

ESTUDIO COMPARATIVO DE COMUNIDADES BACTERIANAS EN MONUMENTOS MEDIANTE TECNICAS MOLECULARES Y MICROBIOLOGICAS

G. Piñar¹, L. Laiz², W. Lubitz¹ y C. Saiz-Jiménez²

¹ Instituto de Microbiología y Genética. Universidad de Viena, A-1030 Viena, Austria. ² Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC, Apartado 1052, 41080, Sevilla, España.
e-mail: saiz@irmase.csic.es

RESUMEN

La aplicación de métodos moleculares, especialmente la amplificación del ADN que codifica para el ARN ribosómico 16S, permite el estudio de las comunidades bacterianas no cultivables de los monumentos y su comparación con las cultivables.

Palabras clave: biodeterioro, comunidades microbianas, bacterias halófilas, *Archaea*, PCR, DGGE, librerías clónicas.

Abreviaturas: PCR, reacción en cadena de la polimerasa; DGGE, electroforesis en gel de gradiente de desnaturalizantes.

INTRODUCCION

Los microorganismos son uno de los principales causantes del deterioro de materiales (Bock y Sand, 1993; Saiz-Jiménez, 1994). Las comunidades microbianas asociadas a tales materiales son en parte responsables del deterioro químico y físico sufrido por los mismos, alterando a través de distintos mecanismos su apariencia estética y su integridad física. La excreción de enzimas y la producción de ácidos orgánicos disuelve los componentes estructurales de los distintos sustratos, contribuyendo así al proceso de deterioro (Krumbein, 1988).

Los esfuerzos realizados para eliminar los microorganismos que contribuyen al deterioro de monumentos han sido en general inefectivos, debido al desconocimiento de la diversidad microbiana existente en dichos objetos. En este contexto, sería conveniente realizar proyectos interdisciplinares de restauración, con la colaboración de restauradores y microbiólogos, para un buen asesoramiento del modo y la extensión en la aplicación de un determinado proceso de limpieza y restauración. Asimismo, sería razonable controlar los cambios sufridos por las comunidades microbianas después de la aplicación de un

tratamiento de restauración, para poder realizar una evaluación del impacto causado por el mismo.

Tradicionalmente, la estrategia a seguir cuando se ha abordado el estudio de comunidades microbianas responsables del deterioro sufrido por monumentos ha sido el uso de técnicas microbiológicas. Estas técnicas conllevan una serie de ventajas, tales como obtener cultivos puros de los microorganismos presentes en monumentos, con la consiguiente posibilidad de estudiar las actividades metabólicas de los mismos, y su posible relación en cuanto al deterioro sufrido por el objeto. No obstante, estas técnicas llevan asociadas una serie de desventajas. La cantidad de muestra necesaria para diseñar una buena estrategia de cultivo (con distintos medios de cultivo, T^o, humedad, pH, etc) normalmente excede a la cantidad de muestra que es posible obtener de dichos objetos. Con los métodos microbiológicos convencionales, solo una pequeña proporción de los microorganismos presentes en una comunidad microbiana pueden ser cultivados en condiciones de laboratorio (Giovannoni et al. 1990; Ward et al. 1990). Microorganismos de crecimiento lento, pero potencialmente involucrados en el deterioro de monumentos, pueden ser no detectados mediante técnicas microbiológicas en presencia de otros, de crecimiento rápido, que no estén directamente implicados en el proceso de biodeterioro (Bianchi et al. 1980). En las últimas décadas la aplicación de técnicas microbiológicas convencionales ha proporcionado una aceptable idea del tipo de microorganismos presentes en las superficies de monumentos deteriorados (Saiz-Jiménez, 1995, 1997; Ariño et al. 1997; Groth et al. 1999), aunque como puso de manifiesto Saiz-Jiménez (1994), la presencia de un microorganismo sobre un material deteriorado no implica necesariamente que éste haya causado el daño observado. De la Torre et al. (1991) observaron que los hongos aislados de la piedra de la catedral de Salamanca se correspondían con los habitualmente presentes en el aire. Saiz-Jiménez (1993) consideró que, además de los microorganismos saprofiticos que aparecían en los medios de cultivo ricos en fuentes de carbono (procedentes de esporas que germinaban rápidamente en esas condiciones favorables), existía otro tipo de microflora autóctona, que no crecía en los medios de cultivo y que era realmente la que funcionaba en el ecosistema. Estos microorganismos eran difíciles de aislar y si ello se conseguía, en su mayor parte, no podían ser identificados.

Una segunda estrategia a seguir en el estudio de comunidades microbianas, es el uso de técnicas moleculares. La biología molecular se introdujo a principios de los años 1990 para estudiar la diversidad microbiana en diferentes hábitats (Ward et al. 1990; Amman, 1995). Mediante la nueva tecnología del ADN y ARN es posible identificar especies microbianas existentes en distintas muestras ambientales sin

necesidad de realizar cultivos previos. Con el advenimiento de las técnicas moleculares, es posible dar adecuada respuesta a muchos de los interrogantes que sobre ecología microbiana de monumentos se planteaban en el pasado. Estas técnicas, aplicadas al estudio de las comunidades bacterianas de monumentos, han ampliado el número de géneros bacterianos identificados y catalogados como capaces de crecer sobre superficies pétreas, pinturas murales, cuevas, etc.

En un hábitat tan específico como el de los monumentos en distintas fases de deterioro, las técnicas microbiológicas tradicionales han proporcionado el aislamiento de un gran número de bacterias heterotróficas y han establecido la abundancia de especies pertenecientes a los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Streptomyces* (Tiano, 1993; Saiz-Jiménez, 1994, 1995; González et al. 1999; Groth et al. 1999; Laiz et al. 2000). Sin embargo, determinados grupos bacterianos, como los del dominio *Archaea*, u otras bacterias halófilas, no han sido aun aislados utilizando medios de cultivo en el laboratorio. Esto no refleja la realidad de los monumentos, donde en su mayoría existe una elevada concentración de sales debido a la formación de eflorescencias y, consiguientemente, pueden representar hábitats extremos que estarían ocupados por organismos extremófilos. Ya en 1935, Hof comentó que una mayoría de bacterias eran capaces de crecer en concentraciones superiores al 15% de sales y que muchos microorganismos eran fisiológicamente activos incluso a concentraciones salinas más altas. Es posible que uno de los factores que contribuyen a la falta de información respecto a determinadas comunidades microbianas que albergan los monumentos haya sido el uso de medios de cultivo empleados habitualmente en el laboratorio, y que llevan poca concentración o ninguna de sales, lo que impide el crecimiento de bacterias halófilas.

