

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**



**Casa abierta al tiempo**

---

---

**“COMUNIDADES MICROBIANAS  
EN LA SUPERFICIE DE MONUMENTOS DE CANTERA  
ROSA Y SU PAPEL EN EL DETERIORO PÉTREO.”**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Y DE LA SALUD**

**P R E S E N T A**

**M. en B. ANGÉLICA LÓPEZ MORENO**

**Comité tutorial:**

**Tutor: Dra. Sylvie Le Borgne**

**Asesor: Dr. Hugo Ramírez Saad**

**Asesor: Dr. Octavio Loera Corral**

**Marzo de 2014.**

**“El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93”.**

AGRADECIMIENTOS

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

M. en B. Angélica López Moreno

El día 10 de marzo de 2014

Jurado:

Tutora: Dra. Sylvie Le Borgne

*Le Borgne*

Asesor: Dr. Hugo Ramírez Saad

*H. Saad*

Asesor: Dr. Octavio Loera Corral

*O. Loera*

Sinodal: Dra. Elia Mercedes Alonso Guzmán

*E. Alonso Guzmán*

Sinodal: Dr. Hugo Beraldi Campesi

*H. Beraldi Campesi*

## AGRADECIMIENTOS

---

### **Mis más sinceros agradecimientos:**

A mi compañero de vida, Jesús Reyes por estar siempre a mi lado y ayudarme a creer en mi y lograr este sueño, por su apoyo y comprensión a lo largo de estos años. A mis hijas Emma y Erika por ser parte de este proyecto de vida, por soportar mi ausencia.

A mi madre por haberme enseñado a no rendirme nunca.

A mi directora de tesis; Dra. Sylvie Le Borgne, por darme la oportunidad de ser pionera en este tema de investigación, por tu tiempo y ayuda durante el doctorado.

A mis asesores; Dr. Octavio Loera Corral y Dr. Hugo Ramírez Saad, por su tiempo, por la espera, por su ayuda y comentarios.

Al Dr. Hugo Beraldi por su tiempo, interés y dedicación a la revisión de la tesis.

A la Dra. Elia Alonso por las facilidades otorgadas para los muestreos en la Catedral de Morelia, por sus comentarios y entusiasmo a lo largo de éste trabajo.

A la Dra. Maribel Hernández por su ayuda con el manuscrito y sus excelentes consejos, gracias por ser como eres.

Al Dr. Hiram Beltrán por su apoyo en el análisis de espectroscopía de infrarrojo y por sus buenos consejos.

Al M. en C. Manuel Aguilar, por su apoyo en el análisis de muestras por DRX, gracias por su tiempo y compromiso.

Al Dr. David Sepúlveda por su apoyo en el análisis de MEB y DEX de las muestras para esta tesis, gracias por su tiempo y excelentes imágenes.

A mis amigos y compañeros; Adriana Espino, Ana Bravo, Brenda Rocha, Carlina Peña, cHua Espinosa, Fanny Trujillo, Félix Aguirre, Leticia Ramírez, Luis F. Chávez, Ramón González, Roxana López, Sandra Pérez y Sergio Hernández gracias por sus comentarios, críticas, consuelo, gracias por estar cuando lo necesite, por las horas de trabajo compartidas y constante apoyo profesional.

A Rebeca Vásquez y Jorge Moreno, por ayudarme experimentalmente durante su servicio social.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado durante mis estudios de doctorado.

La presencia de biopelículas en la superficie de construcciones expuestas al medio ambiente es un indicador de biodeterioro en monumentos. Las biopelículas causan daño estético por cambios de color y formación de pátinas. Las biopelículas se conforman de comunidades microbianas complejas que usualmente incluyen microorganismos heterótrofos y autótrofos capaces de llevar a cabo asociaciones sinérgicas que pueden provocar daño químico, mecánico y estético. El objetivo de ésta tesis fue caracterizar la diversidad de las comunidades microbianas detectadas en biopelículas de la Catedral de Morelia, Michoacán, construida a base de cantera rosa (ignimbrita), principalmente mediante estudios moleculares (secuencias genómicas) y microbiológicos (cultivos). Los resultados muestran que la diversidad microbiana en las biopelículas está compuesta principalmente por bacterias (*Bacillus*, *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Janibacter melonis*, y *Pseudomonas*), hongos productores de hifas (*Ascomycetes*, *Clavicipitaceae*, *Fusarium* y *Penicillium*), levaduras (*Cryptococcus vishniacii*), y también algas verdes (*Asteracys quadricellulare*). Mediante técnicas microbiológicas aplicadas en el laboratorio, se determinaron capacidades metabólicas en los aislados, como son la precipitación de calcio, la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y la producción de sustancias ácidas. Los resultados obtenidos permitieron proponer posibles mecanismos de biodeterioro en ignimbritas, incluyendo la biosolubilización y el secuestro de iones para ser usados en el metabolismo microbiano, debido a la producción de sustancias ácidas; así como el favorecimiento del anclaje microbiano y la retención de productos metabólicos debido a la presencia de EPS. Las técnicas moleculares mostraron que la composición de las comunidades en las biopelículas se conserva entre los diferentes sitios muestreados. Los análisis de microscopía y materiales permitieron observar la interfase entre la biopelícula y la ignimbrita, para evaluar el daño provocado por la presencia de microorganismos. Una fase mineral típica de biodeterioro como la calcita, fue detectada en varias de las biopelículas, sugiriendo que existen capacidades metabólicas involucradas directamente con la precipitación de iones de  $\text{Ca}^{+2}$  permitiendo la producción de tal estructura cristalina. Observamos que el principal daño generado a la composición mineralógica de la ignimbrita expuesta al medio ambiente y a biopelículas, además de la presencia de calcita, fue la transformación de cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ) hexagonal a cuarzo tetragonal y ortorrómbico. La evaluación de propiedades intrínsecas de la ignimbrita permitió comprobar que la ignimbrita es una roca biorreceptiva, ligeramente ácida y de mediana porosidad y demostramos que la presencia de iones de calcio favorece la colonización de la ignimbrita por bacterias.

## ABSTRACT

---

The presence of biofilms on the surface of constructions exposed to the environment is an indicator of monuments biodeterioration. Biofilms cause aesthetic damage due to changes in color and the formation of patina. Biofilms are made up of complex microbial communities that usually include heterotrophic and autotrophic microorganisms forming synergistic associations that can lead to chemical, mechanical and aesthetic damage. The aim of this thesis was to characterize the diversity of microbial communities in biofilms formed on the Cathedral of Morelia, Michoacán which is built in pink quarry (ignimbrite), using molecular (genomic sequences) and microbiological (cultures) techniques. The results show that the microbial diversity mainly comprised bacteria (*Bacillus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Janibacter melonis*, and *Pseudomonas*), hyphae-producing fungi (*Clavicipitaceae*, *Ascomycetes*, *Fusarium* and *Penicillium*), yeasts (*Cryptococcus vishniacii*), as well as green algae (*Asteracys quadricellulare*). Metabolic capabilities of the isolates were determined using microbiological laboratory techniques to determine calcium precipitation capacity, extracellular polymeric substances (EPS) and acidic substances production. The obtained results allowed proposing possible mechanisms for ignimbrites biodeterioration, including the biosolubilization and sequestration of ions to be used for microbial metabolism, due to the production of acidic substances; as well as by facilitating microbial attachment and the retention of metabolic products due to the presence of EPS. Molecular techniques showed that biofilm communities are conserved between the different sampled sites. Microscopy and materials analysis allowed us to observe the interface between the biofilms and ignimbrites to evaluate the damage caused by the presence of microorganisms. Calcite, a mineral phase typical of biodeterioration, was detected in several of the sampled biofilms, suggesting that there exist metabolic capabilities involved with the precipitation of  $\text{Ca}^{+2}$  ions to produce such crystalline structures. The main damage generated to the mineralogical composition of ignimbrites exposed to the environment and to the presence of biofilm, in addition to the presence of calcite, was the transformation of quartz ( $\text{SiO}_2$ ) from hexagonal to tetragonal and orthorhombic forms. Evaluation of the intrinsic properties of the ignimbrites showed that ignimbrites are biorreceptive, moderately porous and slightly acidic stones. Additionally, the presence of calcium ions favored the colonization of ignimbrites by bacteria.

---

<b>Número</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
1	Introducción.	13
1.1	Las ignimbritas o cantera rosa.	13
1.2	Biodeterioro.	14
2	Antecedentes.	17
2.1	Microorganismos en procesos de biodeterioro.	17
2.2	Mecanismos de biodeterioro.	22
2.3	Técnicas de investigación en biodeterioro.	29
2.3.1	Microbiología Clásica y Molecular.	29
2.3.2	Análisis de materiales y superficies.	32
2.4	Experimentos de biodeterioro bajo condiciones controladas.	35
3	Planteamiento de la pregunta de investigación.	37
4	Hipótesis.	38
5	Objetivos.	38
5.1	Objetivo general.	38
5.2	Objetivos específicos.	38
6	Estrategia experimental.	39
7	Materiales y métodos.	40
7.1	Muestras.	40
7.2	Caracterización de materiales y superficies.	43
7.2.1	Resistencia a la ruptura.	43
7.2.2	Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Dispersión Energética de Rayos X (DEX).	43
7.2.3	Difracción de Rayos X (DRX).	44
7.2.4	Espectroscopía de infrarrojo (IR).	45
7.3	Estudios de biorreceptividad.	45
7.4	Microbiología.	47
7.4.1	Extracción de pigmentos.	47
7.4.2	Microscopía óptica de muestras.	49
7.4.3	Aislamiento y caracterización preliminar de microorganismos.	49
7.5	Análisis molecular de muestras.	52
7.5.1	Extracción de DNA metagenómico.	52
7.5.2	Amplificación por PCR de genes ribosomales de metagenomas.	52
7.5.3	Electroforesis de DNA en geles de agarosa.	53
7.5.4	Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE).	54
7.5.5	Extracción de DNA de aislados y amplificación de los genes 16S/18S rRNA.	54
7.5.6	Clonación de genes ribosomales e identificación de aislados.	55
7.6	Caracterización de microorganismos aislados.	56
7.6.1	Producción de exopolímeros.	56

