

Estudios de biodeterioro y evaluación de tratamientos biocidas en materiales pétreos de la capilla del antiguo Hospital de las Cinco Llagas de Sevilla (actual sede del Parlamento de Andalucía)

Víctor Menguiano Chaparro
Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico

Marta Sameño Puerto
Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico

RESUMEN. Se han llevado a cabo estudios de biodeterioro y evaluación de tratamientos biocidas sobre los materiales pétreos de la capilla del Antiguo Hospital de las Cinco Llagas de Sevilla, actual sede del Parlamento Andaluz.

El estudio de biodeterioro se ha centrado en la identificación de los agentes biológicos que se desarrollan tanto en la cubierta como en las fachadas de la capilla, así como en el daño ocasionado por los organismos identificados.

Por otra parte, se ha llevado a cabo la evaluación de distintos productos biocidas, no sólo respecto a su eficacia para el control de los organismos biológicos identificados, sino también en cuanto a su compatibilidad o interferencia con los materiales pétreos que forman parte del monumento.

Palabras clave. Biodeterioro. Identificación. Biocidas. Evaluación.

INTRODUCCIÓN

Este estudio se ha efectuado como consecuencia de la petición cursada al Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico (IAPH) por parte del Parlamento Andaluz, de asesoramiento para actuaciones de restauración en su edificio sede.

El estudio de biodeterioro se ha centrado en la identificación de los agentes biológicos que se desarrollan tanto en la cubierta como en las fachadas de la capilla, así como en el daño ocasionado por los organismos identificados.

El material pétreo mayoritario del edificio es del tipo caliza, llamada "piedra del Puerto", al proceder de la Cantera del Cerro de San Cristóbal en El Puerto de Santa María, Cádiz.

Dicho material pétreo es susceptible al ataque de organismos y microorganismos que causan su deterioro. Podemos definir el biodeterioro como ciertos cambios indeseables en las propiedades de

un material causados por la actividad vital de algunos organismos. Se trata de un fenómeno complejo que implica alteraciones de las propiedades físico-químicas, mecánicas y estéticas del material, debido a la actividad metabólica de organismos biológicos. Se produce cuando las condiciones microclimáticas, especialmente temperatura y humedad relativa, son favorables para el crecimiento de los factores biológicos de alteración.

Por tanto resulta necesario el estudio e identificación de estos organismos biológicos para conocer qué daños están causando sobre el material pétreo, y cuál es el mejor método para su erradicación o control.

Los organismos que mayoritariamente intervienen en los procesos de biodeterioro del material pétreo son cianobacterias, algas, líquenes, briófitos (musgos y hepáticas) y plantas superiores. Todos ellos se aprecian de visu en el edificio que nos ocupa (Figura 1).

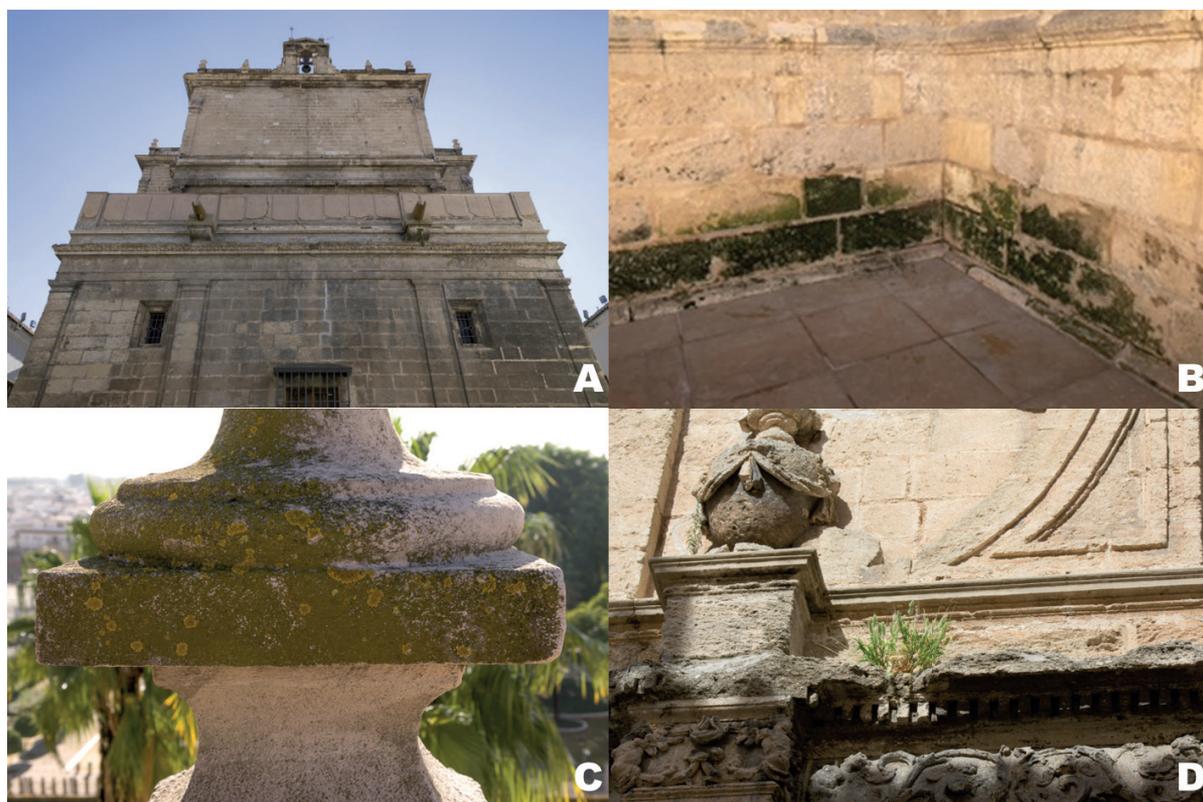


Figura 1. Biodeterioro en las fachadas de la capilla. A) Pátina de cianobacterias. B) Pátina de algas verdes. C) Líquenes y musgos en un pináculo. D) Plantas superiores en cornisas. Fotografías de Víctor Menguiano.

MATERIAL Y MÉTODOS

Identificación de Factores Biológicos de Alteración

Para la identificación de los factores biológicos de alteración se realizó una toma de muestras de organismos biológicos en las cubiertas de

la capilla (incluyendo la espadaña), en la terraza norte, algunas cornisas y en la parte baja de las cuatro fachadas. En total se tomaron 39 muestras de cianobacterias, algas verdes, líquenes, musgos y plantas superiores.

La caracterización taxonómica de los distintos factores biológicos de alteración se llevó a cabo

mediante el estudio de sus características biométricas y morfológicas, mediante el uso de microscopía estereoscópica (*Leica GZ6*, con fuente de luz *Leica CLS 100X*), reacción de tinción con solución de hidróxido de potasio (que permite identificar líquenes ya que al aplicarse en el talo o en los apotecios, estos toman una coloración diferente a la original que puede ser de gran utilidad a la hora

de la identificación de especies) y microscopía óptica con luz transmitida (*Leica DFC 320*).

En el caso de los microorganismos (cianobacterias y algas verdes), además se llevaron a cabo técnicas de cultivo y técnicas de biología molecular.