Recientemente, los estudios se han enfocado hacia la búsqueda de comunidades halófilas y *Archaea* en monumentos deteriorados (Rölleke et al. 1998; Piñar et al. 2001). Saiz-Jiménez y Laiz (2000) estudiaron la composición bacteriana de eflorescencias de monumentos empleando técnicas microbiológicas convencionales. En estos casos no pudieron aislarse bacterias capaces de crecer a concentraciones superiores al 20 % de sales, pero se demostró la abundancia de especies halotolerantes del género *Bacillus*. Rölleke et al. (1996) investigó las comunidades microbianas de pinturas murales deterioradas mediante técnicas moleculares, no encontrando especies de *Bacillus*. La abundancia de colonias de *Bacillus* cuando se usan técnicas de aislamiento y la no detección de las bandas correspondientes en el patrón de DGGE de los productos de PCR que

se obtienen de muestras de monumentos necesita una explicación y, al mismo tiempo, indicaría las limitaciones de ambos métodos.

CASOS ESTUDIADOS

Capilla del Castillo de Herberstein, Styria, Austria

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la flora presente en las pinturas murales del siglo XIV de la capilla del Castillo de Herberstein. Los frescos fueron restaurados en 1950, pero actualmente se encuentran muy deteriorados debido al crecimiento de hongos (Berner et al. 1997) y otros microorganismos (Rölleke et al. 1996, 1998; Gurtner et al. 2000). Se muestreó un área que presentaba color rosa y se llevaron a cabo estudios microbiológicos y moleculares.

Iglesia de San Martin, Greene, Niedersachsen, Alemania

La Iglesia de San Martin en Greene fue construida en 1493 sobre los cimientos de una antigua basílica. En los últimos años se han llevado a cabo estudios sobre la flora presente en las pinturas murales que datan del siglo XVI. Los frescos fueron restaurados entre los años 1978 y 1980. Actualmente se encuentran muy deteriorados mostrando un marcado crecimiento de hongos sobre su superficie.

Tumba de Servilia, Necrópolis de Carmona, Sevilla, España

Esta tumba es la mayor de las que contiene la Necrópolis romana de Carmona. La cámara funeraria está decorada con pinturas murales y, además de dos puertas de acceso, presentaba una abertura en la cúpula. Ésta se cerró hace algunas décadas, produciéndose la proliferación de organismos fototróficos, puesto que la humedad relativa es bastante alta y la temperatura se mantiene constante. En la actualidad la cúpula está de nuevo abierta. Se tomaron muestras en diferentes zonas, con objeto de cubrir el amplio rango de situaciones ecológicas localizadas.

Sistema experimental para el estudio de monumentos

Intentando avanzar en el conocimiento de la diversidad microbiana existente en monumentos y de los factores que controlan la abundancia y distribución de las poblaciones microbianas, se planteó la creación de un modelo experimental estandarizado utilizando distintos tipos de materiales comunes en monumentos. Estos materiales fueron

impregnados con medios de cultivo utilizados rutinariamente en el laboratorio para el aislamiento de microorganismos presentes en monumentos.

Se seleccionaron tres tipos de materiales: arenisca de Villamayor, caliza de Hontoria y mortero. Estos materiales se embebieron en medios de cultivo ricos, con y sin suplemento salino: Medio "Trypticase Soy Broth" (TSB) y medio TSB + 20% Na Cl + 2% MgSO₄.7H₂O (TSBS). A continuación los materiales fueron inoculados con una población microbiana artificialmente creada en el laboratorio y se incubaron a 28°C.

La población microbiana fue seleccionada en base a los datos existentes de bacterias aisladas con mayor frecuencia en frescos, pinturas murales y cuevas. Hay que tener en cuenta que la flora microbiana de un determinado nicho es el resultado de la colonización sucesiva y el establecimiento de complejas relaciones entre sus componentes, a lo largo de los años. La población artificial se creó a partir de 14 especies tipo pertenecientes a las colecciones de cultivo española, alemana y belga que aparecen en la Tabla 1.

TABLA 1
Población bacteriana del sistema experimental

Bacterias
<i>Arthrobacter histidinovorans</i> LMG 3822
<i>Arthrobacter oxydans</i> LMG 3816
<i>Bacillus megaterium</i> CECT 4313
<i>Bacillus pumilus</i> CECT 29
<i>Brevibacillus laterosporus</i> CECT 15
<i>Chromobacterium violaceum</i> CECT 494
<i>Halomonas halophila</i> LMG 6456
<i>Halococcus morrhuae</i> DSM 1307
<i>Kocuria rosea</i> CECT 52
<i>Methylobacterium extorquens</i> LMG 4250
<i>Micrococcus luteus</i> CECT 51
<i>Paenibacillus polymyxa</i> CECT 155
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CECT 378
<i>Pseudomonas stutzeri</i> CECT 930

*CECT: Colección Española de Cultivos Tipo, Burjasot, Valencia, España.

*DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zell Kulturen GmbH, Braunschweig, Alemania.

* LMG: Laboratorium voor Microbiologie Universiteit Gent, Faculteit der Wetenschappen, Gent, Bélgica.

Un 57% de las bacterias fueron Gram-positivas aisladas con elevada frecuencia en pinturas murales y un 36% Gram-negativas aisladas con cierta frecuencia en cuevas. Además, se añadió *Halococcus morrhuae* (Gram-variable), perteneciente al grupo halófilo del dominio *Archaea*, cuya presencia ha sido demostrada en pinturas murales mediante técnicas moleculares (Piñar et al. 2001).

Este modelo permite establecer, bajo condiciones controladas y a corto plazo, qué especies colonizan mejor un sustrato dado y cómo evoluciona la flora microbiana capaz de crecer en función del tipo de sustrato. Por otra parte, a largo plazo, también permitirá estudiar cómo se modifica la composición química del sustrato por la colonización microbiana y cómo estas modificaciones conducen al establecimiento de sucesivas comunidades microbianas.

TÉCNICAS UTILIZADAS

Técnicas microbiológicas

Cultivo de los microorganismos

Para el aislamiento de los microorganismos presentes en los monumentos citados en el apartado 2, se han utilizado medios de cultivo que cubren los requerimientos nutricionales de la mayor parte de estos microorganismos, particularmente los medios descritos por Laiz et al. (1999) y por Incerti et al. (1997). Esto implica la inoculación en medios de cultivo con concentraciones crecientes de sal, principalmente cloruro sódico y sulfato de magnesio; pero también con otros tipos de sales (DasSarma et al. 1995). Las placas de petri se incubaron a 28°C y a 37°C durante 4 semanas.

