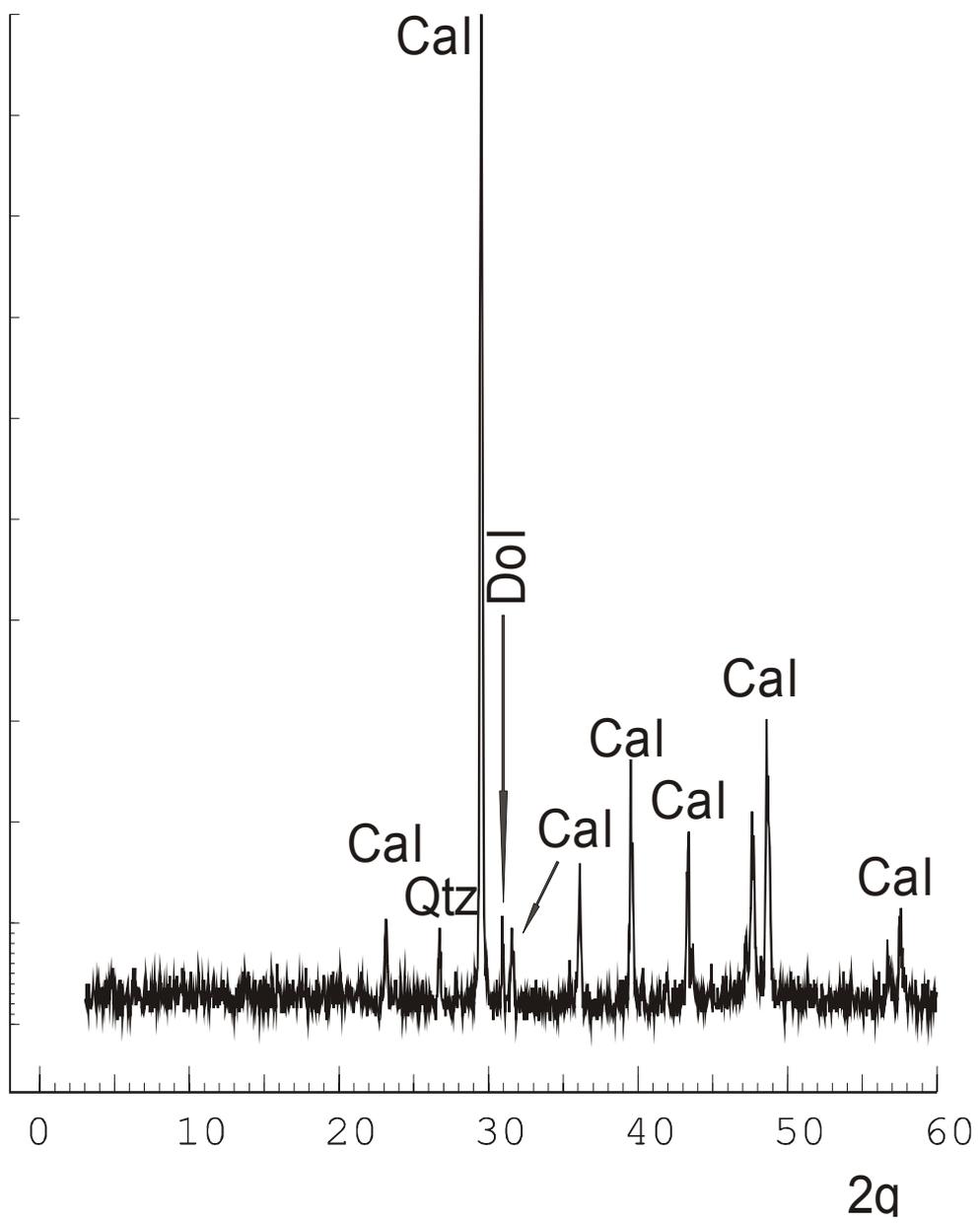


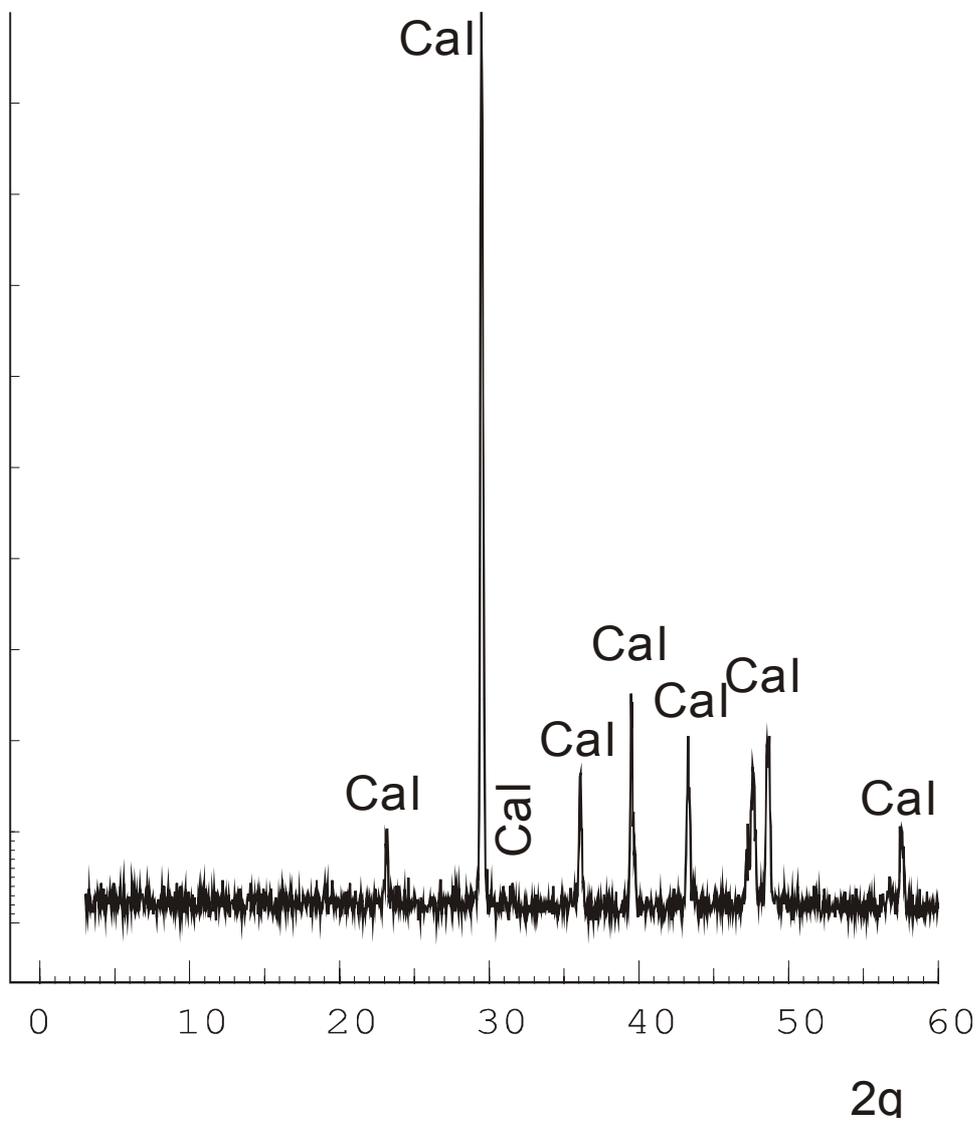


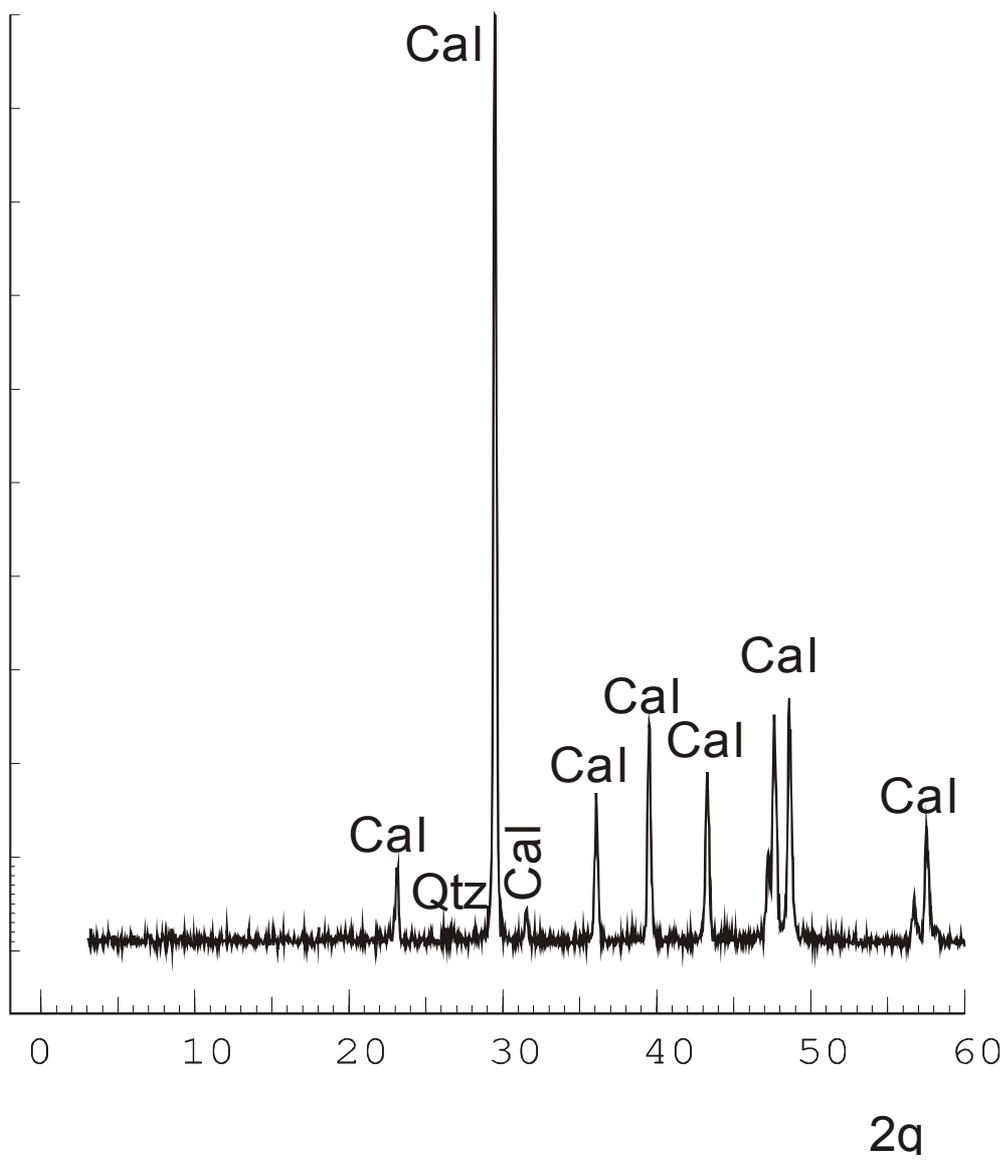
REALES ALCÁZARES











ANEXO IV

COLONIZACIÓN DE LAS PROBETAS

Géneros identificados en las probetas de los distintos materiales pétreos estudiados, en cada uno de los 4 muestreos que, en intervalos de 1 mes, se efectuaron. Las probetas de un mismo material estaban dispuestas en 3 grupos de 4.

Leyenda:

Sustratos- C: mármol de Carrara
CE: mármol de Carrara con resina epoxi
CP: Carrara con resina de poliéster
CG: Carrara con Gel-Coat
M: mármol de Macael
ME: Macael con epoxi
MP: Macael con poliéster
MG: Macael con Gel-Coat
E: probetas de resina epoxi
P: resina de poliéster
G: resina Gel-Coat.

Col- % de Área colonizada.

P- Proporción de cada género en la muestra analizada:

- 1: del 1 al 10%
- 2: del 10 al 25%
- 3: del 25 al 50%
- 4: del 50 al 75%
- 5: del 75 al 100%

