

Estudos Arqueológicos de Oeiras,
19, Oeiras, Câmara Municipal, 2012, p. 287-294

TÉCNICAS NO DESTRUCTIVAS PARA LA MONITORIZACIÓN CUANTITATIVA Y CUALITATIVA DE PROCESOS DE BIODETERIORO EN MATERIALES PÉTREOS

M. A. Rogerio-Candelera¹, A. Z. Miller², A. Dionísio², M. F. Macedo³ & C. Saiz-Jiménez¹

Resumen

La colonización biológica de la piedra es uno de los principales problemas para la conservación de edificios y monumentos. El biodeterioro de la piedra ha sido estudiado empleando metodologías para la identificación de los microorganismos y para el seguimiento de su acción que, en su mayor parte necesitan de una gran inversión de tiempo y de un muestreo extensivo. Muchos de los procedimientos de muestreo empleados pueden, incluso, convertir a los propios investigadores en agentes de deterioro. En este estudio se propone el uso de técnicas para la detección temprana y monitorización de colonizaciones microbianas sin necesidad de contacto, como manera de contribuir al objetivo de preservar el patrimonio cultural.

Palabras clave: biodeterioro, monitorización, análisis digital de imágenes, fluorescencia *in vivo* de clorofila *a*, cueva de Altamira

Abstract

Biological stone colonisation is one of the main problems related to the conservation of monuments and buildings. Stone biodeterioration has been assessed by several authors using time-consuming and extensive sampling methodologies for microbial identification and the follow-up of their action. However, most sampling procedures may convert the own researchers in deterioration agents. In this study the use of non-contact techniques for early detection and monitoring of microbial colonisations is proposed, as a contribution to the goal of the preservation of cultural heritage.

Keywords: biodeterioration, monitoring, digital image analysis, *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence, Altamira cave

1 – INTRODUCCIÓN

Gran parte del patrimonio arquitectónico está construido con calizas. Su conservación, desafortunadamente, plantea problemas relacionados con su amplio rango de propiedades intrínsecas y variadas respuestas a diferentes condiciones climáticas y ambientales. El estudio de los procesos de deterioro que se producen en su superficie (MAURÍCIO *et al.*, 2005) ha mostrado que la tasa de deterioro puede ser gradual y, dependiendo de las condiciones climáticas, bastante predecible. No obstante, es mucho más común que se deterioren mediante crisis episódicas y a veces catastróficas. Entre los procesos dinámicos complejos de deterioro relacionados con estas rocas, el biodeterioro, especialmente para los bienes expuestos al ambiente exterior, es uno de los problemas más importantes que tienen que afrontar los conservadores.

¹Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, IRNAS-CSIC. Av. Reina Mercedes 10, 41012 Sevilla, España.

²Centro de Petrología e Geoquímica, Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal.

³VICARTE, Departamento de Conservação e Restauro, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Monte da Caparica, 2829-516 Caparica, Portugal.

Entre los microorganismos colonizadores, las microalgas juegan un importante papel ecológico, como pioneras en la colonización de las superficies pétreas, sobre las que desarrollan biopelículas fototróficas (ROESELERS *et al.*, 2008). Su presencia atrae a los microorganismos heterotróficos, que contribuyen al desarrollo de biopelículas complejas y estratificadas. Las actividades vitales de los componentes de estas biopelículas tienen un gran potencial biodeteriorante que va desde lo puramente estético a cambios químicos y físicos que pueden llevar a la desagregación total de la superficie.

En general, la biomasa algal puede estimarse utilizando técnicas de cuantificación de la clorofila *a*. La mayoría de estos métodos se basan en la extracción de la clorofila de las células, por lo que son en general lentos, necesitan gran cantidad de muestra y no permiten la medición repetida de la misma unidad de muestreo. Recientemente, se ha introducido en el análisis de monumentos y edificios históricos la cuantificación de clorofila *a* mediante la detección de su fluorescencia natural (TOMASELLI *et al.*, 2002). Al no necesitarse muestreo, resulta útil para detectar microorganismos fototróficos y monitorizar tratamientos preventivos. La cuantificación y monitorización de biopelículas superficiales puede también llevarse a cabo mediante técnicas de análisis digital de imágenes (DIA), que se basan en el carácter matricial de las imágenes digitales. Combinando estas técnicas con la fotorrestitución digital es posible obtener valores cuantitativos referidos a superficies.