Los cultivos se realizaron en medio BG11 tanto sólido como líquido (Figura 2), e incubación con luz y temperatura ambiente durante 30 días.

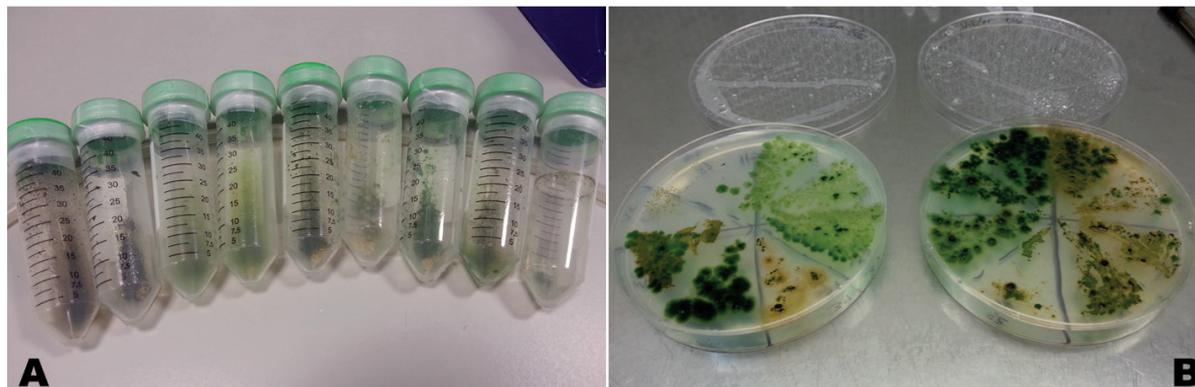


Figura 2. Cultivos de microorganismos fotosintéticos en medio BG11.

A) Líquido. B) Sólido. Fotografías de Víctor Menguiano.

Respecto a las técnicas de biología molecular, se efectuaron los siguientes procesos:

Extracción de ADN

Extracción del ADN de cianobacterias y algas verdes a partir de la biomasa crecida en los cultivos realizados, siguiendo el siguiente protocolo:

- Se resuspendió la biomasa obtenida en 100 μ l de tampón TE en un tubo Eppendorf.
- A continuación se añadieron 50 μ l de perlas de vidrio estériles de 0,25 mm de diámetro, 5 μ l de SDS 10% y 110 μ l de fenol-cloroformo (1:1).
- Se dieron 10 ciclos de 1 minuto de agitación en vórtex alternando con 10 ciclos de 1 minuto de enfriado en hielo.
- Centrifugación a 15000xg durante 15 minutos.
- Extracción del sobrenadante y extracción con el doble volumen de fenolcloroformo (1:1).
- Agitación en vórtex durante 30 segundos y centrifugado a 15000xg durante 1 minuto.
- Extracción de nuevo del sobrenadante (75 μ l).
- Adición de 7,5 μ l de NaOAc 3M y 150 μ l de etanol puro frío.
- 30 minutos en el congelador para mejorar la precipitación.
- Centrifugación a 15000 xg durante 15 minutos.

- Eliminación de sobrenadante y lavado con 1 ml de etanol 70%.
- Centrifugación a 15000xg durante 3 minutos.
- Eliminación del etanol y secado en campana.
- Resuspensión en 10 μ l de agua miliQ.

La extracción de ADN fue verificada mediante electroforesis, de 5 μ l de cada solución obtenida, en gel de agarosa al 0,7% en tampón TBE $\frac{1}{2}$ y teñido con bromuro de etidio, a 120V, durante 30 minutos, usando como patrón ADN de fago λ (*Promega*) digerido con las endonucleasas de restricción HindIII y EcoRI con un patrón de bandas en un rango de 564 a 21226 pb.

Amplificación por PCR

El ADN extraído se utilizó como molde para la amplificación mediante PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa), por un lado, del ADNr de 16S de la subunidad pequeña del ribosoma de procariontes (colonias bacterianas), y por otro, del ADNr 28S de eucariotas (colonias fúngicas). Para ello se utilizaron, en el primer caso, el par de cebadores 5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 5'-ACCTTGTTACGACTT-3', y en el segundo, el par de cebadores 5'-ACCCGCTGAATTTAAGCAT-3' y 5'-TCCGTGTTTCAAGACGG-3'. De esta forma se amplifica un fragmento de ADN de unas 1.500 pares de bases (pb), en el caso de procariontes,

y de unas 600 pares de bases (pb), en el caso de eucariotas.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador *MyCycler* y se realizaron en un volumen final de 50 μ l que contenían: 10 μ l de ADN molde, 5 μ l de tampón Taq DNA polimerasa, 1 μ l de Taq DNA polimerasa (5 U), 2 μ l de mezcla de dNTPs 10 mM cada uno, 50 pmol de cada cebador, completando con agua Milli-Q (Sigma W4502). El termociclador se programó con las siguientes condiciones: 2 minutos a 95 °C para la desnaturalización del ADN molde, seguido de 30 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 95 °C, 1 minuto de hibridación de cebadores a 55 °C y 5 minutos de elongación a 72 °C, con un paso de extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Para comprobar la efectiva amplificación de los fragmentos de ADN, 5 μ l de los productos resultantes de la PCR se corrieron, junto con marcadores de peso molecular, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en 150 ml de tampón TBE $\frac{1}{2}$ teñido con bromuro de etidio, a 100 V, durante 60 minutos, usando como patrón ADN de fago λ (*Promega*) digerido con las endonucleasas de restricción HindIII y EcoRI con un patrón de bandas en un rango de 564 a 21226 pb (Figura 3).

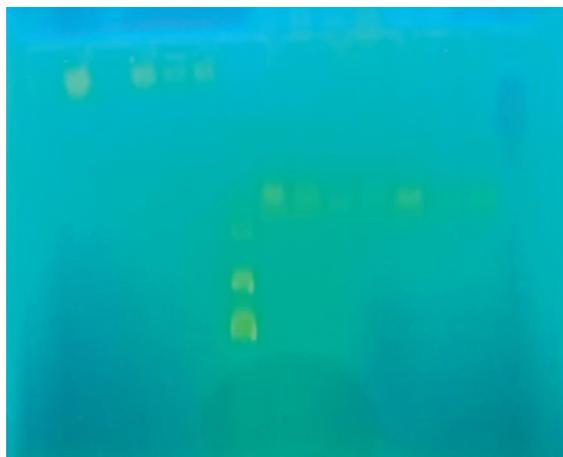


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos resultantes de la PCR. Fotografía de Víctor Menguiano.

Cuantificación y secuenciación del ADN

La cuantificación del ADN obtenido en la PCR se llevó a cabo en la misma electroforesis en gel de agarosa, por comparación con las bandas de ADN del fago λ como marcador de pesos moleculares.

Una vez cuantificadas las muestras de ADN, éstas se prepararon y enviaron al servicio de secuenciación del Instituto de Bioquímica y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC) de Granada.

Análisis BLAST

Con el fin de determinar a qué especies corresponden las secuencias de ADN obtenidas a partir de las muestras, se realiza una comparación mediante análisis BLAST de éstas con las existentes en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA), utilizando el programa “Nucleótide BLAST” disponible en https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch.