C	Grupo a	P	Grupo b	P	Grupo c	P
1	Col.: 0% -		Col.:1% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i> Otras	+ + +	Col.:1% Diatomeas: <i>Gomphonema</i>	+
2	Col.:1% Diatomeas: <i>Gomphonema</i>	1	Col.:1% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i>	1 +	Col.:1% Diatomeas: <i>Gomphonema</i>	+
3	Col.: 5% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i> Otras Algas verdes	3 2 1 1	Col.:5% Diatomeas varias Algas verdes	+ 1	Col.: 5% Diatomeas varias Algas verdes	+ 1
4	Col.: 5% Diatomeas varias Algas verdes: <i>Gongrosira</i>	5 1	Col.:100% Algas verdes: <i>Ulothrix</i> Cianobacterias	4 2	Col.:60% Diatomeas: <i>Cymbella</i> <i>Nitzschias</i> Algas verdes: <i>Ulothrix</i> <i>Oedogonium</i>	2 2 4 2

CE	Grupo a	P	Grupo b	P	Grupo c	P
1	Col.: 0% -	-	Col.:1% Diatomeas: <i>Gomphonema</i>	+	Col.:0% -	-
2	Col.:50% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i> <i>Navicula</i>	4 3 +	Col.: 40% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i> <i>Navicula</i> Algas verdes	5 2 + 1	Col.:5% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i> <i>Achnantes</i> <i>Navicula</i> <i>Cymbella</i>	5 2 1 + +
3	Col.:100% Diatomeas: <i>Nitzschia</i> <i>Gomphonema</i> Otras <i>Chlamydomona</i> (a.parda) Algas verdes	3 2 1 2 1	Col.:100% Diatomeas varias: Algas verdes	3 2	Col.: 100% Diatomeas: <i>Gomphonema</i>	4
4	Col.:100% Diatomeas varias Algas verdes: <i>Chlorosarcinopsis</i> <i>Gongrosira</i>	5 1 1	Col.:60% Diatomeas varias Algas verdes: <i>Gongrosira</i>	2 5	Col.:100% Diatomeas: <i>Gomphonemas</i> <i>Apatococcus</i> Algas verdes: <i>Ulothrix</i> <i>Oedogonium</i>	4 2 4 1

CP	Grupo a	P	Grupo b	P	Grupo c	P
1	Col.: 1% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Navicula</i>	+ +	Col.:1% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nizstchia</i>	+ +	Col.:1% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nizstchia</i> <i>Navicula</i>	+ + +
2	Col.: 5% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Cymbella</i> <i>Achnante</i>	5 1 +	Col.:5% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i> <i>Fragillaria</i> <i>Navicula</i>	5 2 1 +	Col.: 5% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i> <i>Fragillaria</i> <i>Cymbella</i> <i>Navicula</i>	4 2 + + +
3	Col.: 70% Diatomeas: <i>Navicula</i> Otras Algas verdes: <i>Apatococcus</i>	4 1 3	Col.: 100% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> Otras Algas verdes	5 1 +	Col.: 1% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> Otras	3 +
4	Col.:100% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> Otras Algas verdes: <i>Ulothrix</i> <i>Oedogonium</i>	4 1 3 3	Col.:100% Diatomeas: <i>Nitzschia</i> Otras Algas verdes: <i>Ulothrix</i> <i>Apatococcus</i>	2 1 4 2	Col.: 60% Diatomeas varias Algas verdes: <i>Ulothrix</i> <i>Tetracystis</i> Cianobacterias	4 4 1 +

CG	Grupo a	P	Grupo b	P	Grupo c	P
1	Col.: 0%		Col.: 0%		Col.: 0%	
2	Col.: 100% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i> Otras	2 1 +	Col.:10% Diatomeas: <i>Navicula</i> <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i> <i>Chlamidomona</i>	3 2 1 +	Col.: 100% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Navicula</i> <i>Nitzschia</i> <i>Cymbella</i>	4 2 1 +
3	Col.: 100% Diatomeas: <i>Nitzschia</i> Otras Algas verdes: <i>Oedogonium</i>	2 1 3	Col.:50% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Navicula</i> Cianobacterias	3 3 +	Col.:100% Diatomeas: <i>Nitzschia</i> Otras Algas verdes: <i>Ulothrix</i> <i>Oedogonium</i> <i>Gongrosira</i>	2 1 3 2 1
4	Col.:100 Diatomeas varias Algas verdes: <i>Ulothrix</i> <i>Chlorosarcinopsis</i>	3 2 2	Col.:80% Diatomeas varias Algas verdes: <i>Ulothrix</i> <i>Gongrosira</i> <i>Oedogonium</i> <i>Apatococcus</i>	3 3 3 1 +	Col.:100% Diatomeas varias Algas verdes: <i>Ulothrix</i> <i>Oedogonium</i> <i>Gongrosira</i>	2 3 3 2