Identificación de los microorganismos: MIDI.

Tradicionalmente, la identificación de los microorganismos no ha sido tarea fácil. Las diferentes técnicas empleadas estaban basadas en complejas reacciones bioquímicas, difíciles de reproducir y cuya interpretación se fundamentaba en conocimientos de lenta evolución.

En los últimos años se han desarrollado los sistemas de identificación automática de microorganismos que facilitan enormemente la reproducibilidad de resultados entre los laboratorios microbiológicos de todo el mundo. Entre los sistemas de identificación más utilizados están los que asocian una galería bioquímica miniaturizada con una base de datos y los que comparan los

cromatogramas de una serie de compuestos celulares con estructura de ácido graso o similar, también con una base de datos.

Entre estos últimos, el más utilizado es el sistema de identificación automática MIDI. El sistema MIDI se basa en la cromatografía de gases de los ésteres metílicos de los ácidos grasos celulares (FAME) de cadena corta, concretamente de 9 a 20 átomos de carbono. El sistema MIDI utiliza, además de los ésteres metílicos de los ácidos grasos lineales o ramificados, los de compuestos relacionados, como aldehídos y dimetilacetales. Esto le confiere un gran poder de resolución, pues se han encontrado más de 300 compuestos de este tipo y la información que proporcionan los correspondientes picos cromatográficos es utilizada cuantitativa y cualitativamente por el sistema. MIDI ha desarrollado las bases de datos de los perfiles FAME de numerosas cepas de levaduras y bacterias anaerobias y aerobias, incluyendo micobacterias. Con estas bases de datos se han construido un total de 8 librerías. Para la caracterización de las poblaciones bacterianas de monumentos se ha utilizado la librería TSBA 4.0.

Técnicas moleculares

La estrategia utilizada para la identificación de microorganismos en monumentos sin un cultivo previo de los mismos comprende los siguientes pasos: i) extracción del material genético (ADN o ARN); ii) la amplificación de determinadas secuencias de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); iii) la separación de fragmentos de ADN dependiendo de su secuencia, con la consiguiente producción de patrones de bandas genéticas; iv) la secuenciación de los fragmentos de ADN previamente separados, de forma directa o bien a través de la creación de librerías clónicas; v) la identificación de microorganismos mediante análisis comparativos de secuencias.

La Figura 1 esquematiza los pasos anteriormente descritos para identificar microorganismos presentes en monumentos sin necesidad de ser cultivados.

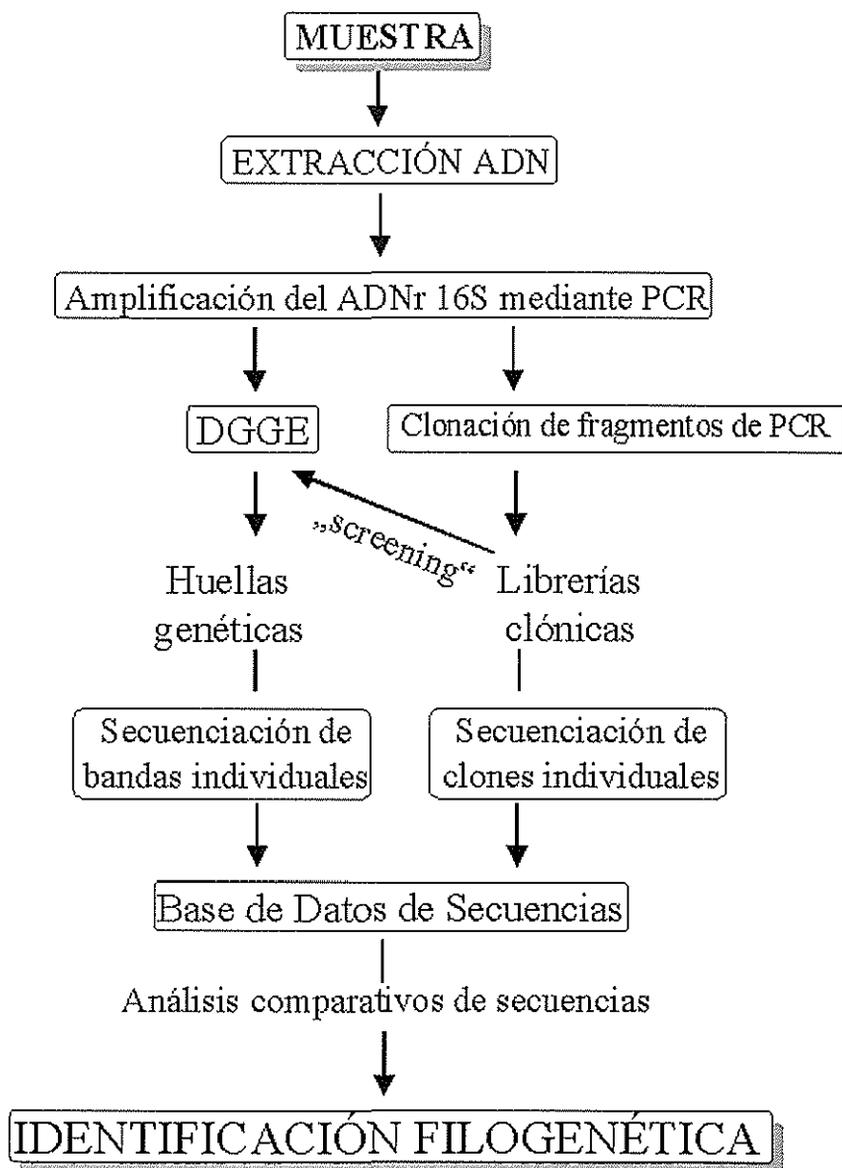


Figura 1: Diagrama de la estrategia a seguir en el estudio de comunidades microbianas de monumentos mediante técnicas moleculares.

Extracción de ADN de muestras de monumentos

La extracción de ADN es extremadamente importante, ya que va a determinar la calidad de los análisis posteriores. El método a utilizar tiene que ser efectivo para cualquier tipo de microorganismos. Aquellas

células que no puedan ser lisadas de forma eficiente, no serán detectadas mediante análisis moleculares. El método utilizado para la extracción de ADN de muestras de monumentos ha sido el descrito por Schabereiter-Gurtner et al. (2001), que consiste básicamente en una ruptura enzimática de las células en combinación con un tratamiento químico-físico.

Otro aspecto importante a tener en cuenta es la calidad del ADN extraído. Normalmente las muestras obtenidas de monumentos contienen sustancias inhibitoras de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para evitar falsos resultados negativos causados por las sustancias inhibitoras, el ADN extraído de monumentos es purificado antes de ser utilizado como ADN molde para su amplificación.