Evaluación de Tratamientos Biocidas

Se han evaluado tres biocidas con el objetivo de verificar y determinar tanto la efectividad de los productos, como la compatibilidad e interacción con el material pétreo del edificio.

Los biocidas estudiados han sido:

- *Preventol Ri80*. Es un preparado concentrado líquido de sales de amonio cuaternario con amplio espectro de actividad contra hongos, bacterias y algas. Su principio activo es alquildimetilbenzilamoniocloruro. Se emplea para la producción de soluciones desinfectantes para materiales pétreos, madera, cerámica, etc. en soluciones acuosas en concentraciones variables del 2 al 10%. El producto empleado está disuelto al 2% en agua.
- *Biotin T*. Mezcla de OIT (N-octil isotiazolinona) y una sal de amonio cuaternario (tensoactivo catiónico). Es un concentrado que debe diluirse en agua entre el 1-3% y según la tipología y la naturaleza del biodeterioro. Se diluye en alcohol e hidrocarburos aromáticos, nunca en acetona, hidrocarburos alifáticos ni clorados. El producto empleado está disuelto al 2% en agua.
- *Biotin R*. Posee alto poder bactericida y antifúngico. Está compuesto por dos moléculas, la IPBC (yodopropinilbutilcarbamato) y la OIT (N-octil isotiazolinona), las dos con una solubilidad baja en agua (por ello se utiliza para el exterior, o para casos en interiores sensibles al agua, como por ejemplo piedra o pintura mural con sales que puedan aflorar a la superficie después de un tratamiento acuoso). Es un concentrado que debe diluirse al 3-5% dependiendo del biodeterioro. Puede disolverse en la mayor parte de los disolventes orgánicos. En el estudio se ha empleado disuelto al 3% en alcohol isopropílico.

Con estos biocidas se han llevado a cabo ensayos de eficacia biocida (estudio de la vitalidad de microorganismos fotótrofos y estudio de la interfase líquen-sustrato) y ensayos de interferencia

biocida-sustrato (estudio al SEM-EDX, colorimetría y porosidad abierta).

Estudio de la vitalidad de microorganismos fotótrofos

Se aplicaron los distintos biocidas *in situ* sobre la pátina de microorganismos encontrada en la zona inferior de la fachada de la Capilla, concretamente en la zona correspondiente al área norte del edificio.

Se tomaron muestras en dos instantes distintos, transcurridos 7 y 15 días desde el momento de aplicación, para ser observadas al microscopio óptico con luz transmitida (*Leica DFC 320*) con el fin de comprobar el efecto que estos biocidas provocaban en la vitalidad de las algas y cianobacterias presentes.

Estudio de la interfase líquen-sustrato

Se tomaron pequeñas muestras de sustrato pétreo recubiertas por el líquen *Verrucaria nigrescens* y se dispusieron de manera oportuna para que la superficie líquénica quedara en contacto directo con el biocida durante 24 horas, simulando las papetas, impregnadas del producto, que se aplican comúnmente en restauración y conservación del Patrimonio Histórico a la hora de eliminar líquenes crustáceos.

Posteriormente, como método para determinar la eficacia de los productos estudiados, se observaron la características de las hifas de los líquenes (correspondientes a su parte fúngica) al microscopio electrónico de barrido (*SEM JEOL JSM-5600 LV*).

Estudio de la interacción biocida-sustrato al SEM-EDX

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es muy valiosa para el estudio de diversos mecanismos responsables de la alteración de la piedra como son la formación y crecimiento de cristales en la superficie tras el tratamiento biocida y la corrosión, lavado o disolución de constituyentes minerales como consecuencia de las soluciones ácidas.

Para ver el efecto de la interacción de las distintas soluciones biocidas con el material pétreo, se procedió a la observación de la superficie de las muestras tratadas al microscopio electrónico de barrido (*SEM JEOL JSM-5600 LV*, dotado con un analizador de energías dispersivas de rayos X modelo *INCA X-sight*, de *Instrumentos Oxford*).

Para ello, se obtuvieron superficies lisas y pulidas de la piedra y se introdujeron por inmersión

en el biocida durante 48 horas. Después se seccionaron en una estufa a 60°C durante 1 hora y posteriormente permanecieron a temperatura ambiente hasta ser observados al SEM para estudiar si se habían producido cambios.

Colorimetría

Para evaluar los posibles cambios de color ocasionados en el material pétreo tras los tratamientos con biocidas, se utilizó la técnica de colorimetría según la norma UNE-EN 15886:2011, empleando un colorímetro *Minolta Chroma meter CR-210*, que caracteriza el color en el espacio cromático CIE-Lab.

Para evaluar la variación de color de una forma global, se utiliza un parámetro único denominado incremento de color, ΔE . Una variación de color $\Delta E > 5$ supone que este cambio es perceptible a simple vista, por lo que es recomendable que el tratamiento no supere ese valor.

Porosidad abierta

Una manera de comprobar si el biocida ataca a la integridad de la piedra es calculando su porosidad abierta antes y después del tratamiento. Ésta se calculó en probetas de piedra del Puerto de Santa María, según la norma UNE-EN 1936:2007, realizando pesadas tanto del peso seco, como del peso saturado e hidrostático antes y después de la aplicación de los biocidas por inmersión durante 30 minutos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de Factores Biológicos de Alteración

Se identificaron 20 especies de organismos fotosintéticos.

Cianobacterias (Figura 4): *Gloeocapsa sp.* y *Lep-
tolyngbya sp.*

Algas verdes (Figura 5): *Acutodesmus obli-
quus*, *Asterarcys quadricellulare*, *Chlorella
variabilis*, *Desmodesmus sp.* y *Tetradasmus
obliquus*.

Líquenes (Figura 6): *Caloplaca saxicola*, *Ca-
loplaca teicholyta*, *Lecanora dispersa*, *Le-
canora muralis*, *Placocarpus schaeerer* y
Verrucaria nigrescens.

Musgos (Figura 7): *Funaria hygrometrica*,
Rhynchostegiella tenella y *Tortula muralis*.

Plantas superiores (Figura 8): *Althaea hirsuta*,
Cymbalaria muralis, *Polygonum monspe-
liensis* y *Umbilicus rupestris*.

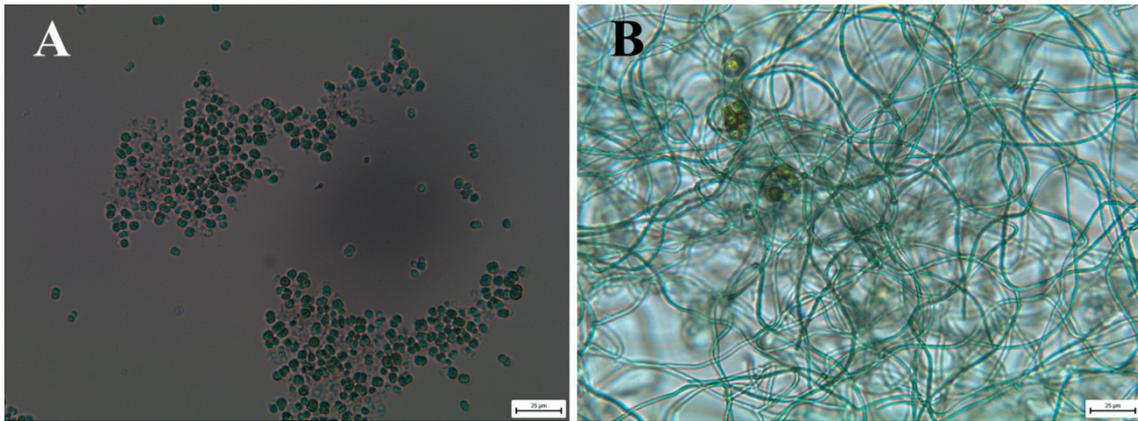


Figura 4. Cianobacterias al microscopio óptico con luz transmitida. A) *Gloeocapsa* sp. B) *Leptolyngbya* sp. Fotografías de Víctor Menguano.