M	Grupo a	P	Grupo b	P	Grupo c	P
1	Col.: 1% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i>	+ +	Col.: 1% Diatomeas : <i>Nitzschia</i>	+ +	Col.:1% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i>	+ +
2	Col.: 5% Diatomeas: <i>Navicula</i> <i>Gomphonema</i> <i>Achnante</i> <i>Cymbella</i>	1 1 1 +	Col.: 1% Diatomeas varias	+ +	Col.: 1% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i>	2 +
3	Col.: 5% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> Otras Diatomeas Algas verdes: <i>Ulothrix</i>	3 1 2	Col.: 1% Diatomeas varias Algas verdes: <i>Apatococcus</i>	1 2	Col.: 10% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Chlamidomonas</i> Otras Diatomeas Algas verdes: <i>Ulothrix</i> <i>Apatococcus</i>	3 2 1 2 1
4	Col.: 100% Diatomeas varias Algas verdes: <i>Ulothrix</i> Otras	2 4 1	Col.: 100% Diatomeas varias Algas verdes: <i>Oedogonium</i> <i>Ulothrix</i> <i>Apatococcus</i> <i>Cladophora</i>	2 3 2 2 1	Col.: 100% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Cymbella</i> Otras Diatomeas Algas verdes: <i>Apatococcus</i> <i>Ulothrix</i> Cianobacterias	4 2 1 3 1 +

M E	Grupo a	P	Grupo b	P	Grupo c	P
1	Col.: 1% Diatomeas varias	+ +	Col.:0% -		Col.:1% Diatomeas: <i>Nitzschia</i> <i>Navicula</i>	+ +
2	Col.: 100% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i> <i>Fragillaria</i>	5 3 1	Col.:80% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i> <i>Cymbella</i>	5 3 1	Col.:25% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i> <i>Cymbella</i> <i>Chlamidomona</i>	5 3 1 +
3	Col.: 100% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Navicula</i> <i>Nitzschia</i> <i>Fragillaria</i> Algas verdes: <i>Ulothrix</i> <i>Cladophora</i>	3 3 2 1 1 2	Col.:100% Diatomeas: <i>Navicula</i> Otras Algas verdes: <i>Apatococcus</i> Otras	3 1 3 1	Col.:100% Diatomeas: <i>Chlamydomonas</i> Otras Algas verdes: <i>Ulothrix</i> <i>Cladophora</i> <i>Oedogonium</i>	2 1 3 1 1
4	Col.:100% Diatomeas: <i>Nitzschia</i> <i>Cymbella</i> Algas verdes: <i>Ulothrix</i>	1 1 1 5	Col.: 100% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> Algas verdes: <i>Ulothrix</i> <i>Chlorococcum</i>	1 5 2	Col.:100% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> Otras Algas verdes: <i>Apatococcus</i> <i>Gongrosira</i>	3 1 4 2

M P	Grupo a	P	Grupo b	P	Grupo c	P
1	Col.:1% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i>	+ +	Col.:1% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i>	+ +	Col: 0% -	
2	Col.: 70% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i> <i>Navicula</i>	4 2 1	Col.: 5% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Navicula</i>	2 +	Col.: 100% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Navicula</i> <i>Nitzschia</i> <i>Achnante</i> <i>Fragillaria</i>	3 2 1 1 +
3	Col.:40% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> Otras Algas verdes: <i>Oedogonium</i>	3 1 2	Col.:100% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Navicula</i> Otras Algas verdes: <i>Gongrosira</i> <i>Ulothrix</i> <i>Oedogonium</i>	4 3 1 2 2 2	Col.:100% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> Otras Algas verdes: <i>Ulothrix</i> <i>Oedogonium</i>	4 1 2 2
4	Col.:100% Diatomeas varias Algas verdes: <i>Ulothrix</i>	5 5	Col.: 100 % Diatomeas varias: Algas verdes: <i>Ulothrix</i> <i>Apatococcus</i> <i>Gongrosira</i>	2 3 3 1	Col.:100% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> Otras Algas verdes: <i>Ulothrix</i> <i>Apatococcus</i>	2 1 4 3