<b>7.6.2</b>	Precipitación de calcio.	<b>57</b>
<b>7.6.3</b>	Efecto de la urea y del calcio en la precipitación de CaCO <sub>3</sub> .	<b>58</b>
<b>7.6.4</b>	Producción de ácidos o cambio de pH.	<b>59</b>
<b>7.6.5</b>	Actividad nitrogenasa.	<b>60</b>
<b>7.7</b>	Experimentos en ambiente controlado.	<b>61</b>
<b>7.8</b>	Actividad ureasa.	<b>62</b>
<b>7.9</b>	Análisis estadístico.	<b>63</b>
<b>8</b>	Resultados y discusiones.	<b>64</b>
<b>8.1</b>	Muestreo.	<b>64</b>
<b>8.2</b>	Caracterización de materiales y superficies.	<b>70</b>
<b>8.2.1</b>	Resistencia a la ruptura.	<b>70</b>
<b>8.3</b>	Análisis de superficies.	<b>74</b>
<b>8.3.1</b>	Microscopía electrónica de barrido (MEB).	<b>74</b>
<b>8.3.2</b>	Dispersión energética de rayos X (DEX).	<b>76</b>
<b>8.3.3</b>	Difracción de rayos X (DRX).	<b>79</b>
<b>8.3.4</b>	Espectroscopia de infrarrojo (IR).	<b>84</b>
<b>8.4</b>	Estudios de biorreceptividad de la ignimbrita.	<b>86</b>
<b>8.5</b>	Microscopía óptica.	<b>87</b>
<b>8.6</b>	Presencia de pigmentos fotosintéticos.	<b>89</b>
<b>8.7</b>	Análisis molecular.	<b>91</b>
<b>8.7.1</b>	Extracción de DNA metagenómico.	<b>91</b>
<b>8.7.2</b>	Amplificación de dominios específicos por PCR.	<b>92</b>
<b>8.7.3</b>	Electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE).	<b>99</b>
<b>8.8</b>	Aislamiento e identificación de microorganismos.	<b>106</b>
<b>8.8.1</b>	Aislamientos microbianos.	<b>106</b>
<b>8.8.2</b>	Identificación molecular.	<b>109</b>
<b>8.8.3</b>	Caracterización de aislados.	<b>112</b>
<b>8.9</b>	Precipitación de CaCO <sub>3</sub> e influencia del calcio en la producción de sustancias poliméricas extracelulares y formación de biopelículas.	<b>118</b>
<b>8.9.1</b>	Producción y análisis de cristales de CaCO <sub>3</sub> .	<b>118</b>
<b>8.9.2</b>	Efecto de la urea y el calcio en la actividad ureasa y la precipitación de cristales de CaCO <sub>3</sub> .	<b>121</b>
<b>8.9.3</b>	Efecto del calcio en la producción de EPS y colonización de bloques de ignimbrita.	<b>123</b>
<b>9</b>	Resumen de resultados.	<b>128</b>
<b>10</b>	Conclusiones y perspectivas.	<b>132</b>
<b>11</b>	Referencias bibliográficas.	<b>135</b>
<b>12</b>	Anexos.	<b>147</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Fórmulas para la evaluación de propiedades intrínsecas de bloques de ignimbrita.	<b>47</b>
<b>2</b>	Primers empleados para la amplificación por PCR en el análisis por DGGE de las biopelículas analizadas.	<b>53</b>
<b>3</b>	Muestras de Catedral, obtenidas en los 4 muestreos realizados.	<b>68</b>
<b>4</b>	Composición elemental de cristales en 3 muestras de biopelículas del segundo muestreo.	<b>78</b>
<b>5</b>	Composición mineral de biopelículas y controles de ignimbrita sana por DRX.	<b>81</b>
<b>6</b>	Evaluación de características físicas y químicas de bloques de ignimbrita.	<b>86</b>
<b>7</b>	Concentraciones específicas de clorofila a en biopelículas.	<b>90</b>
<b>8</b>	Resumen de aislados obtenidos de cada sitios en los muestreos realizados.	<b>107</b>
<b>9</b>	Identificación molecular de bacterias aisladas del segundo muestreo.	<b>109</b>
<b>10</b>	Identificación molecular de hongos, algas y levadura del segundo muestreo.	<b>110</b>
<b>11</b>	Pruebas deteriogénicas de los aislados de Catedral segundo muestreo.	<b>113</b>
<b>12</b>	Actividad ureasa de 3 aislados, bajo cuatro condiciones de crecimiento distintas.	<b>122</b>
<b>13</b>	Precipitación de CaCO <sub>3</sub> por 3 aislados crecidos bajo cuatro condiciones de crecimiento distintas.	<b>123</b>

## ÍNDICE DE FIGURA

<b>Figura</b>	<b>Leyenda</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Formación de una biopelícula.	<b>18</b>
<b>2</b>	Ciclo del nitrógeno.	<b>21</b>
<b>3</b>	Estrategia para la identificación de microorganismos por técnicas moleculares en muestras ambientales.	<b>30</b>
<b>4</b>	Estrategia experimental.	<b>39</b>
<b>5</b>	Ubicación de los sitios muestreados en la Catedral de Morelia en el centro histórico de ésta ciudad.	<b>41</b>
<b>6</b>	Condiciones climatológicas mensuales en Morelia.	<b>65</b>
<b>7</b>	Evidencia de la presencia de manchas negras y de color en caras laterales de la Catedral en zonas de acumulación de agua.	<b>67</b>
<b>8</b>	Sitios muestreados en la Catedral de Morelia durante el segundo muestreo.	<b>69</b>
<b>9</b>	Evaluación de la resistencia a la ruptura en superficies de la Catedral con y sin biopelícula.	<b>71</b>
<b>10</b>	Micrografías de MEB en muestras de Catedral, segundo muestreo.	<b>75</b>
<b>11</b>	Micrografía de tipos de superficies en la ignimbrita.	<b>77</b>
<b>12</b>	Difractograma de ignimbrita sana.	<b>82</b>
<b>13</b>	Difractograma de calcita.	<b>83</b>
<b>14</b>	Estructuras microbianas observadas en el microscopio óptico, preparaciones en fresco.	<b>87</b>
<b>15</b>	Tinción Gram en muestras de biopelículas.	<b>88</b>
<b>16</b>	Extracción de pigmentos de microorganismos fotosintéticos.	<b>90</b>
<b>17</b>	Análisis por electroforesis en gel de agarosa para amplicones de 520 y 180 pb en bacterias.	<b>93</b>
<b>18</b>	Análisis por electroforesis en gel de agarosa para amplicones de cianobacterias.	<b>94</b>
<b>19</b>	Análisis por electroforesis en gel de agarosa para amplicones de <i>Eukaryas</i> .	<b>95</b>
<b>20</b>	Análisis por electroforesis en gel de agarosa para amplicones de hongos.	<b>96</b>
<b>21</b>	Análisis por electroforesis en gel de agarosa para amplicones de hongos a diferentes temperaturas y concentraciones de MgCl <sub>2</sub> .	<b>97</b>
<b>22</b>	Análisis por electroforesis en gel de agarosa para amplicones de hongos, estandarizados.	<b>98</b>
<b>23</b>	DGGE y dendrograma para el dominio <i>Bacteria</i> de muestras del segundo muestreo.	<b>99</b>
<b>24</b>	DGGE y dendrograma para el grupo cianobacteria de muestras del segundo muestreo.	<b>102</b>
<b>25</b>	DGGE y dendrograma para el dominio <i>Eukarya</i> de muestras del	<b>104</b>

	segundo muestreo.	
<b>26</b>	Principales morfotipos del segundo muestreo.	<b>108</b>
<b>27</b>	Aislados capaces de precipitar calcio como CaCO <sub>3</sub> .	<b>117</b>
<b>28</b>	Imágenes de MEB y DRX de cristales de CaCO <sub>3</sub> precipitados por bacterias.	<b>119</b>
<b>29</b>	Ensayo de RC de bacterias carbonatogénicas.	<b>124</b>
<b>30</b>	Imágenes de MEB de ignimbrita colonizada y no colonizada.	<b>126</b>

---

<b>ARDRA</b>	Análisis de restricción del DNA ribosomal amplificado.
<b>Asociación antagónica</b>	Competencia microbiana.
<b>Asociación sinérgica</b>	Cooperación microbiana.
<b>Autótrofos</b>	Organismo capaz de biosintetizar todo el material celular a partir de CO <sub>2</sub> como única fuente de carbono.
<b>BG11</b>	Medio mineral Blue Green.
<b>Biodeterioro</b>	Cambio no deseable en las propiedades del material causado por la actividad de diversos organismos vivos, generalmente microscópicos.
<b>Biopelícula</b>	Comunidades de microorganismos anclados a una superficie.
<b>Biorreceptividad</b>	Las propiedades de los materiales de construcción que contribuyen a la estabilización o anclaje de una comunidad microbiana.
<b>Cianobacteria</b>	Procarionta fotosintética oxigénica contiene clorofila a y ficobilinas.
<b>Clones recombinantes</b>	Organismos con DNA modificado por la incorporación de un vector de interés para su replicación.
<b>CSLM</b>	Microscopía de barrido láser confocal.
<b>Dendrograma</b>	Representación gráfica de datos en forma de árbol.
<b>DEX</b>	Dispersión energética de rayos X.
<b>DGGE</b>	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante.
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico, material hereditario de células.
<b>DRX</b>	Difracción de rayos X.
<b>EPS</b>	Sustancias poliméricas extracelulares.
<b>Fotótrofos</b>	Organismos que emplean la luz como fuente de energía.
<b>Heterótrofos</b>	Organismos capaces de alimentarse de sustancias orgánicas sintetizadas por otros organismos.
<b>IR</b>	Espectroscopía de infrarrojo.
<b>Liquen</b>	Asociación de un hongo y un alga (o cianobacteria) que viven en asociación simbiótica.
<b>Morteros</b>	Mezcla de arena, conglomerante y agua, empleado en la industria de la construcción.
<b>MEB</b>	Microscopía electrónica de barrido.
<b>Nitrificantes</b>	Microorganismos que oxidan al amonio (NH <sub>3</sub> ) hasta nitrito (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ).
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa.
<b>PGY</b>	Medio de cultivo BG11 enriquecido con peptona, glucosa y extracto de levadura.
<b>PGY-Ca<sup>2+</sup></b>	Medio de cultivo enriquecido, con 7.5 gL <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O.
<b>PGY-urea</b>	Medio de cultivo enriquecido, con 2% urea.
<b>PGY-urea-Ca<sup>2+</sup></b>	Medio de cultivo enriquecido, con 7.5 gL <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O y 2% de urea.
<b>RC</b>	Rojo congo.
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico, implicado en la síntesis de proteínas como RNAm, RNAt, RNAr.
<b>Sulfato reductoras</b>	Bacterias que reducen el sulfato (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ) a sulfuro de hidrógeno (H <sub>2</sub> S).
<b>Sulfo oxidantes</b>	Bacterias que oxidan el sulfuro de hidrógeno (H <sub>2</sub> S) a sulfato (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ).

## **1.- INTRODUCCIÓN**

En México se han llevado a cabo diversos estudios de biodeterioro en patrimonio edificado, sobre todo en aquellos sitios arqueológicos constituidos con roca caliza, principalmente en el sureste de México. Para nuestro trabajo el material de construcción de interés fue la ignimbrita conocida como cantera rosa, la cual ha sido ampliamente usada para la construcción de monumentos en centros o plazas de numerosas ciudades y pueblos en diversos estados del país. El presente trabajo tuvo el objetivo inicial de estudiar el biodeterioro de ignimbritas, evaluar las capacidades de los microorganismos para colonizar y deteriorar la roca y proponer posibles mecanismos de biodeterioro.

### **1.1.- Las ignimbritas o cantera rosa**

La ignimbrita es una roca ígnea extrusiva, formada por eyección en eventos volcánicos. Las ignimbritas se forman a muy altas temperaturas, mientras que el soldamiento, recristalización y alteración de la roca pueden ocurrir durante el periodo de enfriamiento (condensación de la fase vapor y desvitrificación). Durante la etapa de soldamiento se pueden observar cambios de color distintivos que se deben a los estados de oxidación del hierro (Alonso 2002), que finalmente le dan los colores característicos a cada ignimbrita.

Muchos apreciamos los edificios y monumentos de ignimbritas que caracterizan a varias ciudades de la República Mexicana, varios de ellos forman parte del Patrimonio Cultural de la Humanidad, entre ellos; el Hospicio Cabañas de

Guadalajara, Monasterios del Popocatépetl, la Rectoría de Ciudad Universitaria en el Distrito Federal, así como los centros históricos de Puebla, Guanajuato, Zacatecas, Oaxaca y Morelia.