Amplificación del ADN que codifica para el ARN 16S

El ADN es amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica ofrece la ventaja de suministrar suficiente material genético para la realización de los análisis posteriores a partir de una mínima cantidad de ADN molde y en un tiempo relativamente corto.

La elección de la secuencia que se desea amplificar, y por tanto de los "primers" a utilizar, es de gran importancia. Normalmente, para la identificación de microorganismos se amplifican secuencias del ADN que codifica para el ARNr 16S debido a que están presentes en todos los organismos y contienen regiones variables y regiones altamente conservadas, permitiendo así distinguir los organismos a cualquier nivel filogenético. Además, el crecimiento día a día de las bases de datos de secuencias de ARNr, permite comparar las secuencias de organismos conocidos con las secuencias obtenidas directamente de análisis moleculares, consiguiéndose así una identificación filogenética (Maidak et al., 1999).

En este estudio, se amplificaron 200 pares de bases del ADNr 16S, correspondientes a las posiciones 341-534 en la secuencia de *E. coli*. Para ello, se utilizó un "primer" específico para eubacterias, la secuencia 341fGC, que lleva unida a su extremo 5' una cola de 40 bases de GC para estabilizar la desnaturalización de los fragmentos de ADN en los análisis de DGGE (Muyzer et al. 1993). Como "primer" reverso se utilizó la secuencia universal 518r (Neefs et al. 1990). Las condiciones de la PCR fueron las descritas por Schabereiter-Gurtner et al. (2001).

Para la amplificación de ADN de *Archaea*, se utilizó un "primer" específico para el dominio *Archaea*, la secuencia ARC344 (Raskin et al. 1994). Como "primer" reverso se utilizó la secuencia universal 518rGC

(Neefs et al. 1990). Las condiciones de la PCR fueron las descritas por Piñar et al. (2001).

Análisis mediante Electroforesis en Gel de Gradiente de Desnaturalizantes (DGGE) de los productos de PCR derivados de muestras de monumentos

Como resultado de la amplificación mediante PCR, se obtiene una mezcla de secuencias de ADNr de los distintos microorganismos presentes en la muestra analizada. Antes de proceder a la identificación de los microorganismos, las secuencias obtenidas deben ser separadas. Esta separación es posible mediante la utilización de electroforesis en gel de gradiente de desnaturalizantes (DGGE) o de gradiente de temperatura (TGGE) (Muyzer et al. 1993). Este método permite la separación de fragmentos de ADN de idéntica longitud (en pares de bases) pero distinta secuencia, debido a su distinto punto de desnaturalización en un sistema de electroforesis conteniendo un gradiente de desnaturalizantes (químico o temperatura). Como resultado de dicha electroforesis, se obtiene un patrón de bandas, en el cual cada banda representa un taxón microbiano en la muestra original. Posteriormente, las bandas individuales pueden ser cortadas del gel y secuenciadas. Esta técnica permite visualizar la complejidad de la comunidad microbiana presente en la muestra analizada, además de permitir la identificación de los miembros de dicha comunidad mediante la secuenciación de las bandas correspondientes. Finalmente, varias muestras pueden ser analizadas simultáneamente en un mismo gel, permitiendo así la comparación de las comunidades microbianas de varias muestras a la vez.

En este estudio, los análisis de DGGE se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Muyzer et al. (1993). El gradiente de desnaturalizantes utilizado en cada caso se describe en el apartado 4.

Preparación de un marcador de referencia para análisis de DGGE

Para permitir la evaluación comparativa de los análisis de DGGE realizados en distintos geles, se preparó un marcador conteniendo productos de PCR amplificados a partir del ADNr 16S de 6 bacterias seleccionadas. Para ello se utilizaron los "primers" 341fGC y 518r. A tal fin, 100 µl de los productos de PCR, obtenidos a partir de cada una de las bacterias por separado, se combinaron y precipitaron con 96% de EtOH. Posteriormente se resuspendieron en agua bidestilada y se emplearon 10 µl como marcador para los análisis de DGGE. Los ADNs de las bacterias que se muestran en el marcador corresponden, de arriba hacia abajo, a *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus megaterium*,

Micrococcus luteus, *Arthrobacter histidinolovorans*, *Kocuria rosea* y *Halococcus morrhuae* (Figuras 2 y 3).

1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6

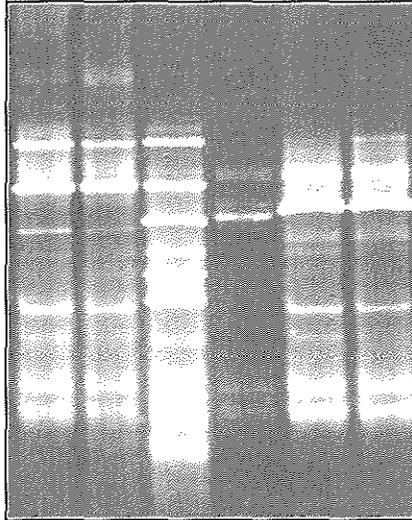


Figura 2: DGGE teñido con bromuro de etidio mostrando los patrones de bandas de fragmentos de ADN que codifican para el ARNr 16S amplificados a partir de las poblaciones bacterianas del sistema experimental a los 6 meses de incubación. Los ADNs fueron amplificados utilizando primers específicos de eubacterias. El carril 1 corresponde a la población existente en sustrato de arenisca sin suplemento salino; el carril 2 corresponde a la población existente en sustrato de mortero sin suplemento salino; el carril 3 corresponde al marcador; el carril 4 corresponde al ADN de *Halomonas halophila*; el carril 5 corresponde a la población existente en sustrato de caliza con suplemento salino; el carril 6 corresponde a la población existente en sustrato de arenisca con suplemento salino.

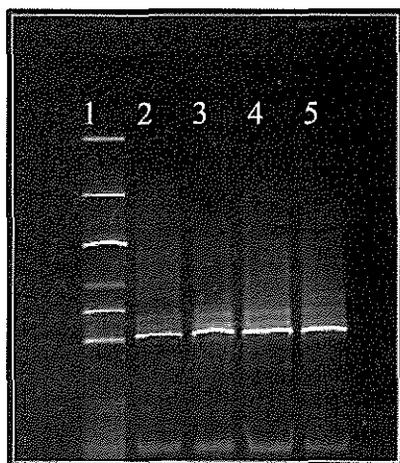


Figura 3: DGGE teñido con bromuro de etidio mostrando los patrones de bandas de fragmentos de ADN que codifican para el ARNr 16S amplificados a partir de las poblaciones bacterianas del sistema experimental a los 6 meses de incubación. Los ADNs fueron amplificados utilizando primers específicos de *Archaea*. El carril 1 corresponde al marcador; el carril 2 corresponde a la población inicial sobre sustrato de caliza en el momento de la inoculación; el carril 3 corresponde a la población crecida en sustrato de caliza con suplemento salino; el carril 4 corresponde a la población crecida en sustrato de arenisca con suplemento salino; el carril 5 corresponde al ADN de *H. morrhuae*.