M G	Grupo a	p	Grupo b	P	Grupo c	P
1	Col.: 1% Diatomeas: <i>Gomphonema</i>	+	Col.:1% Diatomeas: <i>Gomphonema</i>	+	Col.:1% Diatomeas: <i>Navicula</i>	+
2	Col.:70% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i> <i>Navicula</i>	4 3 2	Col.: 25% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i> <i>Navicula</i>	5 2 1	Col.:100% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i> <i>Achnante</i>	4 1 +
3	Col.:80% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i> <i>Chlamydomonas</i> Otras Algas verdes: <i>Ulothrix</i> <i>Cladophora</i> <i>Chlorosarcinopsis</i>	3 2 1 1 3 2 1	Col.: 100% Diatomeas varias: Algas verdes: <i>Ulothrix</i> <i>Cladophora</i> <i>Chlorosarcinopsis</i>	4 3 2 1	Col.:100% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> Otras	4 1
4	Col.:90% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> Otras Algas verdes: <i>Ulothrix</i> <i>Chlorococum</i> <i>Chaetophorales</i>	3 1 5 2 1	Col.: 100% Diatomeas varias: Algas verdes: <i>Apatococcus</i> <i>Gongrosira</i> <i>Ulothrix</i>	1 3 2 1	Col.:100% Diatomeas varias: Algas verdes: <i>Gongrosira</i> <i>Apatococcus</i> <i>Ulothrix</i>	3 4 2 1

R	Epoxi	P	Poliester	P	Gel-Coat	P
1	Col.:1% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Navicula</i>	+ +	Col.: 2% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Nitzschia</i> <i>Navicula</i>	+ + +	Col.:1% Diatomeas: <i>Gomphonema</i>	+
2	Col.:1% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Achnantes</i> <i>Nitzschia</i> <i>Fragillaria</i>	1 + + +	Col.: 1% Diatomeas: <i>Cymbella</i> <i>Gomphonema</i> <i>Fragillaria</i> <i>Nitzschia</i> A.verdes: <i>Chlamydomona</i>	+ + + + +	Col.: 25% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Navicula</i> <i>Gongrosyra</i> <i>Nitzschia</i> <i>Achnante</i>	4 1 1 + +
3	Col.:100% Diatomeas varias Algas verdes: <i>Apatococcus</i> <i>Gongrosira</i>	4 1 1	Col.:20% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> <i>Fragillaria</i> <i>Nitzschia</i> Algas verdes: <i>Apatococcus</i>	2 2 2 +	Col.: 100% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> Otras Algas verdes: <i>Apatococcus</i>	4 1 1
4	Col.:100% Diatomeas: <i>Gomphonema</i> Algas verdes: <i>Ulothrix</i> <i>Apatococcus</i> <i>Oedogonium</i>	4 3 2 1	Col.: 100% Diatomeas: <i>Navicula</i> Otras Algas verdes: <i>Ulothrix</i> <i>Oedogonium</i> <i>Apatococcus</i> <i>Gongrosira</i>	3 1 3 3 1 1	Col.: 100% Diatomeas varias Algas verdes: <i>Ulothrix</i> <i>Gongrosira</i>	4 4 1

ANEXO V

ESTUDIO DE SUPERFICIES DE MICROALGAS Y SUSTRATO: RESULTADOS

MEDIDA DE ÁNGULOS DE CONTACTO

MATERIALES PÉTREOS

FASE I

I-Valor en grados de la media estadística, la desviación típica, el coeficiente de variación de Pearson, y el intervalo de confianza, de los 15 ángulos de contacto medidos con cada uno de los 3 líquidos empleados sobre las probetas de la primera fase analítica.

líquido	AGUA		
	media aritmética	desviación típica	CVP
CG	67.82	3.22	4.75
CP	64.86	1.12	1.73
MG	68.08	3.57	5.24
MP	85.88	4.97	5.79
C	26.00*	1.22	4.69
M	31.66*	2.05	6.48

líquido	FORMAMIDA		
material	media aritmética	desviación típica	CVP
CG	29.55	2.63	8.9
CP	45.62	2.17	4.76
MG	24.40	1.62	6.64
MP	40.82	2.29	5.61
C	35.63	3.50	9.82
M	33.37	2.64	7.91

líquido	DI-YODOMETANO		
material	media aritmética	desviación típica	CVP
CG	20.86	1.81	8.68
CP	19.00	1.50	7.89
MG	17.89	1.28	7.15
MP	17.10	1.58	9.24
C	33.50	2.54	7.58
M	35.82	2.62	7.31