En este trabajo se utilizan técnicas DIA para dos experiencias distintas: una de ellas, en combinación con Fluorescencia *in vivo* de clorofila *a* como método rápido y no invasivo para la detección y monitorización de procesos de biodeterioro en diferentes tipos de calizas. La otra experiencia incide en la diferenciación y cuantificación de diferentes colonizaciones microbianas en la cueva de Altamira (Santillana del Mar, Cantabria, España).

2 - MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo presenta dos experiencias diferentes. La primera de ellas, llevada a cabo en condiciones de laboratorio, se realizó con el apoyo de otra técnica experimental no destructiva. La segunda tuvo lugar *in situ* para evaluar el comportamiento a lo largo del tiempo de colonizaciones bacterianas que afectan a un conjunto de pinturas rupestres declaradas Patrimonio de la Humanidad.

Para el experimento de colonización en laboratorio se utilizaron muestras de cinco litotipos diferentes: Caliza de Ançã (CA); Caliza de Lioz (CL); Piedra de San Cristóbal (SC); Piedra de Escúzar (PF) y Piedra de Lecce (PL), descritos en Miller *et al.* (2010a). Las características básicas del experimento también se describen en este mismo trabajo. Para monitorizar el crecimiento de los microorganismos fototróficos sobre la superficie de las muestras pétreas, triplicados de las mismas se fotografiaron con una cámara digital Kodak EasyShare P850 sobre papel milimetrado a los 0, 45 y 90 días de incubación. Las imágenes digitales generadas se homogeneizaron geométrica y radiométricamente para asegurar la solidez de la serie temporal y se descorrelacionaron sus ND mediante análisis de Componentes Principales (PCA). Las bandas escogidas se segmentaron para seleccionar las áreas colonizadas para su cuantificación, tras ser escaladas. Estas operaciones se llevaron a cabo utilizando los códigos informáticos HiperCube v. 9.5 (Army Geospatial Centre, Alexandria, Virginia, USA) e ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Como técnica complementaria, se midió por triplicado la Fluorescencia *in vivo* de clorofila *a* en las muestras tras 90 días de incubación, empleando un espectrofluorómetro SPEX Fluorolog-3 FL3-22 con fibra óptica (Horiba Jobin Yvon F-3000).

Por otra parte, en el transcurso de los diferentes proyectos de investigación llevados a cabo en la cueva de Altamira para la conservación de sus manifestaciones parietales se detectaron colonizaciones microbianas que proliferaban en varias zonas, caracterizadas *de visu* por la presencia de manchas macroscópicas blancas, grises y amarillas que corresponden con tipos diferentes de biopelículas con poblaciones microbianas diferenciadas, con cierta variabilidad en cuanto a morfología, dimensiones y tonalidades de color (CUEZVA *et al.*, 2009). La metodología de detección y cuantificación se describe *in extenso* en Rogerio-Candelera (2010).

3 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 - Cuantificación de áreas cubiertas mediante DIA

La binarización de las bandas obtenidas mediante análisis de Componentes Principales (Fig. 1) permitió aislar las áreas cubiertas por las biopelículas verdes y cuantificar su extensión a lo largo del tiempo (Fig. 2). Con los datos obtenidos con esta técnica fue posible evaluar qué probetas mostraban las superficies más ampliamente colonizadas, o, en otras palabras, un crecimiento epilítico significativo. El cultivo fototrófico, distribuido aleatoriamente sobre las superficies pétreas, creció en el curso de la incubación. A pesar de las dificultades encontradas para medir las biopelículas fototróficas en la superficie de las muestras de PF y SC, muy enmascaradas por la gran macroporosidad de estos litotipos, podemos considerar que la utilización de las técnicas de DIA constituyó un éxito. PL mostró el mayor incremento microbiano, seguido de las muestras de PF. En las muestras de SC, el área total cubierta por la biopelícula no mostró incremento a lo largo del periodo de estudio. CL mostró un incremento muy somero, y CA permaneció estable a lo largo de los últimos tiempos de incubación. Es de destacar, en particular, el incremento significativo de la colonización registrado para PF, donde el área superficial cubierta fue mayor que tras la inoculación, observándose un incremento progresivo a lo largo del experimento.