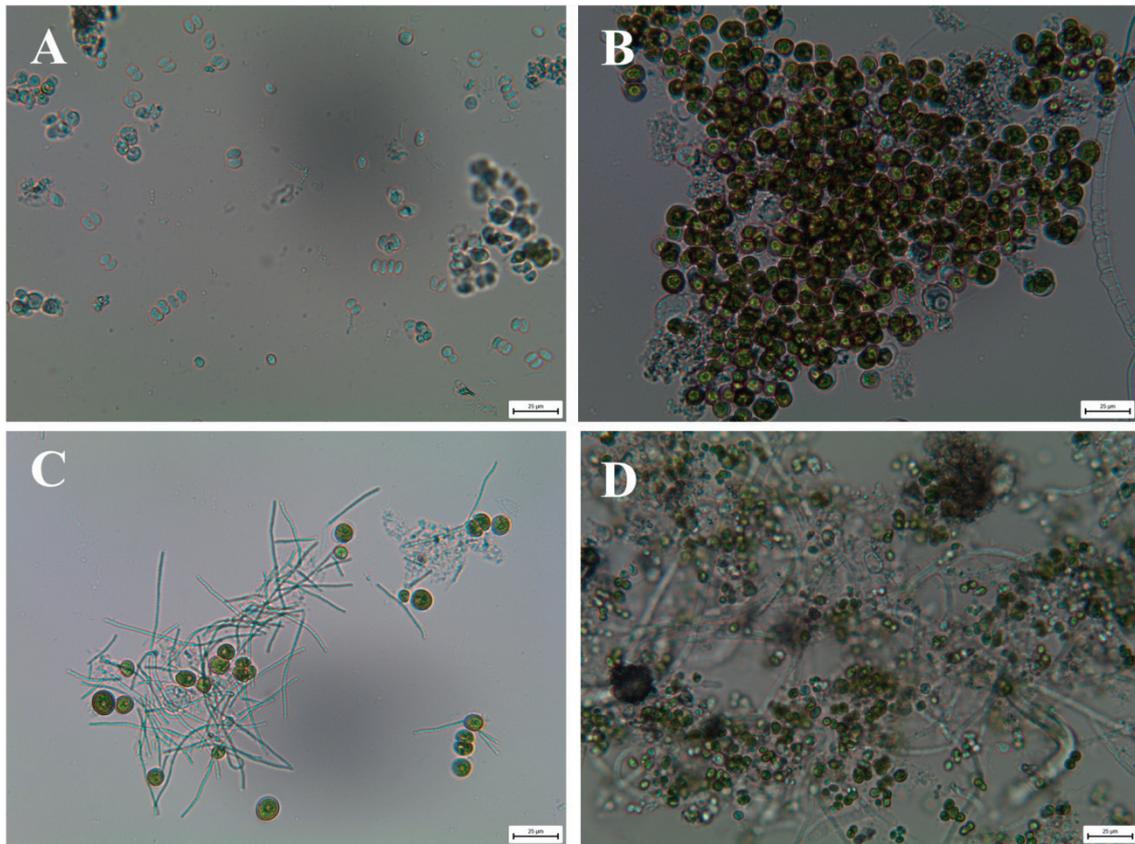


Figura 5. Algas verdes al microscopio óptico con luz transmitida. A) *Acutodesmus obliquus*. B) *Asterarcys quadricellulare*. C) *Chlorella variabilis*. D) *Desmodesmus* sp. Fotografías de Víctor Menguano.

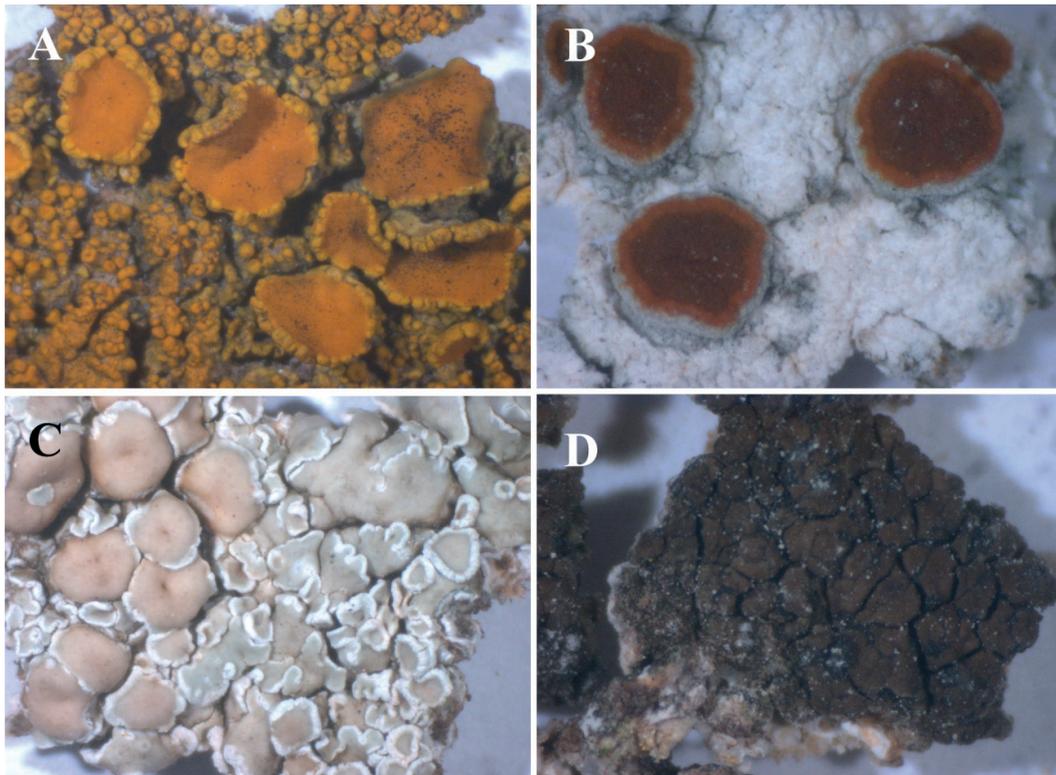


Figura 6. Algunos de los líquenes identificados, a la lupa binocular. A) *Caloplaca saxicola*. B) *Caloplaca teicholyta*. C) *Lecanora muralis*. D) *Verrucaria nigrescens*. Fotografías de Víctor Menguiano.