II-Valores de las componentes γ y γ total en cada material, expresados en mJ/m^2 .

probeta	γ LW	γ +	γ -	γ total
CG	47.525+-0.55272	1.4762+-0.052967	5.477+-1.6845	53.212+-1.5292
CP	48.070+-0.42119	0.0011152+-0.006	14.643+-0.048971	48.326+-1.1339
MG	48.373+-0.3402	1.9869+-0.24107	4.239+-1.19747	54.178+-2.0443
MP	48.579+-0.40281	1.3164+-0.15548	0.01807+-0.1787	48.888+-1.9463
C	42.712+-1.1397	0.0020833+-0.009	57.74+-1.8158	43.405+-2.7637
M	41.646+-1.2309	0.13887+-0.01062	49.06+-0.46133	46.866+-1.4552

FASE II

III- Valor en grados de la media estadística, la desviación típica, el coeficiente de variación de Pearson, y el intervalo de confianza, de los 15 ángulos de contacto medidos con cada uno de los 3 líquidos empleados sobre las probetas de la segunda fase analítica.

líquido	AGUA		
mezcla	media aritmética	desviación típica	CVP
CG50%	74.42	1.39	1.87
CG80%	80.88	2.08	2.57
CP50%	68.00	1.24	1.82
CP80%	69.16	1.47	2.13
MG50%	67.70	1.76	2.60
MG80%	60.50	1.08	1.79
MP50%	67.00	2.19	3.27
MP80%	70.37	1.40	1.99

líquido	FORMAMIDA		
mezcla	media aritmética	desviación típica	CVP
CG50%	42.00	2.00	4.76
CG80%	32.90	2.16	6.57
CP50%	52.77	2.48	4.7
CP80%	51.75	1.66	3.21
MG50%	47.00	1.33	2.83
MG80%	39.63	1.80	4.54
MP50%	57.36	2.37	4.13
MP80%	54.41	2.35	4.32

líquido	DI-YODOMETANO		
	mezcla	media aritmética	desviación típica
CG50%	36.30	2.15	5.92
CG80%	34.91	2.46	7.05
CP50%	31.72	1.65	5.20
CP80%	33.80	2.08	6.15
MG50%	30.40	1.56	5.13
MG80%	35.66	1.82	5.10
MP50%	31.51	1.38	4.38
MP80%	31.80	1.32	4.15

IV- Valores en mJ/m^2 de las componentes γ y γ total de las probetas de la segunda fase.

probetas	γ LW	γ +	γ -	γ total
CG50%	41.419+-0.6682	1.3427+-0.082998	4.137+-0.34429	46.133+-1.0101
CG80%	42.067+-1.136	3.777+-0.17953	0.16762+-0.18308	43.658+-2.043
CP50%	43.492+-0.71184	0.0067+-0.017884	15.157+-0.10806	44.133+-1.5599
CP80%	42.577+-0.93921	0.01382+-0.00245	13.114+-0.34429	43.428+-1.0373
MG50%	44.056+-0.6518	0.1095+-0.007618	12.079+-0.31941	46.356+-0.84497
MG80%	41.718+-0.85262	0.6226+-0.027259	15.973+-0.31941	48.026+-1.0537
MP50%	43.543+-0.59373	0.2707+-0.089014	19.748+-1.1242	48.167+-1.4856
MP80%	43.461+-0.57043	0.01722+-0.02783	13.433+-0.14566	44.423+-1.3528

MICROALGAS

V- Valor en grados de la media estadística, la desviación típica, el coeficiente de variación de Pearson, y el intervalo de confianza, de los 10 ángulos de contacto del agua sobre cada depósito de cultivo. Se ofrecen los valores correspondientes a los depósitos filtrados con el filtro de fibra de vidrio (A) y el filtro de acetato de celulosa (B), tras 30 minutos y tras 1 hora de secado en ambos casos. Los valores señalados con un asterisco corresponden a la película algal del primer cultivo, sobre la que, directamente y sin filtrar, se efectuaron las mediciones.