Clonación de los productos de PCR y “screening” de librerías clónicas

Una vez separadas las distintas bandas de ADNr mediante DGGE, es necesaria su secuenciación para obtener la identificación filogenética de las mismas. A pesar de las muchas ventajas que el DGGE ofrece, este método también conlleva una serie de problemas técnicos cuando se trata de secuenciar bandas que han sido directamente cortadas y eluidas del gel. En patrones de bandas complejos es prácticamente imposible separar todos los fragmentos de ADN. Como consecuencia, los fragmentos no están lo suficientemente definidos como para ser cortados manualmente del gel.

Otro problema es la existencia de bandas solapadas. Secuencias distintas, pero con la misma proporción GC, pueden tener el mismo

comportamiento de desnaturalización, y por lo tanto la misma posición en DGGE. La inadecuada separación de bandas de DGGE y el fenómeno de bandas solapadas producen secuencias mixtas imposibles de ser secuenciadas directamente.

Un problema adicional es el causado por la propia longitud de los fragmentos de ADN_r analizados en DGGE. El DGGE permite la separación de fragmentos de ADN de 200-500 pb con una buena resolución. Esto supone una limitación si se desea secuenciar fragmentos de mayor longitud.

Para solucionar todas estas limitaciones, paralelamente al análisis de fragmentos de 200 pb en DGGE, es posible construir librerías clónicas. La técnica consiste en introducir o clonar fragmentos de ADN_r 16S de mayor longitud (600-1500 pb), amplificados directamente de la muestras obtenidas de monumentos, en un vector de clonación. Para ello, los productos de PCR amplificados a partir de la muestra original son clonados en un sistema de clonación en T (pGem-T Vector System, Promega), y transformados en *E.coli* XL1-Blue, lo cual permite seleccionar colonias blancas y azules (Sambrook et al. 1989).

Para seleccionar la presencia de insertos, las colonias blancas son picadas y lisadas mediante tres ciclos de congelación y descongelación. El sobrenadante es posteriormente utilizado como molde para una PCR utilizando los primers SP6 y T7 que se encuentran flanqueando la zona de clonación, según el protocolo descrito por Gurtner et al. (2001).

Para el "screening" de los distintos clones, se realiza una segunda reacción de PCR en la cual se amplifica un fragmento de 200 pares de bases que es posteriormente analizado en DGGE. La movilidad electroforética de los distintos clones es comparada entre si. Los clones conteniendo distintas secuencias tendrán distinta movilidad. La posición de estos clones es comparada asimismo con la posición de las bandas del patrón de la muestra original. Los clones cuya posición en el gel coincide con las bandas del patrón de la muestra original son seleccionados para su posterior secuenciación.

Secuenciación de los fragmentos de ADN ribosómico que codifica para el ARN 16S y análisis comparativo de las secuencias

Los clones finalmente seleccionados son amplificados utilizando los primers SP6 y T7. Estos fragmentos son purificados y secuenciados con un secuenciador "LICOR DNA sequencer Long Read 4200" (Middendorf et al. 1992). Las secuencias obtenidas son comparadas con secuencias conocidas mediante la utilización de la base de datos de nucleótidos del EMBL. El programa de búsqueda del EMBL llamado FASTA se utiliza para obtener la afiliación filogenética.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Géneros identificados en monumentos mediante técnicas microbiológicas y moleculares

Los resultados obtenidos de los estudios realizados en los tres monumentos estudiados, Carmona, Herberstein y Greene, fueron en cierta medida discordantes, ya que se identificaron poblaciones microbianas diferentes a partir de la misma muestra, dependiendo de que ésta hubiera sido tratada mediante métodos moleculares o convencionales. Los géneros identificados aparecen en la Tabla 2.

Cuando se emplearon técnicas microbiológicas, la mayoría de las especies identificadas pertenecieron a los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* y *Kocuria*. Destacaron por su abundancia las especies *Bacillus megaterium*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. lentus*, *B. circulans*, *B. halodenitrificans*, *Paenibacillus polymyxa* y *P. pabuli*.

Cuando se emplearon técnicas moleculares se identificó una diversidad de especies mucho mayor. Sólo hubo coincidencia en el caso de algunas especies de los géneros *Arthrobacter*, *Halomonas* y *Pseudomonas*, que se identificaron con ambos métodos.

Esta discordancia también ha sido descrita en otros trabajos. En cultivos de enriquecimiento para bacterias quimiorganotrofas aisladas de aguas termales, sólo hubo coincidencia en el caso de dos especies del género *Thermus*: *T. aquaticus* y *T. ruber* (Santegoeds et al. 1996). En otro trabajo, las bacterias del azufre secuenciadas fueron diferentes de las cepas que se habían sido cultivadas previamente (Casamayor et al., 2000).

Tanto los microorganismos cultivados, como aquellos de los que tan sólo ha sido identificada su secuencia, son componentes de la muestra y, con toda probabilidad, dada la diversidad microbiana, también lo son otros que no pueden ser identificados ni por uno ni por otro método.

En primer lugar, hay que tener en cuenta que la flora microbiana que se encuentra en un monumento es el resultado de la colonización sucesiva que ha tenido lugar a lo largo de los años. Los microorganismos colonizadores que constituyen la comunidad del biofilm primario del monumento, interaccionan con el sustrato y entre sí. En un primer momento se establecen relaciones, básicamente, de competencia por el sustrato. Esto es debido a que la capacidad de colonizar superficies proporciona a la bacteria ciertas ventajas: mejor acceso a los nutrientes; protección frente a toxinas como biocidas o metales pesados; protección frente a radiaciones; desarrollo y síntesis de enzimas que le capacitan para la degradación de contaminantes, etc.