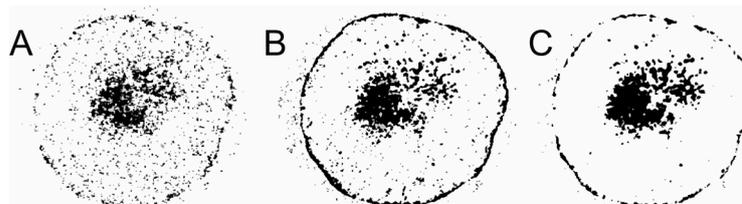


Fig. 1 - Imágenes binarias obtenidas con ImageJ para el litotipo CA: A) Tras la inoculación; B) Tras 45 días de incubación; C) Tras 90 días de incubación.

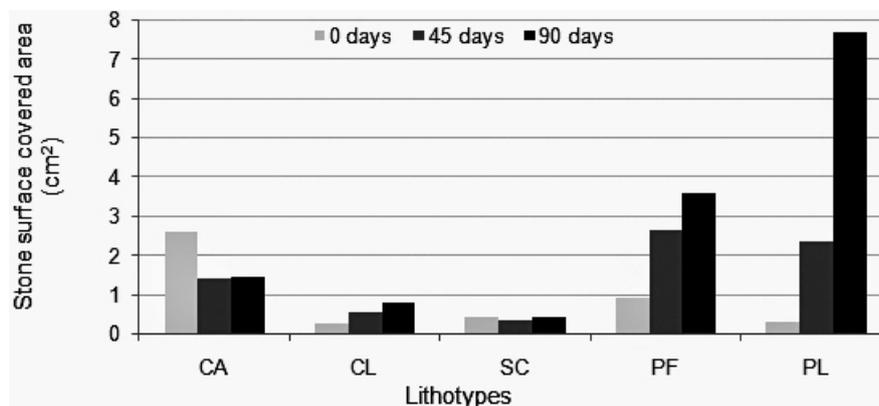


Fig. 2 - Áreas cubiertas por biopelículas algales tras 0, 45 y 90 días de incubación, cuantificadas mediante análisis digital de imágenes.

3.2 – Cuantificación de biomasa fotosintética con Fluorescencia *in vivo* de Clorofila *a*

Los espectros de emisión obtenidos a los 90 días mostraron el típico pico de fluorescencia de la clorofila *a* a 684 nm (Fig. 3). Las mayores intensidades se obtuvieron para los litotipos PL y CA, que presentaban biopelículas patentemente visibles en su superficie. Estos resultados se debieron probablemente a su textura de grano fino y características petrofísicas (MILLER *et al.*, 2010a). Como también se verifica en la Fig. 3, las muestras de SC, seguidas de CL mostraron las menores cantidades de clorofila *a*, y consecuentemente el menor desarrollo algal en sus superficies. Estos datos corroboran los resultados obtenidos mediante DIA.