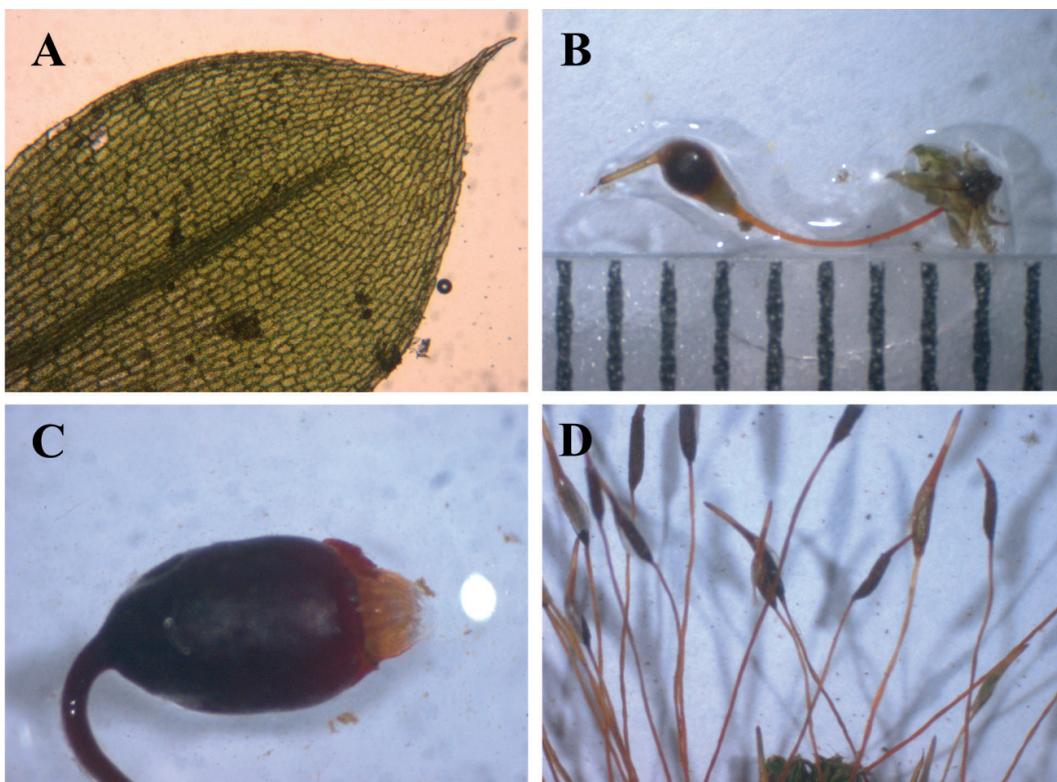


Figura 7. Algunas estructuras de los musgos identificados, a la lupa binocular. A) Filidio de *Funaria hygrometrica*. B) Esporofito de *Funaria hygrometrica*. C) Esporofito de *Rhynchostegiella tenella*. D) Esporofito de *Tortula muralis*. Fotografías de Víctor Menguiano.

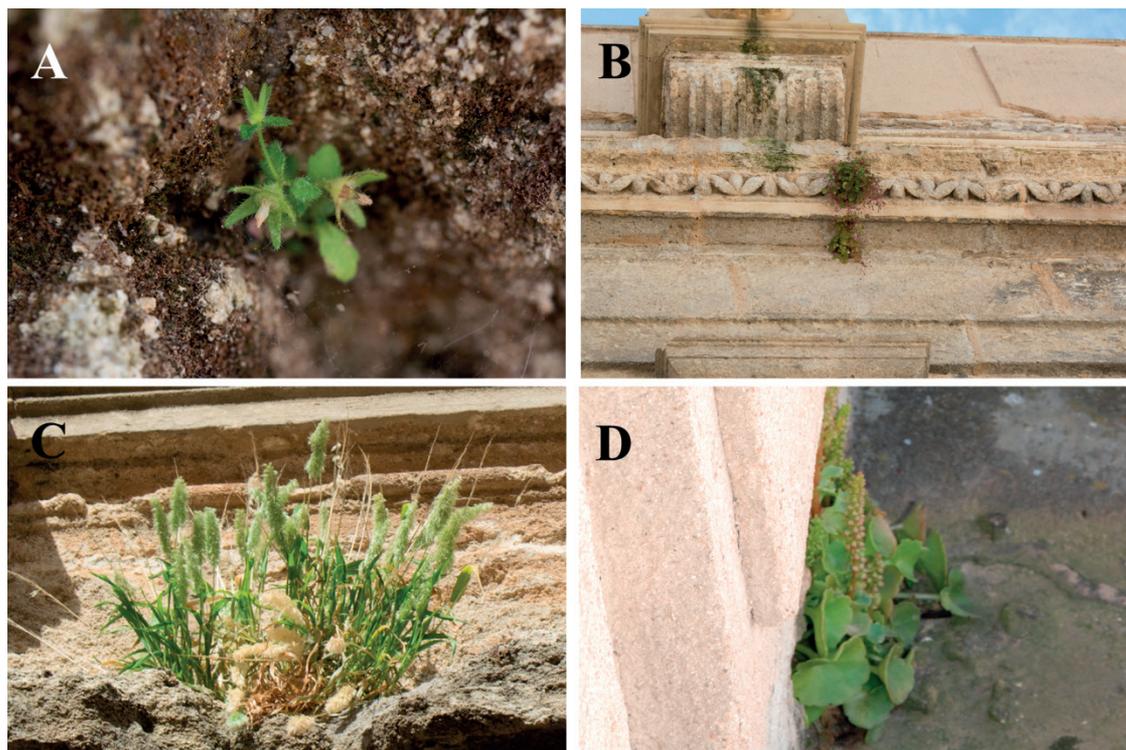


Figura 8. Plantas superiores identificadas. A) *Althaea hirsuta*. B) *Cymbalaria muralis*. C) *Polypogon monspeliensis*. D) *Umbilicus rupestris*. Fotografías de Víctor Menguiano.

En la cubierta predominan los líquenes, mientras que en las fachadas los agentes biodeteriogenos predominantes son cianobacterias y algas verdes, que forman pátinas y costras negras o verdosas según la zona, sobre todo en las zonas orientadas al norte y en las que están sometidas a escorrentía de agua o ascenso de agua por capilaridad, que permanecen húmedas más tiempo y constituyen por tanto un hábitat propio para su desarrollo. Los musgos se desarrollan en determinadas oquedades con retención de humedad. Las plantas superiores se presentan mayoritariamente sobre cornisas en altura, aunque también esporádicamente en otras zonas de fachadas y cubierta.

Las distintas especies biológicas presentes desempeñan un importante papel no sólo como causantes de daños de tipo meramente estético, sino, sobre todo, como agentes provocadores de transformaciones químicas y/o estructurales en los materiales.

El biodeterioro de los materiales se produce a través de mecanismos de distintos tipos: procesos físicos o mecánicos (disgregación o fractura) y procesos químicos (descomposición). Generalmente, éstos se producen de forma simultánea, pero dependiendo de los agentes biodeteriogenos, el tipo de sustrato y las condiciones ambientales pueden predominar los primeros o los segundos. Además de estas acciones directas, el desarrollo de microorganismos u organismos puede crear

unas condiciones favorables para el crecimiento de otras especies deteriogenas o, en otras palabras, dar lugar a una sucesión ecológica con un desarrollo de cenosis más complejas.