TABLA 2
Géneros identificados en pinturas murales

Géneros identificados	Técnicas microbiológicas			Técnicas moleculares		
	C	H	G	C	H	G
<i>Actinobispora</i>					+	
<i>Arthrobacter</i>	+	+	+		+	+
<i>Bacillus</i>	+	+	+			
<i>Brevibacillus</i>	+	+				
<i>Brevibacterium</i>	+	+				
<i>Cellulomonas</i>		+	+			
<i>Chromohalobacter</i>					+	
<i>Curtobacterium</i>		+				
<i>Cyclobacterium</i>						+
<i>Cytophaga</i>					+	
<i>Deleya</i>					+	
<i>Erythrobacter</i>						+
<i>Frankia</i>					+	+
<i>Geodermatophilus</i>					+	+
<i>Haloarchaeon</i>				+		
<i>Halococcus</i>				+		
<i>Halomonas</i>		+			+	
<i>Kocuria</i>	+	+	+			
<i>Methylobacterium</i>		+				
<i>Micrococcus</i>	+	+	+			
<i>Micromonospora</i>		+				
<i>Natronobacterium</i>				+		
<i>Paenibacillus</i>	+	+	+			
<i>Pseudomonas</i>		+	+		+	
<i>Pseudonocardia</i>					+	
<i>Promicromonospora</i>						+
<i>Rathayibacter</i>		+				
<i>Rhodotermus</i>					+	

<i>Rubrobacter</i>					+	
<i>Saccharopolyspora</i>					+	
<i>Salmonella</i>						+
<i>Staphylococcus</i>	+	+	+			
<i>Streptomonospora</i>					+	
<i>Streptomyces</i>		+	+			
<i>Thermomicrobium</i>					+	

C: Carmona; H: Herberstein; G: Greene

Algunos estudios llevados a cabo en murales de iglesias medievales rusas han considerado a las especies del género *Arthrobacter* como las primeras colonizadoras de estas iglesias (Petushkova y Lyalikova, 1986).

Más tarde, por interacciones competitivas y sinérgicas entre algunas especies colonizadoras, así como por reclutamiento de especies nuevas y pérdida de algunas de las colonizadoras primarias, se forma la comunidad bacteriana que constituye el biofilm maduro del monumento. Habitualmente, estas interacciones favorecen el crecimiento de un determinado tipo de microorganismos, tales como los que esporulan o los que producen metabolitos secundarios.

Estos últimos microorganismos han constituido la mayoría de los identificados mediante las técnicas microbiológicas, debido a que, aprovechando las características de los medios de cultivo empleados rutinariamente en el laboratorio, desarrollan un crecimiento muy rápido. Por el contrario, aquellas especies en las que concurren alguna o las dos características: poco representadas; representadas, pero de crecimiento lento y/o difíciles de cultivar en laboratorio; pudieran ser las detectadas mediante técnicas moleculares.

Géneros identificados en el sistema experimental para el estudio de muestras de monumentos mediante técnicas moleculares y microbiológicas

Las identificaciones que se realizaron en el sistema experimental para el estudio de muestras de monumentos mediante análisis DGGE y MIDI (Tabla 3), han permitido la evaluación comparativa de la aplicación de técnicas moleculares y microbiológicas al estudio de las comunidades bacterianas de monumentos. A partir de la constatación y comparación de los datos obtenidos con ambos tipos de herramientas, se ha podido valorar convenientemente la eficacia del empleo de ellas, y si éste es mayor por separado o en conjunto.

La población microbiana del sistema experimental (Tabla 1), establecida en los tres distintos soportes, se analizó después de seis meses de crecimiento a 28°C mediante las dos aproximaciones objeto de estudio. Todos estos microorganismos son capaces de producir una serie de daños constatables en monumentos: tinciones, decoloraciones, pátinas, eflorescencias. *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Sarcina* y *Pseudomonas* son géneros aislados a partir de frescos y pinturas murales. En 1971, Lazar realizó en el laboratorio, con cultivos puros de estos microorganismos, un cultivo mezcla que fue transferido a pequeñas zonas no dañadas de las pinturas. A las 3-4 semanas de la inoculación, éstas presentaron áreas de tinción artificiales.

Es de destacar que los medios que contenían suplemento salino presentaron un mayor crecimiento de unidades formadoras de colonia que aquellos carentes de dicho suplemento, dato que concuerda con lo que se ha encontrado en los sistemas reales (Saiz-Jiménez y Laiz, 2000).

Por otra parte, dado que la flora microbiana que coloniza un monumento varía de acuerdo con su composición química, se comparó las poblaciones bacterianas que fueron identificadas en los sustratos de arenisca, caliza y mortero (Tabla 3 y Figura 2). Mediante análisis de DGGE, la población bacteriana identificada en la arenisca estaba compuesta por *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Micrococcus luteus* y *Arthrobacter* spp. Cuando el sustrato tenía suplemento salino se identificaban, además de las anteriores, las especies *Halomonas halophila* y *Halococcus morrhuae*. En los medios de cultivo de laboratorio crecieron *Bacillus megaterium*, *B. pumilus*, *Brevibacillus laterosporus* y *H. halophila*.

De igual forma, los análisis de DGGE mostraron que la población bacteriana identificada en el mortero estaba compuesta por *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *M. luteus* y *Arthrobacter* spp. En los medios de cultivo de laboratorio, crecieron *B. megaterium*, *B. pumilus*, y *A. histidinolovorans*.

En la caliza se identificaron *Arthrobacter histidinolovorans*, *H. halophila* y *H. morrhuae* utilizando análisis de DGGE. En los medios de cultivo de laboratorio crecieron *B. pumilus*, *B. laterosporus* y *H. halophila*.

Es de destacar que los sustratos de arenisca y mortero permitieron el crecimiento del mismo tipo de microorganismos, siendo la mayoría de las especies cultivables las pertenecientes al género *Bacillus*.

Detección de bacterias halófilas en el sistema experimental

Halomonas halophila y *Halococcus morrhuae* necesitan para su crecimiento un medio de cultivo enriquecido en sal. Este suplemento salino fue proporcionado, en forma de cloruro sódico y sulfato de magnesio, con el medio de cultivo TSBS del sistema experimental. La evaluación de este sistema se llevó a cabo a los 6 meses de su inoculación, realizándose por separado para eubacterias y para *Archaea*.

En primer lugar, se extrajo el ADN ribosómico de las poblaciones bacterianas existentes en los distintos sustratos al fin del periodo. El ADN resultante se amplificó con los primers 341fGC y 518r y se analizó en DGGE.

La detección de *H. halophila* se realizó mediante análisis de DGGE utilizando un gradiente de desnaturalizantes de 30-50%. La Figura 2 muestra este análisis. En los carriles 5 y 6, que corresponden respectivamente a los sustratos de caliza y arenisca, ambos con suplemento salino, se observan las poblaciones en las que se detectó la banda correspondiente a *H. halophila* después de 6 meses de incubación. Asimismo, empleando medios de cultivo específicos para *Halomonas* spp. se consiguió cultivar *H. halophila* en el laboratorio a partir de dichos sustratos.