México cuenta con 32 bienes inscritos en la lista del Patrimonio Mundial de la Humanidad, de los cuales 27 son bienes culturales y 5 son bienes naturales (whc.unesco.org). El Patrimonio es el legado que hemos recibido del pasado, lo que vivimos en el presente y lo que transmitiremos a futuras generaciones. El Patrimonio Mundial tiene un “valor universal excepcional” no solo de carácter local o nacional. La identificación, protección y conservación del Patrimonio es de gran importancia. Los edificios y monumentos ubicados en el centro histórico de la ciudad de Morelia, Michoacán, forman parte del Patrimonio Mundial de la Humanidad desde 1991 y son el objeto del presente estudio.

## **1.2.- Biodeterioro**

Las rocas utilizadas en la construcción de edificios y monumentos pueden sufrir de deterioro por factores físicos, químicos o biológicos. Un problema importante en la conservación de Patrimonio edificado es su deterioro por factores biológico o biodeterioro. El biodeterioro puede ser definido como el cambio no deseable en las propiedades de materiales de construcción causada por la actividad de diversos organismos vivos generalmente microscópicos (Videla 1998). Los microorganismos causantes de biodeterioro incluyen a los fotótrofos que son considerados colonizadores primarios de las rocas y los heterótrofos que son colonizadores secundarios.

El biodeterioro de las rocas es difícil de entender debido a la gran cantidad de tipos de rocas con mineralogías y características físicas diferentes. Las rocas expuestas al medio ambiente sufren de destrucción de microestructuras por micro-grietas que se generan debido a condiciones ambientales como la humedad, el calor y el enfriamiento. Los factores físicos, químicos y biológicos actúan tanto sinérgicamente como antagónicamente en el deterioro (Warscheid y Braams 2000; Decho 2000; Ortega-Morales y col. 2001; Shirakawa y col. 2011).

El desarrollo de especies biológicas específicas sobre la superficie de una roca en particular, está determinado por su naturaleza y propiedades intrínsecas como; el pH, la composición mineral, salinidad, contenidos de humedad y porosidad, principalmente. También depende de factores ambientales como la humedad relativa, la luminosidad, contaminación atmosférica, lluvia y viento. Finalmente la capacidad de los organismos vivos para colonizar las superficies de construcciones, depende tanto de las condiciones ambientales, como de las propiedades del material y de los requerimientos fisiológicos de los organismos (Nuhoglu y col. 2006).

La presencia y actividad metabólica de microorganismos en la superficie de las rocas puede causar el deterioro estético, químico y físico de los materiales y afectar la integridad de monumentos y edificios a largo plazo. Los microorganismos pueden deteriorar la roca tanto química como mecánicamente y su presencia es generalmente detectada a través de la formación de pátinas o costras (deterioro estético) debido al desarrollo de biopelículas. Los microorganismos son capaces de obtener diferentes elementos para su metabolismo como calcio, aluminio, sílice, hierro ó potasio, mediante la biosolubilización de la roca, la cual involucra la

producción de exoenzimas, agentes quelantes, sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y ácidos orgánicos e inorgánicos producto de su metabolismo (Zanardini y col. 2000; Scheerer y col. 2009; Jroundi y col. 2010).

La participación de los microorganismos en el proceso de biodeterioro ha sido un tema de interés en los últimos años, y la acción de los microorganismos observados en las biopelículas sigue siendo un tema por aclarar (Kiel y Gaylarde 2006). Una vez que han sido aislados los microorganismos viables de las biopelículas los investigadores se han dado a la tarea de caracterizar sus capacidades metabólicas activas y pasivas, tales como la capacidad de precipitar calcio, producir polímeros y ácidos orgánicos, entre otras (Dick y col. 2006), con la finalidad de establecer los posibles mecanismos que expliquen el biodeterioro de distintos materiales de construcción.

Contrario al biodeterioro existen estrategias de restauración de estructuras a base de piedra caliza, rica en  $\text{CaCO}_3$ . En este sentido, la bioprecipitación es un método que consiste en el uso de bacterias capaces de precipitar  $\text{CaCO}_3$  para consolidar grietas, esta actividad puede ser empleada como parte de la prevención y restauración de construcciones históricas, monumentos o esculturas de roca caliza. Se ha descrito que la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  por bacterias puede ser influenciada por actividades fisiológicas que incrementen la alcalinidad del medio favoreciendo así su precipitación (Cacchio y Ercole 2003).

Las bacterias pueden funcionar como sitio de nucleación y favorecer el crecimiento de las partículas de  $\text{CaCO}_3$  (Knorre y Krumbein 2000). Bachmeier (2002) ha reportado la capacidad de *Bacillus pasteurii* para precipitar  $\text{CaCO}_3$  y restaurar fisuras



y grietas en granito. Esta bacteria es capaz de precipitar el carbonato una vez que produce amonio por hidrólisis enzimática de urea, lo que provoca el incremento del pH en el ambiente y la precipitación de  $\text{CaCO}_3$ .



## **2.- ANTECEDENTES**

La ciudad de Morelia, fue nombrada así en honor de José María Morelos y Pavón, es la Capital del Estado de Michoacán, llamada Michoacán de Ocampo, en honor a Melchor Ocampo y fue fundada en 1541 por el Virrey Don Antonio de Mendoza (Alonso 2002). La Catedral de Morelia, fue diseñada bajo el estilo barroco tablereado y construída solo con ignimbrita. Posee un órgano, considerado el más grande de México, de origen Alemán, de principios del siglo XX. La construcción estuvo a cargo del arquitecto italiano Vincenzo Barrochio quien la inició el 06 de mayo de 1660. La construcción fue finalizada en 1744, 84 años después de su inicio (Bérchez 1992).

### **2.1.- Microorganismos en procesos de biodeterioro**

Las interacciones entre factores ambientales (radiaciones UV, contaminación ambiental y la humedad) y la acción de los microorganismos han sido estudiadas ampliamente en los últimos 25 años, sin embargo aún deben aclararse los mecanismos que provocan los cambios físicos, químicos y estéticos observados de la interacción de comunidades microbianas (microorganismos autótrofos, cianobacterias y microalgas) que habitan sobre monumentos (Miller y col., 2008). Los

fotótrofos son capaces de desarrollarse sobre sustratos inorgánicos tales como las rocas, ya que emplean al  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono y a la luz como fuente de energía. Se ha considerado que los microorganismos heterótrofos colonizan las rocas después de los fotótrofos, de acuerdo a una sucesión poblacional en donde los heterótrofos son colonizadores secundarios y emplean a las sustancias orgánicas producidas por los fotótrofos para crecer (Zanardini y col. 2000; Gaylarde 2006).

Las comunidades microbianas que se desarrollan asociadas a los sustratos de roca, forman complejas biopelículas (Figura 1) que son en parte responsables del deterioro químico y físico de la misma. El esquema muestra el ciclo de formación de una biopelícula, el cual consta de tres pasos, anclaje, crecimiento y formación de biopelícula madura (O'Toole y col. 2000).

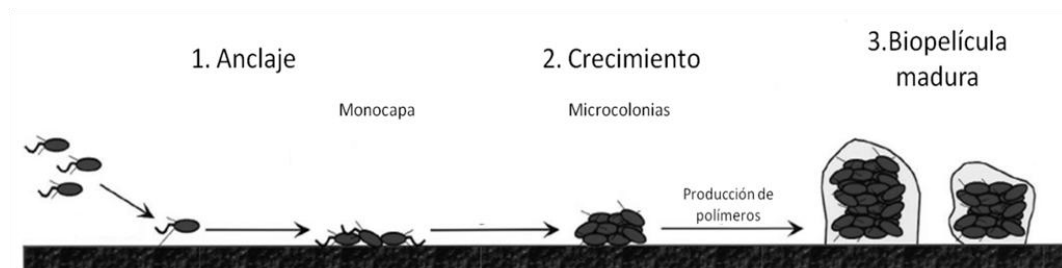


Figura 1. Formación de una biopelícula. El origen de la biopelícula es el anclaje de los microorganismos a la superficie en donde se generan interacciones que involucran a proteínas de pared y de membrana. Esto permite el crecimiento de los microorganismos que son estabilizados dentro de una red de polímeros, formando finalmente una biopelícula madura.

Las biopelículas pueden ser definidas como comunidades de microorganismos anclados a una superficie. La formación de una biopelícula puede servir como un sistema modelo para el estudio del desarrollo microbiano. Las biopelículas pueden

comprender una simple especie microbiana o múltiples especies y pueden formar estratos que propicien condiciones bióticas y abióticas a lo largo de la biopelícula. Las biopelículas son consideradas puntos estables en un ciclo biológico que incluye la iniciación, maduración y disolución de los microorganismos (O'Toole y col. 2000).

Las biopelículas microbianas que colonizan las superficies de las fachadas de monumentos y edificios pueden contener algas, cianobacterias y otras bacterias, arqueas, hongos y líquenes. Los líquenes, hongos, algas y cianobacterias están particularmente adaptados para sobrevivir a la exposición de rayos UV así como en condiciones de baja actividad de agua, ciclos de humedad y rehidratación, lo que hace que estos microorganismos sean frecuentemente encontrados en la superficie de construcciones (Gaylarde y col. 2005; Crispim y col. 2006; De los Ríos y col. 2004). Los líquenes se encuentran más frecuentemente en zonas con poca contaminación atmosférica (Chen y col. 2000).

El biodeterioro se manifiesta generalmente por la aparición de pátinas de diversos colores y por el manchado de las superficies, indicadores de una biopelícula. La coloración generalmente se debe a los microorganismos fotótrofos que son colonizadores primarios (Lamenti y col. 2000; Ortega-Morales y col. 2000; Gaylarde y col. 2003; Walter y Pace 2007). Se ha mostrado que las comunidades microbianas fototróficas principalmente cianobacterias de las familias Scytonemataceae, Microchaetaceae y Rivulariaceae, encontradas en construcciones de América Latina (Crispim y col. 2006) sirven posteriormente de soporte para el anclaje de microorganismos heterótrofos, colonizadores secundarios, como hongos (*Cladosporium* sp.) y bacilos (*Halobacillus* sp., *Bacillus* sp.). Estos microorganismos

utilizan como fuentes de carbono y energía a las sustancias orgánicas producidas por los fotótrofos (Kiel y Gaylarde 2006; Kiel y Gaylarde 2007).

Una variedad de bacterias autótrofas y heterótrofas han sido aisladas de las superficies de rocas en monumentos y edificios del Patrimonio Mundial, en diversas partes del mundo (Saiz-Jiménez 1997). Tayler y May (1991), estudiaron bacterias de rocas de areniscas obtenidas de monumentos antiguos al sur de Inglaterra, encontrando una mayor cantidad de bacterias heterótrofas en este tipo de rocas. Los autores reportaron la presencia de bacterias del género *Bacillus* sp., formadoras de esporas y Gram positivas. Tayler y May (1994) reportan la utilización de la técnica de ELISA modificada para la identificación de bacterias en rocas *in situ* y encontraron la presencia de *Arthrobacter* sp., *Streptomyces* sp., *Pseudomonas*, *Bacillus* sp., *Aeromonas*, *Vibrio* y *Micrococcus* sp. La identificación se llevó a cabo con el antisuero de bacterias aisladas, obtenido de la respuesta inmune en ratas Winstar.