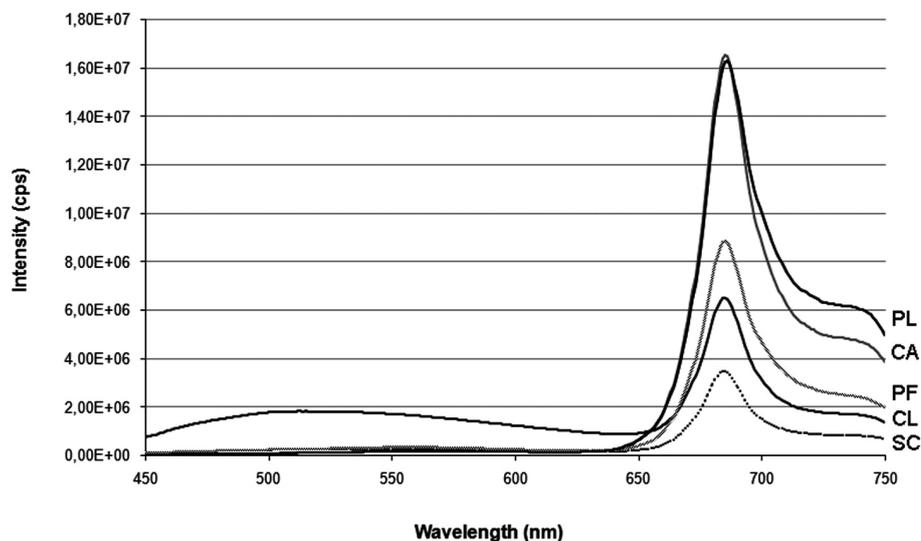


Fig. 3 – Espectros de fluorescencia de clorofila *a* medidos tras 90 días de incubación (longitud de onda de excitación: 430 nm). El espectro de cada litotipo abarca la media de 15 espectros.

De acuerdo con ambos enfoques, las muestras de PL mostraron superficies colonizadas extensivamente, con un crecimiento epilitico significativo, seguidas por el litotipo PF. Por el contrario, SC mostró la menor biomasa. De acuerdo con los datos publicados por Miller *et al.* (2010b), que combinaba la técnica de cuantificación de clorofila *a in vitro* con fluorescencia *in vivo* de clorofila *a* para analizar los cinco litotipos, SC y PF eran los sustratos más colonizados, concluyéndose que en estos dos litotipos se dio crecimiento endolítico, comprobado con microscopía óptica y electrónica de cortes transversales de las muestras (MILLER *et al.*, 2010a), lo que explica la discordancia con los resultados obtenidos con las técnicas de análisis de superficie empleadas en este trabajo.

3.3 – Cuantificación de crecimientos microbianos en la cueva de Altamira

Los resultados alcanzados en la cuantificación de superficies cubiertas por biopelículas microbianas en diferentes puntos de control pueden resumirse en la Fig. 4 y la Tabla 1. Mediante PCA pudo detectarse que las bandas correspondientes a la segunda Componente Principal eran las más adecuadas para representar las manchas amarillas, mientras que las correspondientes a la tercera Componente Principal permitían definir mejor la categoría artificial blancas/grises. Los valores cuantitativos obtenidos apuntan a que, en general, la contaminación microbiana presenta una tendencia hacia un estado estacionario (SAIZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2011),

que debe atribuirse a la estabilización de las condiciones ambientales imperantes en la cueva tras el cierre producido en 2002.

Hay que tener en cuenta, no obstante, que la medición de superficies colonizadas *in situ* está sujeta a numerosos factores de error difícilmente cuantificables (ROGERIO-CANDELER, 2011), por lo que deben matizarse estos resultados.