Para la detección de *H. morrhuae*, perteneciente al dominio *Archaea*, se llevó a cabo asimismo la evaluación del sistema experimental. Los ADNs ribosómicos extraídos de las poblaciones bacterianas se amplificaron con primers específicos de *Archaea* y se analizaron en DGGE utilizando un gradiente de desnaturalizantes de 30-50%. La Figura 3 muestra este análisis. La detección de la banda correspondiente a *H. morrhuae* en DGGE mostró una correspondencia perfecta con la detectada en las poblaciones existentes en soportes con suplemento salino al fin de la incubación. Sin embargo, no se logró cultivar *H. morrhuae* a pesar del empleo de medios de cultivo específicos para *Archaea*.

Características diferenciales y complementariedad de las técnicas

Se ha visto cómo la aplicación de métodos moleculares, especialmente la amplificación del ADN que codifica para el ARN ribosómico 16S, permite enfocar el estudio de la comunidad bacteriana presente en monumentos desde un punto de vista diferente del de las técnicas microbiológicas tradicionales.

La primera característica diferencial de las dos técnicas (Tabla 4) es la cantidad de muestra requerida, ya que ésta es mucho menor en el caso de las técnicas moleculares. La segunda característica diferencial se refiere a la identificación de los microorganismos: mientras que las

técnicas moleculares identifican todos los microorganismos presentes en la muestra, las microbiológicas sólo permiten la identificación de unos pocos microorganismos fácilmente cultivables. La tercera característica diferencial es que las técnicas microbiológicas distinguen entre microorganismos vivos y muertos; las moleculares no.

TABLA 4

Características diferenciales de las técnicas moleculares y microbiológicas

	TÉCNICAS MOLECULARES	TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS
CANTIDAD DE MUESTRA	Pequeña	Moderada
IDENTIFICACIÓN	Microorganismos cultivables y no cultivables	Microorganismos cultivables
DISCRIMINACIÓN	No	Microorganismos vivos - muertos

Por lo tanto, más que al abandono de las técnicas tradicionales, se debe tender a utilizar e incrementar las potencialidades de las dos técnicas. Así, las técnicas moleculares serían muy útiles para la ampliación de las bases de datos de los sistemas de identificación microbiana. De este modo, estas bases de datos se irían adaptando a cepas ambientales como las que se encuentran en las comunidades bacterianas de monumentos.

Por su parte, las técnicas microbiológicas, capacitarían para el diseño específico de medios de cultivo para llevar a cabo estudios fisiológicos con los microorganismos que se hayan secuenciado; ya que es necesario el cultivo de los microorganismos para conocer su metabolismo y poder así evaluar la capacidad de acción de los biocidas.

CONCLUSIONES

Las conclusiones extraídas a partir del sistema experimental diseñado en este estudio son:

1. La amplificación de los ADN ribosómicos 16S de los microorganismos presentes en monumentos no es total. Se ha descrito lisis ineficaz de las bacterias Gram-positivas que esporulan, entre las que se encuentran las pertenecientes al género *Bacillus*. Esto explicaría por qué no es siempre posible detectar mediante análisis de DGGE especies pertenecientes al género *Bacillus*, aún cuando es posible su aislamiento a partir de la misma muestra utilizando medios de cultivo convencionales de laboratorio.
2. El crecimiento de las bacterias en los distintos materiales fue diferente. Existen bacterias que no son demasiado abundantes en la población y por lo tanto no se amplificaría su ADN, sin embargo, aprovechando las características de los medios de cultivo empleados han sido capaces de crecer. Por el contrario, otras que fueron previamente detectadas en las muestras mediante análisis de DGGE, como es el caso de *H. morrhuae*, no pudieron ser aisladas, demostrando una vez más la dificultad existente para cultivar *Archaea*.
3. Los sustratos de arenisca y mortero permitieron el crecimiento del mismo tipo de bacterias, dando lugar al establecimiento de poblaciones microbianas prácticamente idénticas.
4. Los métodos moleculares han permitido la detección de microorganismos de crecimiento lento y/o fastidioso como el de *Archaea*.
5. La utilización conjunta de ambas metodologías, permitió obtener una imagen más exacta de las comunidades microbianas; ya que, si las técnicas moleculares dieron lugar a la identificación de las bacterias de crecimiento lento, las microbiológicas permitieron distinguir las especies del género *Bacillus*. Los resultados que se obtienen no son contradictorios ni excluyentes, sino complementarios.
6. Por último, aunque existe un gran número de publicaciones acerca del daño causado en monumentos, de los que se han aislado numerosos microorganismos, es necesario continuar este tipo de estudios para establecer mecanismos de acción general de éstos y su papel en el biodeterioro. También es necesario distinguir entre los realmente responsables del biodeterioro y aquellos que no juegan un papel tan directo en el proceso. En este sentido han de encaminarse los estudios futuros.

Agradecimientos: Esta investigación forma parte de las actividades desarrolladas dentro del Proyecto Europeo "Novel molecular tools for the analysis of unknown microbial communities of mural paintings and their implementation into the conservation/restoration practice" (ENV4-CT98-0705). El trabajo de G. Piñar ha sido financiado por una beca de la Comunidad Europea "Marie Curie" (BIO4-CT98-5057).