Entre las bacterias que deterioran a los monumentos y edificios de roca, se puede también mencionar a las bacterias sulfo oxidantes y sulfato reductoras, silicobacterias y bacterias oxidantes de amonio (*Nitrosomonas*, *Nitrosovibrio*, y *Nitrospira*) y nitrificantes (Wasserbauer y col. 1988). En su metabolismo las bacterias nitrificantes producen nitrato a partir de amonio (Figura 2). Al combinarse con el agua, los nitratos forman ácido nítrico que puede solubilizar los iones de calcio presentes en las rocas y formar nitrato de calcio, liberando un exceso de protones que termina por hidrolizar rápidamente a los minerales constituyentes de la roca, de los más lábiles a los más refractarios.

Las cianobacterias pueden fijar nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) transformándolo tanto en amonio como en nitrato. El amonio puede ser transformado a nitrito o nitrato por la acción bacterias nitrificantes (Figura 2). Por lo tanto, la participación de las bacterias del ciclo del nitrógeno en el biodeterioro puede ser significativa.

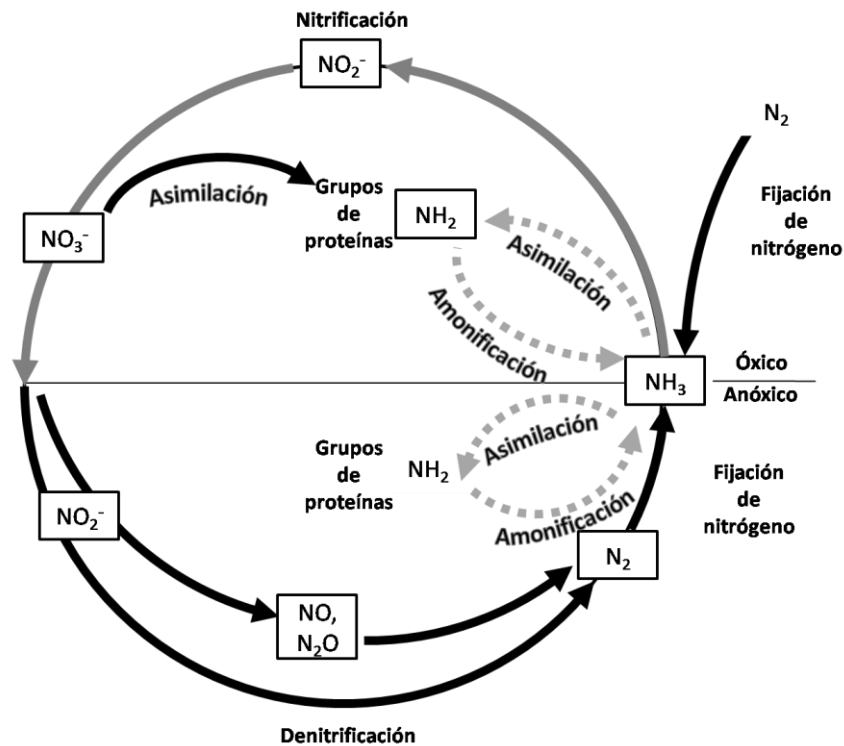


Figura 2. Ciclo del nitrógeno. Las flechas obscuras señalan las reacciones de reducción y las flechas claras, las reacciones de oxidación. Las flechas punteadas señalan las reacciones de asimilación y amonificación del nitrógeno (Madigan y col. 2006).

Gaylarde y Gaylarde (2005) reportaron la presencia de cianobacterias filamentosas como las Nostocaceae y Oscillatoriales; actinomicetos; algas como las *Trentepohliales* y *Klebsormidiu*, así como hongos productores de pigmentos capaces de provocar un cambio de color en fachadas de construcciones modernas e

históricas de Europa y América Latina. Los autores reportaron la presencia de los hongos *Aureobasidium* y *Cladosporium* así como de la cianobacteria *Gleocapsa* en biopelículas muestreadas. Estos microorganismos toleran altas concentraciones de cloruro de sodio de hasta al 20% (p/v), esta capacidad es destacable ya que los materiales de construcción pueden contener iones de  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  o  $Na^+$  que estarán disponibles una vez que se lleve a cabo la disolución de la roca.

Gaylarde y col. (2005) reportaron la presencia de cianobacterias *Microcoleus sociatus* y *Anabaena variabilis* en construcciones históricas de Brasil. Estas cianobacterias terrestres son filogenéticamente diferentes a las cianobacterias acuáticas hasta ahora conocidas. La identificación de estas cianobacterias fue realizada mediante comparación de secuencias del gen 16S rRNA y la construcción de dendrogramas indicó una coincidencia de solo un 96% con cianobacterias acuáticas conocidas. Esta baja homología indica que estas cianobacterias terrestres de rocas son parientes lejanos de las acuáticas.

## **2.2.- Mecanismos de biodeterioro**

La colonización de una roca por microorganismos depende en gran parte de factores ambientales como disponibilidad de agua, pH, radiación, fuente de nutrientes así como de la composición mineral de la roca, su porosidad y permeabilidad. Las características de la roca y la presencia de nutrientes, favorecen el crecimiento microbiano y con ellos la presencia de pátinas o cambios de color, provocados por la producción de biopelículas, pigmentos orgánicos, exopolímeros, sustancias ácidas y procesos enzimáticos, los cuales generan estrés físico, corrosión y procesos

oxidativos que inician el deterioro del material. Autores como Dick y col. (2006) realizaron la evaluación de la absorción de agua por capilaridad en roca caliza. En este caso la roca fue inoculada con diferentes cepas de *Bacillus*, especies *sphaericus* y *lentus* e incubadas durante 5 días. Se obtuvieron curvas de saturación de agua, las cuales mostraron que las rocas no inoculadas presentaban una mayor absorción de agua por capilaridad en comparación con las inoculadas. Esto sugiere que la presencia de microorganismos en los materiales de construcción modifica los canales de desagüe. Prieto y col. (2006) propusieron estimar el potencial de biorreceptividad de roca de granito mediante sus propiedades intrínsecas. Los autores seleccionaron variedades de roca de granito y evaluaron cuatro propiedades, el pH de abrasión (pH), la porosidad accesible de agua (Pa), la densidad aparente (Da) y el máximo contenido de agua capilar (Wc) y emplearon cepas de cianobacterias filamentosas (*Nostoc*, *Scytonema* y *Oscillatoria*) para inocular la superficie de las rocas. Estos autores relacionaron la intensidad del color verde (debido a la presencia de cianobacterias) con el grado de colonización de la roca, con lo cual establecieron el índice de biorreceptividad. La correlación propuesta por los autores para el índice de biorreceptividad fue la siguiente; el color verde cambia en un rango de 3.17 veces por cada  $0.04 \mu\text{g}$  clorofila  $a/\text{cm}^2$  de roca, indicando un incremento en la biorreceptividad de la roca (Prieto y col. 2006).

La presencia de costras o pátinas, provoca un deterioro estético observable a simple vista, además de una asociación compleja que modifica la humedad de la roca, favoreciendo la alternancia de periodos de sequia y humedad sobre la roca. La

presencia de diversos productos del metabolismo microbiano, como ácidos orgánicos e inorgánicos y exopolímeros favorece la acumulación de polvos y el anclaje de otros microorganismos que se desarrollan sobre la roca y la deterioran. Se sugiere que los microorganismos pueden atacar a la roca a través de procesos químicos y físicos relacionados no solo con la presencia de los consorcios microbianos, sino también con la actividad metabólica de los microorganismos ahí presentes (Warscheid y col. 1991). Es entonces importante aclarar las propiedades funcionales o interacciones de los microorganismos con los materiales pétreos. Algunos investigadores han empezado a aclarar la función de los microorganismos en el deterioro de materiales de construcción y es claro que los factores físicos, químicos y biológicos actúan en asociación tanto sinérgica como antagónica (Videla 2000; Warscheid y Braams 2000; Decho 2000; Ortega-Morales 2006; Shirakawa y col. 2011).

A la fecha muchos de los estudios de biodeterioro en construcciones expuestas al medio ambiente son descriptivos ya que sólo se dedican a la identificación de los microorganismos presentes en construcciones deterioradas y posteriormente, se infieren los daños que estos pueden generar en los materiales a partir del conocimiento de sus características intrínsecas. Por ejemplo, se infiere que la presencia de hongos o bacterias endolíticas provoca daños mecánicos por penetración y taponamiento de poros, lo que provoca a su vez cambios en la distribución del agua. Las bacterias nitrificantes son capaces de transformar los nitritos en nitratos, producen ácido nítrico, nitroso y sales de amonio que pueden intervenir en la degradación de compuestos como el asbesto (Wasserbauer y col. 1988). Las bacterias sulfato reductoras y sulfo oxidantes transforman los sulfatos en



sulfuros y los compuestos reducidos de azufre en ácido sulfúrico, respectivamente. Los sulfuros y el ácido sulfúrico son altamente corrosivos para diferentes tipos de rocas (Ribas 1995).

Las comunidades microbianas que se desarrollan en las superficies de las rocas, pueden provocar alteraciones de tipo estético, así como afectar la integridad física del material y la transformación de los minerales. La excreción de enzimas así como de ácidos inorgánicos y orgánicos disuelve los componentes estructurales del sustrato mineral, contribuyendo a los procesos de deterioro (Videla y col. 2003). Los hongos pueden degradar la roca tanto química como mecánicamente, ya que producen una amplia variedad de ácidos orgánicos (ácido cítrico y oxálico) e inorgánicos, como ácido sulfúrico y nítrico, estos ácidos pueden desmineralizar varios sustratos rocosos.

Se sabe que los actinomicetos pueden atacar los monumentos de arenisca y el hongo *Aspergillus glaucus* el concreto ya que estos microorganismos son capaces de penetrar en el material provocando la formación de agujeros (McCormack y col. 1996; Griffin y col. 1991). Las cianobacterias y algas son capaces de formar costras pigmentadas que causan daño estético y provocan el deterioro de la roca. Las cianobacterias epilíticas pueden disolver el carbonato de rocas calcáreas mediante la producción de ácidos orgánicos e inorgánicos lo que puede provocar su desprendimiento o fractura (Ortega-Morales 2006). El deterioro causado por líquenes y cianobacterias es similar ya que pueden secretar ácidos como el oxálico que precipita como oxalato de calcio dihidratado y forma una pátina de oxalato, al sustraer el calcio de la roca (Videla y col. 2003).

Tanto las bacterias como los hongos pueden llevar a cabo la excreción de ácido oxálico debido al metabolismo de sustancias orgánicas. En los hongos existen dos rutas reportadas para la síntesis de ácido oxálico. La primera se lleva a cabo en el citoplasma en donde la acción de una piruvato carboxilasa produce oxalacetato que es hidrolizado a oxalato, reacción favorecida por el cambio de pH de 6 a 8 en el citoplasma. La segunda involucra el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), el oxalato se produce por vía citrato, isocitrato y glioxilato (Pinna y col. 1993).

Las bacterias capaces de precipitar el calcio como  $\text{CaCO}_3$  han sido nombradas bacterias con capacidad carbonatogénica. Su principal actividad en el proceso de precipitación se ha descrito como su habilidad para crear un ambiente alcalino que actúa sobre la estructura de la pared celular ya que las cargas negativas alrededor de la célula pueden servir de sitios de unión para el calcio, lo que permite la precipitación del  $\text{CaCO}_3$  (Ercole y col. 2007; Chahal y col. 2011).