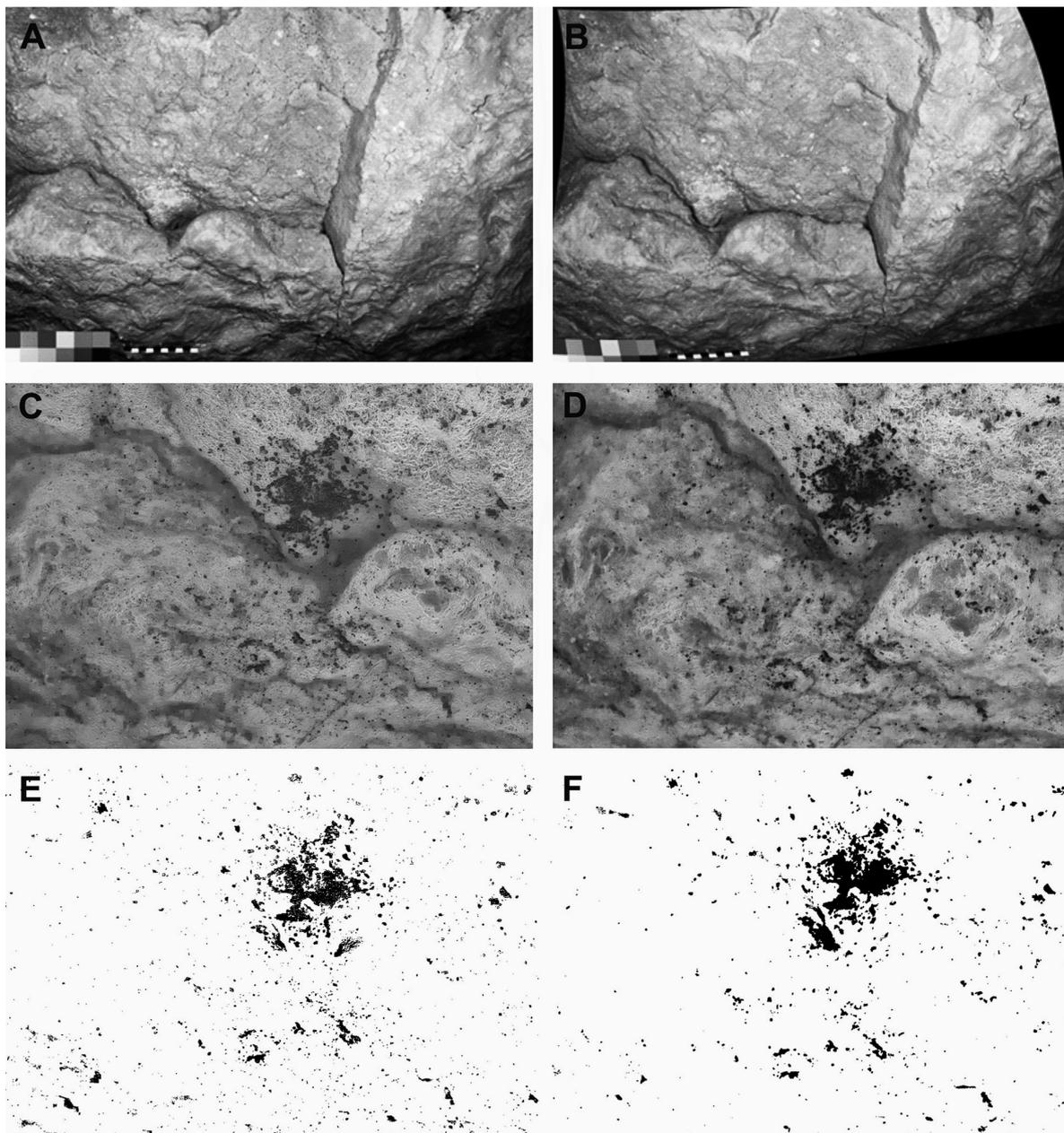


Fig. 4 – Correcciones geométricas en los fotogramas del punto de control 3 de la cueva de Altamira. A) imagen correspondiente a 2007; B) imagen tomada en 2009; C) imagen correspondiente a la tercera Componente Principal mostrando las colonizaciones blancas/grises de 2007; D) imagen correspondiente a la tercera Componente Principal mostrando las colonizaciones blancas/grises de 2009; E) imagen binarizada que muestra las áreas seleccionadas para su cuantificación. Estado correspondiente a 2007; F) imagen binarizada que muestra las áreas seleccionadas para su cuantificación. Estado correspondiente a 2009.

Tabla 1 – Superficie ocupada por las diferentes colonizaciones microbianas en las áreas de muestreo delimitadas en los diferentes fotogramas.

Punto de Control	Fotograma	Tipo colonización	Área ocupada (cm ²)	% área total
1	2007	Amarillas	33.720	2.17
	2009		64.076	4.13
	2007	Blancas/grises	44.900	2.89
	2009		25.570	1.65
3	2007	Amarillas	40.092	1.63
	2009		46.241	1.88
	2007	Blancas/grises	89.443	3.63
	2009		99.483	4.04
5	2007	Blancas/grises	14.065	1.40
	2009		17.200	1.70
6	2007	Blancas/grises	57.277	4.65
	2009		59.947	4.87

4 – CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran la utilidad de los métodos no destructivos basados en el análisis digital de imágenes para monitorizar el desarrollo de colonizaciones microbianas, tanto fototróficas como heterotróficas, sobre superficies pétreas. El experimento llevado a cabo en condiciones de laboratorio y evaluado con otra técnica independiente permite asegurar que los resultados son lo suficientemente fiables para extrapolar la técnica a la monitorización *in situ* de procesos de colonización biológica, en los que las condiciones de medición son bastante más complicadas, sobre todo en sistemas difíciles de referenciar como son las cuevas.