BIBLIOGRAFÍA

- Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169.
- Ariño, X., Hernandez-Marine, M., Saiz-Jiménez, C. (1997) Colonization of Roman tombs by calcifying cyanobacteria. *Phycologia* **36**, 366-373.
- Berner, M., Warnner, G., Lubitz, W. (1997) A comparative study of the fungal flora present in medieval wall paintings in the chapel of the Castle Herberstein and in the parish church of St Georgen in Styria, Austria. *Int. Biodeter. Biodegr.* **40**, 53-61.
- Bianchi, A., Favali, M.A., Barbieri, N., Bassi, M. (1980) The use of fungicides on mold covered frescoes in San Eusebio in Pavia. *Int. Biodeter. Bull.* **16**, 45-51.
- Bock, E., Sand, W. (1993) The microbiology of masonry biodeterioration. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 503-514.
- Casamayor, E.O., Schäfer, H., Bañeras, L., Pedròs-Aliò, C., Muyzer, G. (2000) Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighbouring sulphurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 499-508.
- DasSarma, S., Fleischmann, E.M., Rodríguez-Valera, F. (1995) Appendix 2. Media for halophiles. En: Robb, F.T. (ed.), *Archaea: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 225-230.
- De la Torre, M.A., Gomez-Alarcon, G., Melgarejo, P., Saiz-Jiménez, C. (1991) Fungi in weathered sandstone from Salamanca cathedral, Spain. *Sci. Total Environ.* **107**, 159-168.
- Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer C.L., Field, K.G. (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**, 60-63.
- González, I., Laiz, L., Hermosin, B., Caballero, B., Incerti, C., Saiz-Jiménez, C. (1999) Bacteria isolated from rock art paintings: the case of Atlanterra shelter (South Spain) *J. Microbiol. Meth.* **36**, 123-127.
- Groth, I., Vettermann, R., Schuetza, B., Schumann, P., Saiz-Jiménez, C. (1999) Actinomycetes in karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo) *J. Microbiol. Meth.* **36**, 115-122.
- Gurtner, C., Heyrman, J., Piñar, G., Lubitz, W., Swings J., Rölleke, S. (2000) Comparative analyses of the bacterial diversity on two different biodeteriorated wall paintings by DGGE and 16S rDNA sequence analysis. *Int. Biodeter. Biodegr.* **46**, 229-239.

- Hof, T. (1935) Investigations concerning bacterial life in strong brines. *Rev. Trav. Bot. Neerland* **32**, 92-171.
- Incerti, C., Blanco-Varela, M.T., Puertas, F., Saiz-Jiménez, C. (1997) Halotolerant and halophilic bacteria associated to efflorescences in Jerez cathedral. En: Zezza, F. (ed.), Origin, Mechanisms and Effects of Salts on Degradation of Monuments in Marine and Continental Environments. Protection and Conservation of the European Cultural Heritage Research Report No. 4, 225-232.
- Krumbein, W.E. (1988) Microbial interactions with mineral materials. En: Houghton, R., Smith, R., Eggins, H. (eds.), Biodeterioration 7. Elsevier, New York, p. 78.
- Laiz, L., Groth, I., González, I., Saiz-Jiménez, C. (1999) Microbiological study of the dripping waters in Altamira Cave (Santillana del Mar, Spain) *J. Microbiol. Meth.* **36**, 129-138.
- Laiz, L., Hermosin, H., Caballero, B., Saiz-Jiménez, C. (2000) Bacteria isolated from the rocks supporting prehistoric paintings in two shelters from Sierra de Cazorla, Jaen, Spain. *Aerobiologia* **16**, 119-124.
- Lazar, I. (1971) Investigations on the presence and role of bacteria in deteriorated zones of Cozia Monastery painting. *Rev. Roum. Biol. Ser. Bot.* **16**, 437-444.
- Maidak, B.L., Cole, J.R., Parker, C.T., Garrity, G.M.Jr., Larsen, N., Li, B., Lilburn, T.G., McCaughey, M.J., Olsen, G.J., Overbeek, R., Pramanik, S., Schmidt, T.M., Tiedje, J.M., Woese, C.R. (1999) A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* **27**, 171-173.
- Middendorf, L.R., Bruce, J.C., Bruce, R.C., Eckles, R.D., Grone, D.L., Roemer, S.C., Sloniker, G.D., Steffens, D.L., Sutter, S.L., Brumbaugh, J.A., Patonay, G. (1992) Continuous, on-line DNA sequencing using a versatile infrared laser scanner/electrophoresis apparatus. *Electrophoresis* **13**, 487-494.
- Muyzer, G., de Waal E. C., Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 695-700.
- Neefs, J.M., Van de Peer, Y., Hendriks, L., De Wachter, R. (1990) Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **18**, 2237-2317.
- Petushkova, J.P., Lyalikova, N.N. (1986) Microbiological degradation of lead-containing pigments in mural paintings. *Stud. Conserv.* **31**, 65-69.
- Piñar, G., Gurtner, C., Lubitz W., Rölleke, S. (2001) Identification of *Archaea* in objects of art by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis and shotgun cloning. *Methods Enzymol.* **336**, 356-366.
- Raskin, L., Stromley, J.M., Rittmann, B.E., Stahl, D.A. (1994) Group-specific 16S rRNA hybridisation probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1232-1240.

- Rölleke, S., Muyzer, G., Wawer, C., Wanner G., Lubitz, W. (1996) Identification of bacteria in a biodegraded wall painting by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2059-2065.
- Rölleke, S., Witte, A., Wanner, G., Lubitz, W. (1998) Medieval wall painting-a habitat for archaea: identification of archaea by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified gene fragments coding 16S rRNA in a medieval wall painting. *Biodet. Biodegr.* **41**, 85-92.
- Schabereiter-Gurtner, C., Piñar, G., Lubitz, W., Rölleke, S. (2001) An advanced molecular strategy to identify bacterial communities on art objects. *J. Microbiol. Meth.* **45**, 77-87.
- Saiz-Jiménez, C. (1993). Deposition of airborne organic pollutants on historic building. *Atmos. Environ.* **27B**, 77-85.
- Saiz-Jiménez, C. (1994) Biodeterioration of stone in historic building and monuments, En: Llewellyn, G.C., Dashek, W.W., O'Read, C.E. (eds.), *Biodeterioration Research 4: Mycotoxins, Wood Decay, Plants Stress, Biorrosion, and General Biodeterioration*. Plenum, New York, 587-603.
- Saiz-Jiménez, C. (1995) Deposition of anthropogenic compounds on monuments and their effect on airborne microorganisms. *Aerobiologia* **11**, 161-175.
- Saiz-Jiménez, C. (1997) Biodeterioration vs biodegradation: the role of microorganisms in the removal of pollutants deposited on to historic buildings. *Int. Biodeter. Biodegr.* **40**, 225-232.
- Saiz-Jiménez, C., Laiz, L. (2000) Occurrence of halotolerant/halophilic bacterial communities in deteriorated monuments. *Int. Biodeter. Biodegr.* **46**, 319-326.
- Santegoeds, C.M., Nold, S.C., Ward, D.M. (1996) Denaturing gradient gel electrophoresis used to monitor the enrichment culture of aerobic chemoorganotrophic bacteria from a hot spring cyanobacterial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3922-3928.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Tiano, P. (1993) Biodeterioration of stone monuments: a critical review. En: Garg, K.L., Garg, N., Mukerji, K.G. (eds.), *Recent Advances in Biodeterioration and Biodegradation*, Vol. 1. Naya Prokash, Calcutta, 173-203.
- Ward, D.M., Weller, R., Bateson, M.M. (1990) 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* **345**, 63-65