Barberousse y col. (2007) reportaron que los factores ambientales como humedad y luz, así como las características intrínsecas de los materiales de construcción como la rugosidad y porosidad, favorecen la colonización superficial de construcciones expuestas al medio ambiente por algas y cianobacterias ya que ayudan a su anclaje, retención y adhesión. Los microorganismos colonizadores de la superficie de los monumentos o materiales de construcción, pueden ser transportados hasta estos sitios a través del viento, tal como se transportan las esporas de hongos, por el polen o por partículas que resultan en la diseminación de las superficies antes o después de la construcción. Los perfiles de manchas o pátinas observados en las fachadas,

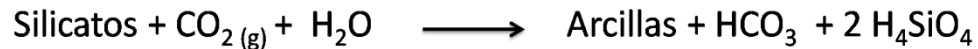
se forman por acarreamiento de los microorganismos a través de las corrientes de las bajadas de agua. Estos desplazamientos resultan en el cambio de color de estas zonas generando un aspecto de huella digital. Finalmente estos autores afirman que la composición química de las superficies favorece la colonización y que un pH alto puede retrasar la colonización por los microorganismos. Sin embargo la colonización microbiana se vuelve posible una vez que el proceso de carbonatación disminuye el pH.



En el caso del concreto, el material reacciona con el CO<sub>2</sub> atmosférico. En este proceso de carbonatación el hidróxido de calcio contenido en el concreto reacciona con CO<sub>2</sub> formando carbonato cálcico insoluble. El concreto nuevo tiene un pH altamente alcalino de entre 12 y 13. La carbonatación disminuye el pH hasta valores menos alcalinos de 8.5 a 9, favoreciendo así la colonización microbiana y la corrosión del concreto (Peter y col. 2008).

Las biopelículas microbianas en paredes externas de construcciones causan deterioro estético y degradación de la estructura a través de la producción de condiciones ácidas o alcalinas, retención de humedad y diferentes absorciones de calor por la presencia de depósitos coloreados en la superficie. Los principales microorganismos encontrados en construcciones Latinoamericanas fueron cianobacterias y hongos que pueden causar la degradación de la roca por la producción agresiva de metabolitos ácidos y alcalinos así como de surfactantes, además de la penetración física de las hifas en el sustrato. Los polioles (glucosa,

glicerol, polisacáridos) producidos están involucrados en la degradación de minerales silicios (compuestos por  $\text{SiO}_4$ ) usando el mismo mecanismo para la deposición de sílice en un ambiente acuoso (Crispim y col. 2006; Ahmed y col. 1999). La reacción típica en la degradación del suelo que contiene silicatos es:



La liberación del ácido silícico ( $\text{H}_4\text{SiO}_4$ ) provoca la formación de arcilla (silicatos de aluminio hidratados) e incrementa el intercambio catiónico de los suelos, lo que provoca incrementos en el pH hasta valores de 7.5 a 8.5, favoreciendo así la carbonatación de la roca.

La capacidad que tienen ciertas bacterias para favorecer la precipitación de calcio en forma de  $\text{CaCO}_3$  no solo es una actividad deteriorante. En años recientes se ha generado un gran interés en emplear esta capacidad como una estrategia de restauración para rocas de tipo caliza que son ricas en calcio (Hammes y col. 2003; Phillips y col. 2013). El  $\text{CaCO}_3$  depositado por bacterias puede ser empleado como consolidante de grietas en este tipo de rocas.

Capitelli y Sorlini (2008) reportan el ataque microbiano de polímeros sintéticos y señalan que los principales responsables de la degradación de polímeros como el PVC, poliuretano, nilón y acrílicos son hongos (*Aureobasidium pullulans*, *Chaetomiun globosum*, *Bjerkandera adusta*) y algunas bacterias (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus pullidus*) principalmente. Los principales modos de acción de estos microorganismos son por incremento de la pérdida de plasticidad en el PVC debido a la degradación microbiana, ruptura física y la degradación enzimática del

polímero. Estos autores reportan que el inicio del deterioro en superficies de Patrimonio Mundial o materiales de construcción, empieza con la formación de una biopelícula, de la cual debiera evitarse su formación.

## **2.3.- Técnicas de investigación en biodeterioro**

### **2.3.1.- Microbiología clásica y molecular**

En estudios de biodeterioro de edificios y construcciones del Patrimonio Mundial, las muestras de microorganismos colectadas en monumentos son muy reducidas (generalmente menores a 1mg), obtenidas por raspado o con ayuda de una cinta adhesiva. Estas técnicas de muestreo son empleadas ya que no son destructivas (Videla y col. 2003).

Las técnicas microbiológicas tradicionales basadas en cultivo, sólo detectan una pequeña fracción (menor al 1%) de los microorganismos presentes en muestras ambientales (Amann y col. 1995). Las técnicas moleculares independientes de cultivo, basadas en el análisis de los ácidos nucleicos, son de gran utilidad en estos casos. Estas técnicas se basan en el análisis de secuencias de genes ribosomales (rRNA) presentes en el genoma de todos los organismos. La Figura 3 muestra los principales pasos para el análisis molecular de muestras ambientales. Con base en lo anterior la amplificación *in vitro* de los ácidos nucleicos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), no requiere de muestras grandes para la identificación de los microorganismos. Los productos de PCR pueden ser posteriormente separados por construcción de un banco de clonas (genoteca de genes ribosomales) o bien por una

técnica de huella genética como la electroforesis en geles con gradiente desnaturalizante (DGGE). Cada clona de una genoteca o banda del patrón electroforético corresponde, teóricamente, a un microorganismo presente en la muestra original.

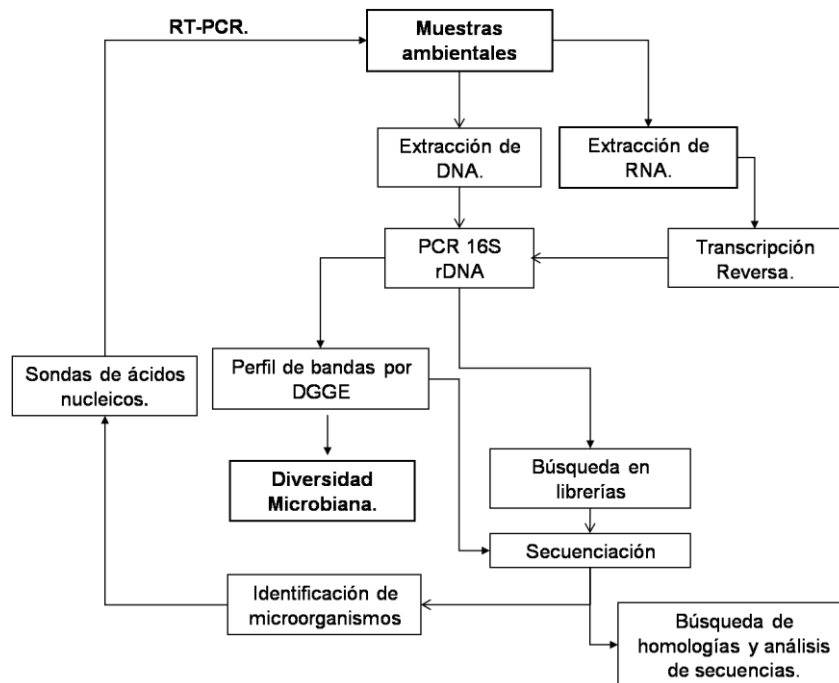


Figura 3. Estrategias para la identificación de microorganismos por técnicas moleculares en muestras ambientales.

Amann y col. (1995) fueron los pioneros en la caracterización de comunidades microbianas sin cultivo mediante la técnica de hibridación con fluorescencia *in situ* (FISH). Esta técnica permite la identificación y cuantificación directa de células microbianas individuales en muestras complejas sin incluir un paso de amplificación de los ácidos nucleicos por PCR. Las células completas son sometidas a hibridación con oligonucleótidos específicos, etiquetados con moléculas fluorescentes, complementarias a porciones específicas de los rRNA, los cuales están presentes en

un alto número de copias en células metabólicamente activas. El rRNA contiene un mosaico de secuencias que van desde altamente conservadas, hasta secuencias altamente variables, estas últimas pueden ser usadas para diferenciar familias, géneros y ocasionalmente especies (O'Donnell y Whiteley 1999; González y Saiz-Jiménez 2005; Amann y col. 1995).

Crispim y Gaylarde (2004) reportan la identificación de cianobacterias en construcciones históricas alrededor del mundo, empleando técnicas moleculares. Los autores concluyen que para el análisis molecular con el 16S rRNA se requieren de primers específicos para cianobacterias terrestres ya que en las bases de datos se encuentran principalmente secuencias de cianobacterias acuáticas, sin embargo para poder diseñar estos primers es necesario disponer de cultivos puros, lo cual es difícil, ya que las cianobacterias normalmente se encuentran asociadas con otras especies, como hongos, algas y eubacterias y no se conocen los medios y métodos de cultivo para obtener cultivos axénicos de ellas.

Gaylarde y col. (2004) reportaron el uso de técnicas de biología molecular y observaciones fenotípicas (estrategia polifásica) en biopelículas rehidratadas, para la identificación de cianobacterias no cultivables. Los autores seleccionaron morfologías características e identificaron a las cianobacterias por amplificación directa del DNA. Los autores reportan la presencia de cianobacterias con bajo nivel de similitud en el banco de genes, ya que la mayoría de cianobacterias reportadas han sido de procedencia acuática.

Berdoulay y Salvado (2009), reportaron el desarrollo de una metodología molecular para conocer la diversidad genética en biopelículas de todos los miembros que la

integran. Los autores reportan que el uso de métodos dependientes del cultivo conduce a subestimar la diversidad microbiana. Ellos mencionan que el principal problema es extraer DNA de la calidad adecuada para la amplificación por PCR y la posterior clonación de los amplicones obtenidos. Estos autores recomiendan entonces el uso del método, análisis de restricción del DNA ribosomal amplificado (ARDRA) como herramienta para identificar clones de interés para la secuenciación y concluyen que es necesario considerar dos aspectos para una buena identificación de los integrantes en las biopelículas, la calidad del DNA y un buen número de clonas analizadas para asegurar la diversidad genética.

Qi-Wang y col. (2011) analizaron las comunidades microbianas en ladrillos de la muralla de la ciudad de Nanjing Ming, que presentaba diferentes niveles de deterioro. Los autores analizaron las muestras mediante DGGE para conocer la composición microbiana de las muestras con diferentes niveles de deterioro, de las bandas representativas observadas en el DGGE. Las bandas fueron cortadas, reamplificadas y los amplicones clonados para su posterior secuenciación. Las secuencias obtenidas mostraron en la identificación filogenética a los géneros representativos de las muestras que fueron; *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *α-Proteobacteria*, *γ-Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Chloroflexi* y *Deinococcus-Thermus*. Los autores concluyen que la presencia de estos microorganismos en los sitios analizados y su capacidad de sustraer sílice de la matriz de la roca fue evidencia suficiente de la participación microbiana en el deterioro de la muralla.