cultivo	Filtro A					
	30 minutos			1 hora		
	media aritm.	desv. típica	CVP	media aritm.	desv. típica	CVP
<i>Symploca elegans</i>	22.0*	1.414	6.43	19,5*	1,295	6.64
<i>Stichococcus bacillaris</i>	23.3	2.788	11.96	22,7	2,441	10.75
<i>Chlorella</i> sp	19.5	1.803	9.24	17,0	14,053	82.66
<i>Tetracystis</i> sp	24.9	1.617	6.49	24,7	21,714	87.91
<i>Planophila</i> sp	13.5	1.384	10.25	13,0	0,912	7.01

cultivo	Filtro B					
	30 minutos			1 hora		
	media aritm.	desv. típica	CVP	media aritm.	desv. típica	CVP
<i>Symploca elegans</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Stichococcus bacillaris</i>	23.3	2.603	11.17	24,5	2,958	12.07
<i>Chlorella</i> sp	15.5	2.979	19.22	20,6	1,496	7.26
<i>Tetracystis</i> sp	26.8	3.304	12.33	25,7	1,228	4.77
<i>Planophila</i> sp	13.3	1.763	13.25	13,0	3,898	29.98

INTERACCIONES SUSTRATO - MICROORGANISMO

VI- Valores en grados de los ángulos ϕ medidos con agua sobre las probetas de todos los materiales pétreos (fases I y II) y los depósitos algales, valores de los cosenos de ϕ y de la expresión $(1 - \cos\phi)$ en cada caso.

material	Φ	$\cos \Phi$	$1 - \cos \Phi$
CG	67.82	0.3775	0.6225
CG50%	74.42	0.2686	0.7314
CG80%	80.88	0.1585	0.8415
CP	64.86	0.4248	0.5752
CP50%	68.00	0.3746	0.6254
CP80%	69.16	0.3557	0.6442
MG	68.08	0.3733	0.6267
MG50%	67.70	0.3794	0.6205
MG80%	60.50	0.4924	0.5075
MP	85.88	0.0718	0.9281
MP50%	67.00	0.3907	0.6092
MP80%	70.37	0.3359	0.6640
C	26.00*	0.8988	0.1012
M	31.66*	0.8512	0.1488

cultivo	Φ	$\cos \Phi$	$1 - \cos \Phi$
<i>Symploca elegans</i>	20.75	0.9351	0.0648
<i>Stichococcus bacillaris</i>	23.45	0.9174	0.0826
<i>Chlorella</i> sp	18.15	0.9502	0.0497
<i>Tetracystis</i> sp	25.525	0.9024	0.0976
<i>Planophila</i> sp	13.25	0.9733	0.0266

VII- Valor del trabajo de adhesión W_{SML} para las probetas de las fases I y II con cada cultivo de microalgas.

W_{SML}	CG	CP	MG	MP	C	M
<i>Symploca elegans</i>	1.4683	1.3567	1.4782	2.1891	0.2387	0.3509
<i>Stichococcus bacillaris</i>	1.8716	1.7294	1.8851	2.7904	0.3043	0.4474
<i>Chlorella</i> sp	1.1261	1.0409	1.1342	1.6790	0.1831	0.2692
<i>Tetracystis</i> sp	2.2115	2.0435	2.2263	3.2972	0.3979	0.5286
<i>Planophila</i> sp	0.6027	0.5569	0.6068	0.8986	0.0979	0.1441

W_{SML}	CG50 %	CG80 %	CP50%	CP80%	MG50 %	MG80 %	MP50 %	MP80 %
<i>Symploca elegans</i>	1.725	1.984	1.475	1.519	1.463	1.197	1.436	1.566
<i>Stichococcus bacillaris</i>	2.199	2.530	1.880	1.936	1.865	1.525	2.080	1.996
<i>Chlorella</i> sp	1.323	1.522	1.131	1.165	1.122	0.918	1.102	1.201
<i>Tetracystis</i> sp	2.536	2.987	2.221	2.288	2.204	1.802	2.164	2.358
<i>Planophila</i> sp	0.708	0.814	0.605	0.623	0.600	0.491	0.589	0.642