Los procesos físicos incluyen aquellos mecanismos que llevan a una pérdida de cohesión del sustrato debido a la acción mecánica de los organismos (movimientos o crecimiento). Se desprenden fragmentos a causa de la presión ejercida por el crecimiento de los organismos o de sus partes (por ejemplo, hifas fúngicas o raíces de plantas). Generalmente, el daño provocado por organismos es más grave que el que causan los microorganismos, debido a sus mayores dimensiones y, como consecuencia, a la mayor presión que ejercen. El sustrato reducido a finos fragmentos ofrece una superficie mayor a otros factores de degradación, especialmente en ambientes externos (por ejemplo, compuestos químicos, lluvia, viento, ciclos hielo-deshielo, etc.).

Los procesos químicos incluyen todos los mecanismos que llevan consigo la descomposición o la transformación del sustrato a causa de la actividad química de los organismos. La acción química se debe a procesos de asimilación o de excreción. En el primer caso, los organismos biodeteriorantes utilizan el material como fuente de nutrición, de donde extraen carbono o energía, y en el segundo caso, los materiales resultan dañados por la excreción de productos metabólicos intermedios o de

desecho, como ácidos o pigmentos que pueden deteriorar, colorear o dañar el sustrato.

En el caso del material pétreo exterior, las algas verdes y sobre todo las cianobacterias son los primeros organismos que lo colonizan, puesto que sólo necesitan luz, agua y unos cuantos compuestos inorgánicos y prefieren además un sustrato alcalino. Los factores más importantes que condicionan su aparición son la intensidad luminosa, la humedad, la temperatura y el pH. Su crecimiento se ve favorecido por el alto grado de humedad, así como la adherencia de polvo, residuos orgánicos y otras sustancias, por lo que se forma una capa o pátina fangosa que puede ser aprovechada por otros organismos (líquenes, musgos y plantas vasculares) y además mantiene la humedad en la superficie pétreo ayudando a su disolución por agua.

Las algas contribuyen al deterioro de los materiales pétreos a través de sus procesos respiratorios, reteniendo el agua y liberando ácidos o compuestos quelantes.

Junto a las cianobacterias, los líquenes juegan un importante papel como organismos pioneros en la colonización del material pétreo. En la cubierta de la capilla se observa un claro predominio de líquenes crustáceos epilíticos. Éstos ejercen una presión física en el sustrato mediante contracciones y expansiones del talo, que se producen en función de la humedad y, por tanto, de la absorción de agua. Los fragmentos minerales son eliminados del sustrato e incorporados al talo. Aún más importante es el daño producido químicamente mediante tres procesos principales: la producción de ácido carbónico, la excreción de ácido oxálico y la generación de compuestos liquénicos con propiedades quelantes.

Los musgos y plantas vasculares crecen cuando el sustrato y las condiciones ambientales son favorables, es decir, cuando se dan depósitos de humus, contenido suficiente de agua (sobre todo para los briófitos), una adecuada iluminación que

les permita la actividad fotosintética y una buena porosidad del sustrato que favorezca tanto la retención de humedad como la penetración mecánica de las raíces o de las ricinas. Provocan daños físicos, por penetración de raíces y ricinas en el sustrato, y daños químicos por producción de ácido carbónico mediante los procesos respiratorios, por la acidez de los ápices radicales, y por las propiedades quelantes y la acidez de los exudados radicales (estos exudados digieren el sustrato provocando fisuras en las que penetra el agua que, además de disolver y lavar el material, se congela en invierno rajando y separando porciones de la estructura).

La presencia de estas especies vegetales comporta también variaciones en los parámetros microclimáticos, por aumento de la humedad relativa y del estancamiento de agua, y por reducción de los contaminantes en el aire. Desde el punto de vista conservativo, los efectos pueden ser tanto negativos (favoreciendo el crecimiento de algas y musgos) como positivos (reducción de la erosión eólica y de los intercambios hídricos y, como consecuencia, de la migración de las sales).

Evaluación de tratamientos biocidas

Estudio de la vitalidad de microorganismos fotosintéticos

Tras la aplicación de los biocidas *in situ*, se procedió a la toma de muestras para ser observadas al microscopio óptico con el fin de determinar qué biocida es más eficaz contra dichos organismos fotótrofos. Trascurridos los primeros 7 días, no se observaron cambios sustanciales de vitalidad en los microorganismos. Sin embargo, a los 15 días de su aplicación se obtuvieron resultados visibles tanto al microscopio óptico como a simple vista (Figuras 9 y 10).

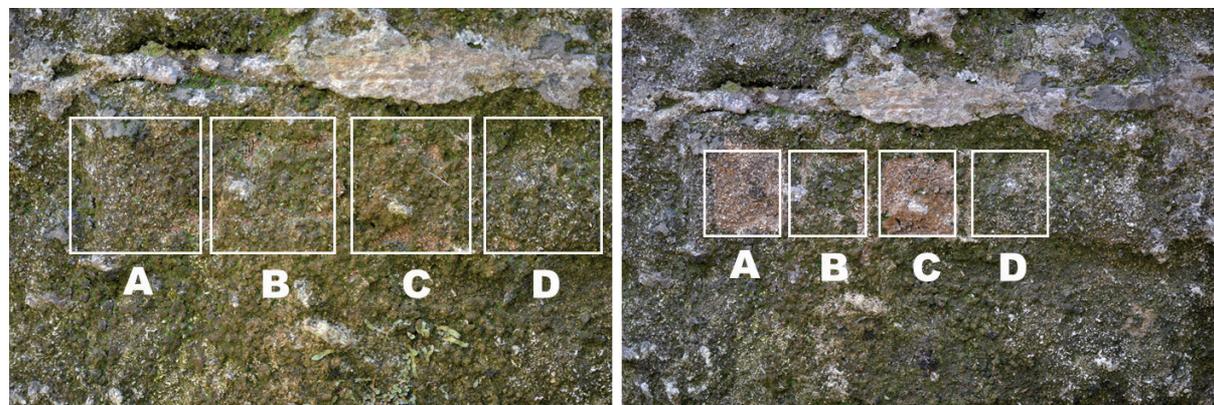


Figura 9. Aplicación de biocidas *in situ* sobre microorganismos, tras 7 (izquierda) y 15 (derecha) días. A, B y C corresponden a *Preventol Ri80*, *Biotin T* y *Biotin R*, respectivamente. D es el control con agua destilada. Fotografías de Marta Sameño.

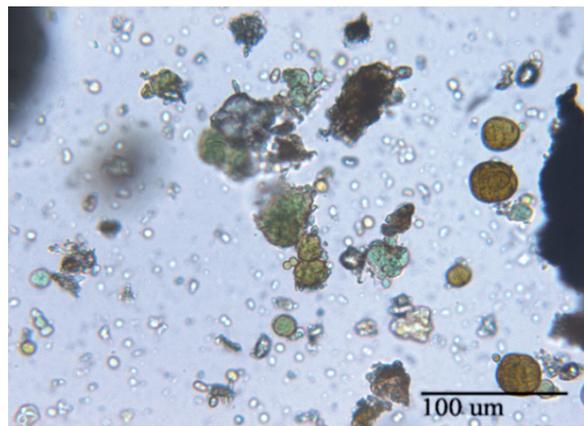


Figura 10. Microorganismos fotótrofos al microscopio óptico, tras 15 días de la aplicación de Preventol Ri80. Fotografía de Marta Sameño.