### **2.3.2.- Análisis de materiales y superficies**

El análisis del material de construcción debajo de las biopelículas permite, esclarecer los posibles mecanismos que los microorganismos emplean para poblar la roca y deteriorarla. Otras técnicas empleadas para el estudio de comunidades microbianas y la evaluación del biodeterioro de los materiales, son la microscopía electrónica de barrido (MEB), el análisis de superficie por dispersión energética de rayos X (DEX) y la difracción de rayos X (DRX), así como la espectroscopía de infrarrojo (IR) (Wasserbauer y col. 1988; Herrera y col. 2004).

Al comparar micrografías de MEB de rocas sanas y rocas colonizadas, se puede observar la interfase entre la roca y la biopelícula. La morfología y distribución de los microorganismos puede también ser determinada en la biopelícula y en la interfase de los fragmentos de roca. Esta técnica permite observar la interacción entre los microorganismos y la roca, nos provee información espacial de la colonización *in situ* y del daño generado en la roca (De los Ríos 2005).

La MEB acoplada con el análisis DEX permite determinar y comparar la química elemental del material de construcción en áreas dañadas y sanas, además de las observaciones de biopelículas antes mencionadas. La información obtenida es cuantitativa ya que puede ser expresada en porcentajes de peso de cada elemento. Por ejemplo, en la iglesia de San Ignacio en Medellín, Colombia, se observaron altos niveles de  $Fe^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  en las zonas deterioradas comparado con zonas sanas (Herrera y col. 2003). El análisis de las rocas debajo de las biopelículas por DRX permite determinar la presencia de minerales normalmente ausentes en rocas sanas

(Cappitelli y col. 2007a). Estos resultados son indicadores de una posible biosolubilización de los elementos constitutivos de la roca.

Ortega-Morales (2006) empleó tanto la microscopia confocal láser de barrido (CSLM) como MEB para observar cianobacterias de biopelículas microbianas asociadas a monumentos mayas en Uxmal, México. El autor observó que éstas se encontraban cubiertas con depósitos de material calcáreo, lo que sugiere la migración de calcio de sitios vecinos, el autor menciona que los depósitos de calcio pueden ser disueltos en la noche debido a cambios en la concentración de bicarbonato inducida por la actividad fototrófica. La CSLM permite la obtención de secciones ópticas de las muestras, que sirven de base para la obtención de imágenes en tres dimensiones de las biopelículas. Además las algas y cianobacterias encontradas fueron principalmente cocoidales que se encontraban embebidas en una matriz polimérica cubriendo la superficie de las construcciones.

De los Ríos y col. (2009) evidenciaron el deterioro de rocas calizas y dolimitas de 4 iglesias en Segovia, España. Emplearon la MEB y el modo con electrones retrodispersos (MEB-ERD), para observar la interfase entre la biopelícula y la roca, así como MEB a baja temperatura y microscopia de transmisión. Estas técnicas permitieron observar la estructura tridimensional superficial y cortes transversales de las muestras por lo que se estableció que el tipo de crecimiento, penetración de tallos y desintegración de la roca fueron los procesos considerados deteriorantes por los hongos y líquenes observados. Los autores reportaron que los hongos (*Epicoccum*, *Phoma*, *Sarcinomyces* y *Capnobotryella*) fueron los principales componentes de las biopelículas formadas en los sitios que mostraron biodeterioro.

## **2.4.- Experimentos de biodeterioro bajo condiciones controladas**

Con la finalidad de reproducir el biodeterioro bajo condiciones controladas en el laboratorio, se han desarrollado experimentos favoreciendo las condiciones ambientales a lo largo de todo el tiempo. Estos experimentos en condiciones controladas favorecen la observación de cambios en las rocas debidos a cada uno de los factores planteados en cortos periodos de tiempo.

Prieto y col. (2006) fueron de los pioneros en proponer este tipo de experimentos y determinar la biorreceptividad de rocas de granito. Los autores solicitaron la patente en España (Num. Publicación 2 246710) para el procedimiento de determinación de “Biorreceptividad potencial de rocas graníticas, a partir de sus propiedades intrínsecas”.

Miller y col. (2008) reprodujeron en el laboratorio la colonización microbiana sobre roca caliza. El objetivo del experimento fue aclarar el proceso de colonización por microorganismos fotosintéticos. La observación de la formación de una biopelícula, la presencia de microorganismos en fisuras así como penetración en la matriz mineral fueron las variables a evaluar. Se empleó una biopelícula como inóculo y se analizaron los cambios en las comunidades microbianas encontradas en la muestra original así como en los bloques y en el líquido residual, empleando la técnica de DGGE. Se encontraron similitudes entre las especies observadas a lo largo del tiempo y en la biopelícula original y se demostró la reproducibilidad de la colonización microbiana en condiciones controladas.

Otros autores que han llevado a cabo experimentos con rocas en condiciones de laboratorio fueron Dick y col. (2006). Estos autores propusieron el empleo de bacterias para la restauración de superficies deterioradas en construcciones y monumentos de roca caliza. Ellos emplearon seis cepas de *Bacillus* para producir inicialmente una biopelícula sobre cubos de roca, y posteriormente añadieron  $\text{CaCl}_2$  para favorecer la formación de una capa de  $\text{CaCO}_3$ . La presencia de éste compuesto fue propuesta como una técnica de restauración, la cual le daría un nuevo aspecto al material deteriorado. La biomineralización de  $\text{CaCO}_3$ , es una nueva estrategia para restaurar la piedra caliza deteriorada. En este proceso induce la precipitación biológica de  $\text{CaCO}_3$  por un organismo en un microambiente, con condiciones óptimas para la precipitación de sustancias extracelulares y fases minerales. Ellos reportaron que los *Bacillus* tienen la capacidad de precipitar el calcio debido a que emplean a la urea para obtener amonio como fuente de nitrógeno. La degradación de la urea por la enzima ureasa libera  $\text{CO}_2$  y amonio. La presencia de amonio contribuye a incrementar el pH. La presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en exceso promueve la deposición del  $\text{CO}_2$  como  $\text{CaCO}_3$ .

Aviam y col. (2004) evaluaron la biodegradación acelerada de bloques de cemento por bacterias oxidantes de azufre. Después del periodo de incubación evaluaron las propiedades intrínsecas de los bloques; pH, reducción de peso, porosidad y pérdida de calcio además de realizar observaciones por MEB. Estos análisis permitieron corroborar la pérdida de peso debido a la presencia de bacterias, el decremento de pH que favorece la biosolubilización de iones, como el calcio, además de grietas profundas en los bloques que favorecen su deterioro.

Capitelli y col. (2007b), compararon dos métodos de limpieza para la remoción de costras negras que contienen yeso en la Catedral de Milán. Los métodos fueron uno químico y el otro microbiano. El método microbiano involucraba a *Desulfovibrio vulgaris*, Los autores reportaron que el tratamiento biológico no solo limpió completamente la superficie de la costra negra, sino que también se observó la formación de calcita en estratos con superficies organizadas, hecho que favoreció la restauración del sitio.

### **3.- PLANTEAMIENTO DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

Los edificios y monumentos construidos con ignimbritas en diferentes ciudades del país, se encuentran expuestos al medio ambiente y por lo tanto a diferentes agentes deteriorantes. Se ha encontrado una clara correlación entre los contenidos de azufre ambiental y el deterioro mecánico de ignimbritas de la Catedral de Morelia (Alonso 2002). Sin embargo, no existen trabajos de investigación que hayan estudiado el impacto de los microorganismos en el deterioro de la ignimbrita (biodeterioro). La preservación y mantenimiento de estas construcciones es una necesidad que responde a diversos requerimientos; históricos, estéticos, artísticos, religiosos e incluso de esparcimiento. En este contexto planteamos la siguiente pregunta de investigación: **¿Pueden las comunidades microbianas presentes en la superficie de las ignimbritas causar un deterioro estructural de este material pétreo?**

## **4.- HIPÓTESIS**

Las comunidades microbianas que colonizan las superficies de monumentos de ignimbrita contienen microorganismos fotosintéticos y heterótrofos que pueden alterar y deteriorar estructuralmente éste material pétreo.

## **5.- OBJETIVOS**

### **5.1.- Objetivo general**

Caracterizar las comunidades microbianas presentes en la superficie de monumentos de ignimbritas y evaluar su participación en el deterioro pétreo.

### **5.2.- Objetivos específicos**

- Aislar y caracterizar los principales microorganismos fotosintéticos y heterótrofos presentes en biopelículas de monumentos de ignimbrita.
- Analizar la composición de la ignimbrita debajo de las biopelículas muestreadas y compararla con ignimbrita sin biopelícula.
- Determinar la estructura y composición de comunidades microbianas que colonizan monumentos de ignimbrita mediante técnicas moleculares independientes de cultivo.
- Evaluar la biorreceptividad de la ignimbrita.
- Evaluar el deterioro de la ignimbrita inoculada con suspensiones de biopelículas y microorganismos aislados en el laboratorio.

## 6.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental propuesta, está conformada por el empleo de diversas técnicas de análisis. Para el estudio de las superficies, composición elemental y mineral de la ignimbrita, se propuso el empleo de MEB, de DEX y la DRX.

Para la obtención de los microorganismos cultivables, la microbiología convencional es esencial, apoyada con técnicas de biología molecular se podrá tener acceso a los microorganismos no cultivables. Finalmente apoyados en todas estas técnicas de estudio podremos entender cómo se favorece la colonización microbiana en la ignimbrita y dilucidar la participación de los microorganismos en el biodeterioro de esta roca (Figura 4).

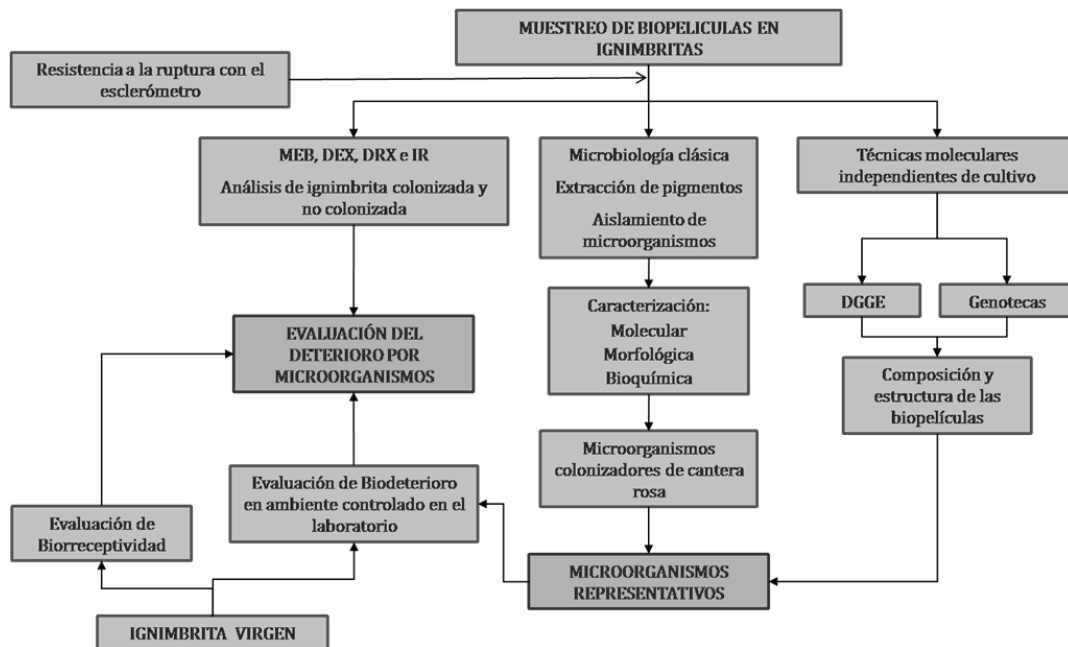


Figura 4. Estrategia experimental desarrollada para la evaluación del biodeterioro en ignimbritas.