Una de las mayores ventajas del uso de estas técnicas es su no invasividad, que permite la obtención de datos tanto cualitativos como cuantitativos, de interés para la modelización del comportamiento de colonizaciones microbianas, y por tanto para establecer estrategias de conservación de bienes culturales, sin necesidad de toma de muestras. Las técnicas empleadas permiten por otra parte la detección temprana de estas colonizaciones, incluso cuando son difícilmente apreciables a simple vista. En el caso del trabajo en sistemas especialmente frágiles, como las cuevas, el uso de estas técnicas permite que la posible afección causada por la presencia de los investigadores se minimice, ya que el tiempo de permanencia en las mismas se reduce drásticamente.

AGRADECIMIENTOS

AZM agradece a la Fundação para a Ciência e a Tecnologia - Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior su beca postdoctoral (sfrh/bpd/63836/2009). Este estudio ha sido financiado parcialmente por el Centro de Petrologia e Geoquímica do Instituto Superior Técnico (CEPGIST) y por el proyecto CONSOLIDER TCP CSD2007-00058. Este trabajo ha sido cofinanciado con fondos FEDER.

REFERENCIAS

- CUEZVA, S.; SÁNCHEZ-MORAL, S.; SAIZ-JIMÉNEZ, C. & CAÑEVERAS, J. C. (2009) – Microbial communities and associated mineral fabrics in Altamira cave. *International Journal of Speleology* 38, p. 83-92.
- MAURÍCIO, A.; PACHECO, A.; BRITO, P.; CASTRO, B.; FIGUEIREDO, C. & AIRES-BARROS, L. (2005) – An ionic conductivity-based methodology for monitoring salt systems in monument stones. *Journal of Cultural Heritage* 6, p. 287-293.
- MILLER, A. Z.; LEAL, N.; LAIZ, L.; ROGERIO-CANDELERIA, M. A.; SILVA, R. J. C.; DIONÍSIO, A.; MACEDO, M. F. & SAIZ-JIMÉNEZ, C. (2010a) – Primary bioreceptivity of limestones applied on Mediterranean Basin monuments. In: SMITH, B. J.; GÓMEZ-HERAS, M.; VILES, H. A. & CASSAR, J. (Eds.), *Limestone in the Built Environment: Present Day Challenges for the Preservation of the Past*. London: Geological Society. (Geological Society Special Publications; 331), p. 79-92.
- MILLER, A. Z.; ROGERIO-CANDELERIA, M. A.; LAIZ, L.; WIERZCHOS, J.; ASCASO, C.; SEQUEIRA BRAGA, M. A.; HERNÁNDEZ-MARINÉ, M.; MAURÍCIO, A.; DIONÍSIO, A.; MACEDO, M. F. & SAIZ-JIMÉNEZ, C. (2010b) – Laboratory-induced endolithic growth in calcarenites: biodeteriorating potential assessment. *Microbial Ecology* 60, p. 55-68.
- ROESELERS, G.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. & MUYZER, G. (2008) – Phototrophic biofilms and their potential applications. *Journal of Applied Phycology* 20, p. 227-235.
- ROGERIO-CANDELERIA, M. A. (2010) – El análisis de imagen como herramienta de investigación no invasiva de cuevas con arte rupestre. In: DURÁN J. J. & CARRASCO, F. (Eds.), *Cuevas: Patrimonio, Naturaleza, Cultura y Turismo*. Madrid: ACTE, p. 203-216.
- ROGERIO-CANDELERIA, M. A. (2011) – *Técnicas de análisis digital de imágenes para la documentación integral de la pintura rupestre*. Sevilla: Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla.
- SAIZ-JIMÉNEZ, C.; CUEZVA, S.; JURADO, V.; FERNÁNDEZ-CORTES, A.; PORCA, E; BENAVENTE, D.; CAÑEVERAS, J. C. & SÁNCHEZ-MORAL, S. (2011) – Paleolithic art in peril: Policy and science collide at Altamira cave. *Science* 334 (6052), p. 42-43.
- TOMASELLI, L.; LAMENTI, G. & TIANO, P. (2002) – Chlorophyll fluorescence for evaluating biocide treatments against phototrophic biodeteriogens. *Annals of Microbiology* 52, p. 197-206.