Una primera observación es que los microorganismos fotótrofos experimentan un cambio en la coloración tras la aplicación de todos los biocidas, con respecto al control.

Se puede determinar que existe un colapso de las células y pérdida de turgencia con el Preventol Ri80 que no se observa tan claramente con el resto de biocidas, por lo que se puede afirmar que éste es el más eficaz de los productos estudiados.

Estudio de la interfase líquen-sustrato

Los distintos biocidas afectan negativamente a las estructuras biológicas del líquen, ya que es bastante notorio el cambio que se producen en sus hifas (Figura 11). Con el tratamiento control, basado en aplicación de agua destilada, se observan las hifas turgentes y engrosadas mientras que con los distintos biocidas, las hifas se encuentran colapsadas, con pérdida de grosor y firmeza. Esto es indicativo de la eficacia del biocida, el cual será altamente recomendable a la hora de eliminar estos organismos de estructuras y obras pertenecientes al Patrimonio Histórico de características similares.

A la luz de los resultados obtenidos, se confirma que el *Preventol Ri80* es el más eficaz de los

productos estudiados. Por el contrario, el *Biotin T* es el que menor poder biocida posee. Los resultados concuerdan con los obtenidos mediante la observación de vitalidad de los microorganismos fotótrofos observados al microscopio óptico.

Estudio de la interacción biocida-sustrato al SEM-EDX

Las observaciones realizadas al microscopio electrónico de barrido no han mostrado una alteración muy evidente de la piedra tras la impregnación por inmersión en los distintos biocidas empleados.

Simultáneamente a la observación al microscopio electrónico de barrido, se han realizado distintos análisis, obteniendo el espectro EDX de puntos o áreas de las muestras para obtener su composición elemental.

En las imágenes obtenidas al microscopio electrónico de barrido (Figura 12) se observa la presencia de cristales, tanto en las muestras tratadas con los distintos biocidas como en la muestra control, impregnada de agua destilada. Al realizar los análisis EDX sobre ellos se determina la presencia de cloro (Cl) en su composición elemental.

En un primer momento se podría imaginar que la aparición de este elemento es indicativo de la interacción del biocida (cloruro de benzalconio) con el sustrato, pero al estar presente en la muestra tratada con agua destilada, cabría pensar que el material constitutivo, la piedra de El Puerto de Santa María, lo tenga en su composición original. De hecho, en el análisis EDX de la muestra control, se puede observar también al sodio (Na), lo cual puede indicar que el cristal señalado es cloruro de sodio (NaCl), también conocido como sal común. Esto puede deberse a la acción de los aerosoles marinos, ya que el material pétreo en estudio proviene de una cantera que se encuentra próxima al mar.

A raíz de los resultados obtenidos al SEM, se puede determinar que no existen diferencias morfológicas significativas en las superficies de los materiales pétreos al tratarse con los distintos biocidas.

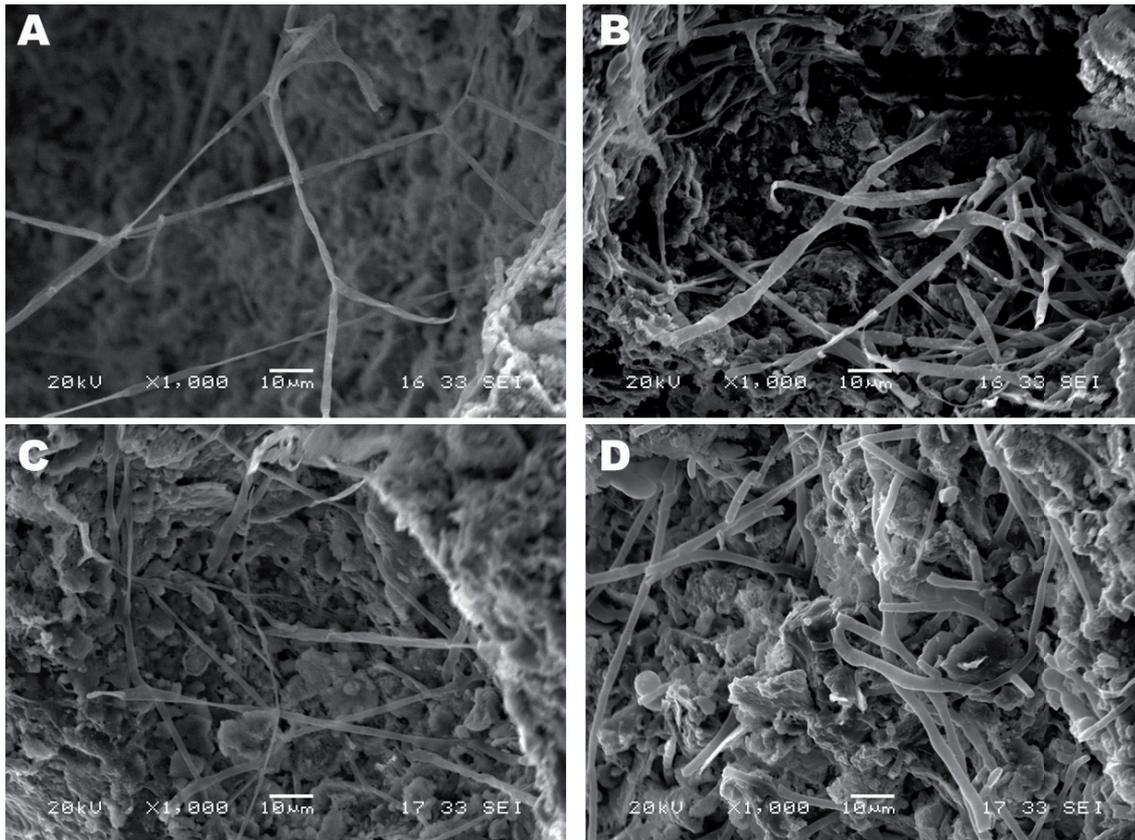


Figura 11. Microfotografías al microscopio electrónico de barrido (SEM) en modo de electrones secundarios, mostrando las hifas de líquen tras el tratamiento con A) *Preventol Ri80*. B) *Biotin T*. C) *Biotin R*. D) y agua destilada como control. Fotografías de Marta Sameño.