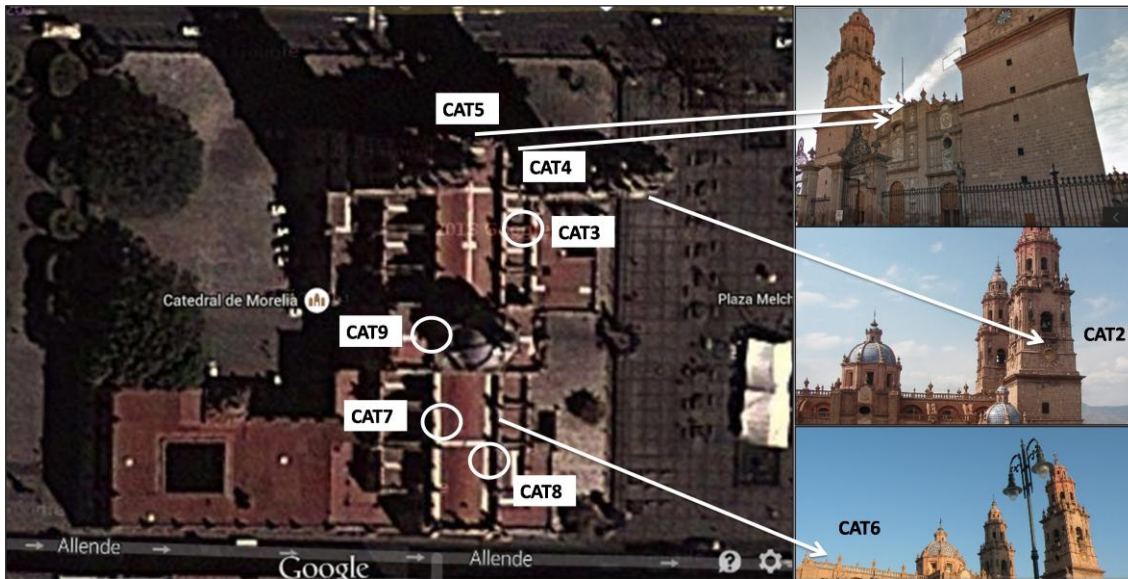
## **7.- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1.- Muestreo**

Los muestreos de ignimbrita fueron realizados en la ciudad de Morelia, Michoacán. La ciudad de Morelia se encuentra localizada en el Noroeste del Estado de Michoacán. Su situación geográfica es justo en el cruce de la Sierra Madre Occidental, el Eje Neovolcánico y las Placas Tectónicas de Cocos y de Rivera. La orografía descrita es producto de la continua actividad volcánica y al mismo tiempo es precursora de las rocas ígneas extrusivas que son de interés en éste trabajo (Alonso 2002).

El edificio muestreado fue la Catedral (CAT) de Morelia, Michoacán, los sitios muestreados en Catedral corresponden a caras del balaustro y la azotea. Los sitios muestreados en la azotea, reciben de frente a los vientos dominantes (caras del suroeste y noroeste) y presentan mayor exposición a los factores ambientales (Figura 5). Los sitios de interés muestreados fueron aquellos que presentaron cambios de color y la presencia de manchas o pátinas.





**Figura 5.** Ubicación de los sitios muestreados en la Catedral de Morelia en el centro histórico de ésta ciudad. Las flechas indican los sitios muestreados vistos lateralmente, los círculos señalan los sitios muestreados en la azotea de la construcción.

Se realizaron 4 periodos de muestreo a diferentes momentos del año. La recolección de muestras se llevó a cabo al final de la temporada de calores (2° muestreo), lluvias (3° muestreo) y fríos (4° muestreo), entre mayo 2008 y febrero 2009. Los tiempos de muestreo fueron establecidos en base a las estaciones del año, con la finalidad de obtener muestras de los mismos sitios que fuesen representativas de cada condición estacional.

Además de buscar zonas con manchas y cambios de color (posiblemente debido a la formación de biopelículas), se decidió restringir la toma de muestras a las caras de la Catedral expuestas a los vientos dominantes procedentes del suroeste, por lo cual las caras muestreadas fueron las del oeste de la construcción, principalmente ([http://www.conaculta.gob.mx/turismocultural/destino\\_mes/morelia/](http://www.conaculta.gob.mx/turismocultural/destino_mes/morelia/)).

Las muestras de biopelícula fueron tomadas rascando en cada sitio con espátulas y bisturís estériles y se colocaron en tubos de ensayo de plástico de 15 mL para ser divididas como se menciona a continuación:

1. Para microbiología y observaciones en fresco: en viales de plástico de 1.5 mL estériles con medio BG11 estéril.
2. Para microscopía óptica: en viales de plástico estériles de 1.5 mL con glutaraldehído 2.5% en amortiguador de fosfatos a pH 7.3 (v/v), esto con la finalidad de no romper las estructuras microbianas que permitan la identificación morfológica posterior de los microorganismos en la muestra.
3. Para microscopía electrónica: en viales de plástico de 1.5 mL estériles con glutaraldehído 2.5% (v/v).
4. Para extracción de DNA: en viales de plástico estériles en seco.
5. Para la extracción de pigmentos: en viales de plástico estériles en seco.
6. Para la DRX e infrarrojo (IR): en viales de plástico de 1.5 mL estériles en seco.

Para las metodologías 4, 5 y 6 la cantidad de muestra empleada en cada una, no supero los 400 mg. Las muestras fueron transportadas bajo refrigeración. Los muestreos fueron realizados durante tres diferentes periodos estacionales a lo largo de un año.

Durante los muestreos descritos anteriormente se encontraron sitios en la azotea restaurados con morteros, esto en la base de los pretils alrededor de toda la azotea, estos sitios también fueron muestreados para su posterior análisis y comparación.

## **7.2.- Caracterización de materiales y superficies**

### **7.2.1.- Resistencia a la ruptura**

Antes y después de tomar la muestra de biopelícula se realizó la prueba de resistencia a la compresión con el esclerómetro ó martillo (Sclerometro digitale a microprocessore, Digital Concrete Test Hammer. 58-C0181/G) en los sitios con y sin biopelícula. La prueba consiste en el promedio de 10 golpes ejercidos sobre el mismo sitio. Una vez obtenidos los promedios, se lleva a cabo un análisis estadístico para ver si existen diferencias significativas en los sitios muestreados.

Las muestras obtenidas durante el segundo muestreo así como las muestras de ignimbritas sanas, fueron analizadas por diferentes técnicas como; MEB, DEX, DRX e IR. Los procedimientos empleados en cada caso se describen a continuación.

### **7.2.2.- Microscopía electrónica de barrido (MEB) y dispersión energética de rayos X (DEX)**

#### **a) Secado al punto crítico para microscopía electrónica de barrido**

Las muestras fueron preparadas mediante la técnica de secado al punto crítico (Anexo 1) para su deshidratación. Una vez secas, éstas fueron montadas en portamuestras y cubiertas con oro para su posterior observación por MEB y análisis elemental por DEX.

El secado al punto crítico es un método que ha sido empleado para secar tejidos sin que estos se colapsen o deformen de su estructura original. El punto crítico de un sistema líquido/gas ( $\text{CO}_2$  líquido/ $\text{CO}_2$  gas) es su temperatura crítica y la presión

asociada con esta temperatura. La transición de líquido a gas en el punto crítico ocurre sin una interfase debido a que las densidades de líquido y gas son iguales en este punto.

#### **b) Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

La MEB es una técnica empleada para la observación y el análisis de microestructuras en tres dimensiones de objetos sólidos. Los análisis de MEB fueron realizados usando un microscopio JEOL JSM-5900LV (JEOL LTD., Tokio, Japón). Este análisis permitió conocer la ubicación de microorganismos en las biopelículas, la morfología celular y la observación de la interfase biopelícula-roca (Slöstrand 1967; Santander 1968; De los Ríos y col. 2004).

#### **c) Dispersión energética de rayos X (DEX)**

El método consiste en impactar un haz de electrones sobre la muestra, lo que genera señales características para cada elemento, estas señales son detectadas por un equipo analizador de rayos X en el microscopio electrónico con sonda EDS de marca OXFORD.

Con esto se consiguió realizar un análisis químico de las muestras en escala puntual, el análisis indicó que elementos fueron encontrados en los sitios seleccionados.

### **7.2.3.- Difracción de rayos X (DRX)**

Es una técnica analítica no destructiva que revela información a cerca de la estructura cristalográfica, orientación y tamaño de cristales en la muestra analizada. La técnica se basa en la elasticidad de dispersión de los rayos X de estructuras que

tienen orden de gran alcance, materiales cristalinos. La DRX se llevó a cabo en un difractómetro de rayos-X D8 Advance Power (Bruker Corporation).

#### **7.2.4.- Espectroscopia infrarroja (IR)**

La espectroscopia IR emplea la región media aproximadamente entre  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ , para estudiar las vibraciones fundamentales y la estructura rotacional vibracional de moléculas. Las vibraciones activas serán aquellas que cambien el momento dipolar permanente. Las bandas vibracionales activas de muchos grupos funcionales se observan a longitudes de onda características, lo que constituye un criterio inequívoco para la identificación de una molécula. El análisis se llevó a cabo con un sistema FT-IR de marca Bruker y modelo Tensor 27 (USA).

#### **7.3.- Estudios de biorreceptividad**

La caracterización de la ignimbrita se realizó en el laboratorio mediante la evaluación de sus propiedades intrínsecas bajo condiciones controladas.

Se determinó el pH en solución, para lo cual se pesaron 40g de ignimbrita molida y los cuales fueron mezclados con agua destilada hasta saturación, la mezcla se dejó reposar durante 1 hora, pasado el tiempo se extrajo el agua por filtración con papel Whatman # 42 en embudo, el pH fue medido en la muestra de agua obtenida. A estas mismas muestras se les determinó la conductividad con un medidor de conductividad HANNA instruments HI (Fernández 2006).

La humedad actual en los bloques de ignimbritas 1 y 2 se determinó de la siguiente manera. Al menos 3 de cada uno de los bloques de ignimbritas en su estado original fueron pesados en balanza analítica, posteriormente se secaron en horno a  $110^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Después de este periodo se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente en un desecador para determinar su peso nuevamente con la fórmula de porcentaje de humedad actual (Tabla 1).

El contenido de agua ó el porciento de agua que puede absorber cada bloque fueron obtenidos de la siguiente forma. Las muestras empleadas anteriormente, secadas en horno por 24 horas y pesadas, fueron sumergidas en un recipiente con agua durante 24 horas al vacío, posteriormente fueron retiradas del agua y secadas con un lienzo para retirar el exceso de agua y fueron pesadas. Otros parámetros evaluados para caracterizar la ignimbrita fueron calculados en base a los parámetros mencionados usando las fórmulas mostradas en la Tabla 1 (Papida y col. 2000; Navarro y col. 2007).

Tabla 1. Fórmulas para la evaluación de propiedades intrínsecas de bloques de ignimbritas.