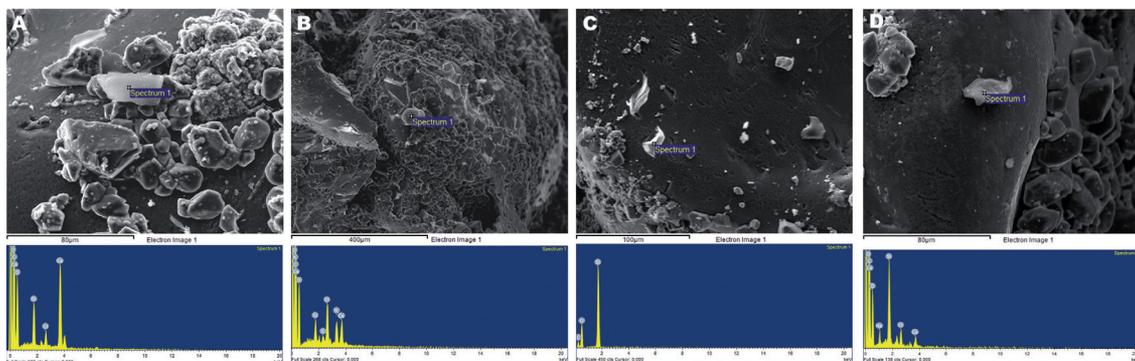


Figura 12. Microfotografías al microscopio electrónico de barrido (SEM) en modo de electrones secundarios y espectro EDX de las muestras tratadas con A) *Preventol Ri80*. B) *Biotin T*. C) *Biotin R*. D) control con agua destilada. Fotografías de Marta Sameño.



Figura 13. Probetas de piedra del Puerto para analizar el posible cambio de color producido tras someterlas a los distintos biocidas. Fotografía de Marta Sameño.

Colorimetría

Tras el estudio colorimétrico (Figura 13) sólo se aprecia un cambio de color significativo ($\Delta E=7,4$) en la muestra tratada con *Preventol Ri80*, la cual pierde luminosidad y se vuelve un poco más amarillenta. No es el caso para los otros productos ensayados, siendo el Biotin R el que proporciona el menor cambio de color ($\Delta E=3,2$).

Porosidad

Según los resultados obtenidos (Figura 14) se puede afirmar que, de manera general, la porosidad abierta aumenta tras el tratamiento con biocidas. Sin embargo, el porcentaje de cambio no es significativo ($<0,5\%$), por lo que se puede concluir que los biocidas empleados no afectan a la porosidad del material pétreo.

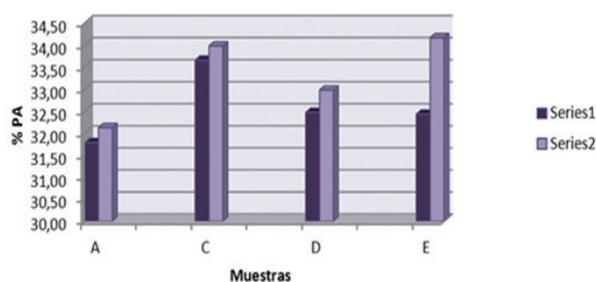


Figura 14. Representación gráfica de la porosidad abierta de las probetas pétreas antes y después del tratamiento con los biocidas estudiados.

CONCLUSIONES

Se han detectado e identificado una serie de organismos fotosintéticos involucrados en procesos de biodeterioro del material pétreo del inmueble, lo cual resulta fundamental para el conocimiento del estado de conservación del edificio y la futura planificación de los tratamientos de conservación del mismo.

Para el control del crecimiento de los organismos identificados se aconseja la aplicación combinada de métodos mecánicos, que comportan la remoción física de los biodeteriogenos (usando instrumentos manuales como bisturíes, espátulas, rasquetas, aspiradoras, etc.), junto con métodos de control o tratamientos químicos, que conllevan el uso de biocidas específicos.

Para la elección del tratamiento biocida más adecuado se han realizado estudios previos evaluando distintos productos, tanto su eficacia como su posible efecto secundario sobre el material pétreo.

Los resultados obtenidos determinan que ninguno de los productos biocidas ensayados causa graves daños sobre la piedra, y aunque el *Preventol Ri80* es el que mayor cambio de color proporciona a corto plazo, sin embargo es el que resulta más eficaz contra organismos fotoautótrofos.

BIBLIOGRAFÍA

- BLAST. National Center for Biotechnology Information, USA.: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>
- CANEVA, G; NUGARI, M.P.; SALVADORI, O. *La biología en la restauración*. Hondarribia: Nerea, 2000.
- CHAROLA, A.E.; McNAMARA, C.; KOESTLER, R.J. (Eds.). *Biocolonization of Stone: Control and Preventive Methods. Proceedings from the MCI Workshop Series*. Washington: Smithsonian Institution Scholarly Press, 2011.
- DE LOS RÍOS, A; CÁMARA, B; WIERZCHOS, J; ASCASO, C. (2008). "Diagnóstico de procesos de biodeterioro por combinación de microscopía in situ y técnicas de biología molecular". En *La investigación sobre Patrimonio Cultural*. Eds. Saíz Jiménez y Rogerio Candelera. Sevilla: Red Temática de Patrimonio Histórico y Cultural, 2008, pp. 183-196.
- MENGUIANO CHAPARRO, V. M.; PÉREZ CASTIÑEIRA, J.R.; SAMEÑO PUERTO, M. "Identificación de hongos causantes de pudrición en las bóvedas de las pinturas de la Sala de los Reyes de la Alhambra de Granada mediante técnicas de Biología Molecular". En *La Ciencia y el Arte IV: Ciencias y tecnologías aplicadas a la conservación del patrimonio*. Madrid: Ed. Instituto del Patrimonio Cultural de España, Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, 2013, pp. 245-250.
- MENGUIANO CHAPARRO, V.M.; PÉREZ CASTIÑEIRA, J.R.; SAMEÑO PUERTO, M. "Estudio de microorganismos causantes de biodeterioro mediante técnicas de biología molecular en el IAPH". *Revista PH*, 2013, 84, pp. 174-187
- NUGARI, M.P; SALVADORI, O. "Biodeterioration control in cultural heritage: methods and products". En *Molecular biology and cultural heritage, Proceedings of International Congress on Molecular Biology and Cultural Heritage*. Sevilla: Balkema Publishers, Lisse (NL), 2003, pp. 233-242
- NUGARI, M.P; SALVADORI, O. "Biocides and treatment of stone: limitations and future prospects". En Koestler, R.; Koestler, V.; Charola, A.; Nieto-Fernandez, F. (Eds). *Art, biology, and conservation: biodeterioration of works of art*. New York: The Metropolitan Museum of Art, 2002.
- PRIN, J.L.; GONZÁLEZ, N; VILLARROEL, H; RAMÍREZ, M.; ROJAS DE GÁSCUE, B. "El secado de punto crítico (SPC) como técnica aplicada en la preparación de geles de poli(acrilimida-CO-ácido acrílico) por microscopía electrónica de barrido". *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, vol. 5, 2012, pp. 20-23.
- SAMEÑO PUERTO, M; VILLEGAS SÁNCHEZ, R; GARCÍA ROWE, J. "Estudio de la Interacción de los Biocidas con los Materiales Pétreos del Yacimiento del Cerro de la Plaza de Armas de Puente Tablas (Jaén)". *Actas del III Congreso Internacional de Rehabilitación del Patrimonio Arquitectónico*. Granada: 1996, pp. 520-524.
- UNE-EN 1936:2007. "Métodos de ensayo para piedra natural. Determinación de la densidad real y aparente y de la porosidad abierta y total".
- UNE-EN 15886:2011. "Conservación del patrimonio cultural. Métodos de ensayo. Medición del color de superficies".