Parámetro	Fórmula	Definiciones
Densidad de roca en seco (g/cm <sup>3</sup> )	$\rho_s = M_s/V$	$M_s$ = masa de los bloques secos, $V$ = volumen geométrico.
Densidad de grano (g/cm <sup>3</sup> )	$\rho_g = M_s/V_g$	$V_g$ = volumen de agua desplazado en una probeta por el bloque pulverizado.
Porosidad (%)	$n = (V_p/V) \times 100$	$V_p = (M_{sat} - M_s)/\rho_{agua}$ ; $M_{sat}$ = masa de la muestra después de 24 horas de inmersión en agua al vacío.
Contenido de agua (%)	$w = (M_{agua}/M_s) \times 100$	$M_{agua}$ = masa de agua en los poros del bloque después de 24 horas de inmersión en agua al vacío.
Humedad actual (%)	$H = ((M_h - M_s)/M_s) \times 100$	$M_h$ = masa de los bloques originales

## 7.4.- Microbiología

### 7.4.1.- Extracción de pigmentos

La presencia de clorofila a, carotenoides y ficobiliproteínas fueron evaluados en las muestras de Catedral. Estos pigmentos se determinaron como se describe a continuación.

Las muestras obtenidas fueron mantenidas en el refrigerador hasta su empleo. Posteriormente, fueron depositadas en un mortero con 5 mL de amortiguador de fosfatos a pH 7.3 y nitrógeno líquido, las muestras fueron trituradas y almacenadas

en la oscuridad por 30 minutos a -20°C. Cada muestra fue transferida a tubos de ensayo de plástico de 15 mL que fueron sometidos a baño de agua con sonicación por 4 minutos y enfriamiento en hielo por 1 minuto. Este proceso se repitió 4 veces y las muestras fueron centrifugadas para su separación. El sobrenadante fue empleado para identificar las ficobiliproteínas por espectrofotometría a densidades ópticas (DO) de 562, 615 y 652 nm. Los pellet fueron tratados con una mezcla de metanol/acetona (7:2) y almacenados en refrigeración por 24 horas. Posteriormente la mezcla ( $V_{\text{filtrado}}$ ) fue filtrada para obtener el extracto ( $V_{\text{extracto}}$ ) y determinar la presencia de clorofila a y carotenoides a 665, 480 y 750nm (Marker 1972; Bennett y Bogorad 1973; Britton, 1985).

Las ecuaciones empleadas para la determinación de ficoeritrina (PE), ficocianinas (PC), aloficocianinas (APC), clorofila a y carotenoides se muestran a continuación:

$$[\text{PC}] = (\text{DO}_{615} - 0.474 (\text{DO}_{652}))/5.34 \quad (\text{Bennett y}$$

$$[\text{APC}] = (\text{DO}_{652} - 0.208 (\text{DO}_{615}))/5.09 \quad (\text{Bogorad 1973})$$

$$[\text{PE}] = (\text{DO}_{562} - 2.4(\text{PC}) - 0.849(\text{APC}))/9.62$$

$$[\text{clorofila a}] = \text{DO}_{665} * 13.14 \quad (\text{Marker 1972})$$

$$[\text{carotenoides}] = ((\text{DO}_{480} - \text{DO}_{750}) * V_{\text{extracto}} \text{ en mL}) / ((100 * E)(V_{\text{filtrado}} \text{ L})) \quad (\text{Britton 1985})$$



#### **7.4.2.- Microscopía óptica de muestras**

Con observaciones al microscopio óptico se logró conocer la morfología de algunos de los microorganismos tanto en las muestras originales como de los aislados.

Inicialmente se llevaron a cabo observaciones en fresco para conocer el tipo de microorganismos que formaban parte de las muestras recolectadas. Se empleó una gota de la suspensión de la muestra sobre el portaobjetos, para posteriormente llevar a cabo observaciones en el microscopio óptico. La presencia de hongos fue corroborada tiñendo las muestras con azul de algodón (Anexo 2b) que ayudó a distinguir la quitina, principal proteína constituyente de la pared en las estructuras fúngicas. También se realizó tinción Gram para identificar el tipo de bacterias presentes en las muestras (Anexo 2a).

#### **7.4.3.- Aislamiento y caracterización preliminar de microorganismos**

##### **a) Medios de cultivo**

El medio de cultivo empleado para el crecimiento de cianobacterias y algas fue el BG11 cuya composición se muestra en el Anexo 3 (Tomaselli y col. 2000; Gundlapally y García-Pichel 2005). Este medio fue suplementado con 1 g/L de ignimbrita molida y preparado con agua de calidad Milli Q del sistema Millipore. El polvo de ignimbrita fue obtenido de bloques de ignimbrita empleados para la restauración de la Catedral.

Para el aislamiento de bacterias heterótrofas al medio BG11 se le adicionaron la ignimbrita en polvo y fuentes ricas en carbono como; peptona, glucosa y extracto de levadura (medio PGY) en un 0.25% (p/v).

Para el crecimiento de hongos se adicionó al medio BG11 las fuentes ricas en carbono PGY, la ignimbrita y ácido tartárico para un porcentaje final en el medio del 10% (v/v), ya que éste último favorece la disminución del pH en el medio y por lo tanto el crecimiento de los hongos. Para los medios sólidos se empleó agar noble (Anexo 3).

#### **b) Técnicas de aislamiento**

Las muestras hidratadas con medio BG11 líquido fueron empleadas para siembras por dilución. Las diluciones empleadas fueron 1:10; 1:100; 1:1000. Cada 100  $\mu$ L de las diluciones fueron depositados en cajas Petri con los medios de cultivo mencionados anteriormente. Las muestras fueron distribuidas en las placas con ayuda de perlitas de vidrio estériles.

Posteriormente se observó el crecimiento en las cajas inoculadas y se seleccionaron colonias en base a las diferentes morfologías coloniales y microscópicas observadas. Por ejemplo, si en el microscopio se observaron células verdes, así como la presencia de micelio o hifas, en las cajas se seleccionaron hongos y colonias verdes, además colonias bacterianas. Una vez seleccionadas las colonias, se prosiguió con las resiembras para el aislamiento de los microorganismos por estría.

Para el aislamiento de algas, de las siembras en medio sólido anteriormente mencionadas, se seleccionaron colonias de interés y fueron transferidas con ayuda

de tubos capilares estériles a botellas serológicas con medio líquido. Después del periodo de incubación (hasta que se observó una coloración verde en el medio) fueron sembradas en caja Petri con medio BG11 sólido. Las cajas inoculadas se incubaron a temperatura ambiente, por 1 semana expuestas a la luz blanca fluorescente fría de 40 W. Una vez observado el crecimiento en medio sólido las colonias aisladas fueron transferidas a tubos de ensayo con 5 mL de medio BG11 líquido con ignimbrita, e incubadas bajo las mismas condiciones. Finalmente se comprobó la pureza mediante siembras en medio sólido por estría (Ferris y Hirsch 1991).

### **c) Morfología colonial y celular**

Para los microorganismos aislados, inicialmente se llevaron a cabo observaciones macroscópicas de las colonias en las placas, con la finalidad de identificar algún tipo de crecimiento característico ó morfotipos. Posteriormente se llevó a cabo la observación de los mismos en el microscopio óptico (Nikon Optiphot-2 con cámara Leica DC300, USA).

Las bacterias se clasificaron por la composición de su membrana mediante tinción Gram (Madigan y col. 2006). El protocolo se muestra en Anexo 2. Las membranas teñidas de rojo fueron Gram negativas ya que tienen un bajo contenido de peptidoglicano, contrario a las bacterias Gram positivas que tiñen de morado ó azul.

Para los hongos se emplearon microcultivos en cubos de agar para observar el crecimiento micelial sin que éste se alterara (Anexo 2c). También se empleó azul de algodón para una mejor definición de las estructuras fúngicas. Para la observación

de algas, se tomaron muestras conservadas en glutaraldehído 2.5% (v/v), fijador primario que permite mantener intactas las estructuras celulares.

## **7.5.- Análisis molecular de muestras**

### **7.5.1.- Extracción de DNA metagenómico**

Después del almacenamiento de las muestras recolectadas a -20°C se prosiguió con la extracción de DNA según el protocolo del kit PowerSoil™ DNA Isolation (MO BIO Laboratorios, Inc. USA). El fundamento de la extracción se basa en la lisis celular por acción mecánica y química, el DNA extraído es capturado en una membrana de sílice, en donde por una serie de lavados se eliminan las impurezas y posteriormente el DNA es separado por afinidad de la molécula hasta un microtubo por elución empleando un buffer con baja concentración de sales. La cuantificación del DNA extraído (metagenoma) se llevó a cabo con un Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, USA). El metagenoma se observó no degradado y de alto peso molecular (Anexo 5).

### **7.5.2.- Amplificación por PCR de genes ribosomales de metagenomas**

La PCR es un método que nos permite amplificar el DNA en estudio, in vitro, con una enzima DNA polimerasa termotolerante que copia la molécula de DNA en una región específica, flanqueada por *primers* o iniciadores. En la Tabla 2, se muestran los primers iniciadores empleados para la amplificación de los genes ribosomales de la subunidad pequeña de cada dominio de interés. La preparación de cada reacción y

las condiciones de amplificación se muestran en el Anexo 4. Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador My Cyclor de BioRad (USA).

Tabla 2. Primers empleados para la amplificación por PCR en el análisis por DGGE de los sitios analizados.

Dominios o grupos	Primers	Secuencia	Longitud de fragmento	Referencia
Bacteria Región V3	Bac8f y Univ529r Gc-338f y Univ529r	5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' 5'ACCGCGGCKGCTGGC3' 5'CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGG GGCGGGGGCACGGGGGGCTACGG GAGGCAGCAG3' 5'ACCGCGGCKGCTGGC3'	520 pb 180 pb	Yu y Morrison 2004.  Turner y col. 1999
Cianobacterias Región V3-V5	CYA359f y CYA781r	5'GGGGAATYTTCCGCAATGGG3' 5'GACTAC(T/A)GGGGTATCTAATC CC(A/T)TT3'	422 pb	Nübel y col. 1997
Eukaryas Region V1-V3	Euk1A y GC-Euk516r	5'CTGGTTGATCCTGCCAG3' 5'CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGG GGCGGGGGCACGGGGGGACCAGA CTTGCCCTCC3'	528 pb	Brad y col. 2008

### 7.5.3.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Para corroborar la extracción de DNA metagenómico, DNA de aislados o para observar amplicones obtenidos por la PCR, fue necesario emplear electroforesis en geles horizontales de agarosa. Por éste procedimiento las moléculas cargadas migran en un campo eléctrico, según la carga y el tamaño de la molécula. Después de un tiempo de migración el gel es teñido con bromuro de etidio para visualizar las bandas con iluminación UV (Madigan y col., 2006). Los geles empleados fueron de agarosa al 1% (p/v) en amortiguador TBE (Tris base, ácido bórico y EDTA) al 0.5X.

El volumen de carga fue de 12 microlitros, divididos en 5  $\mu$ L de DNA, 5  $\mu$ L de agua y 2  $\mu$ L de colorante 6X (bromofenol 0.5% (p/v), xileno cianol 0.5% (p/v) y glicerol 70% (v/v)), para el caso de marcadores de peso molecular se mezclaron 8  $\mu$ L de agua, 1 ó 2  $\mu$ L de marcador (según las indicaciones del proveedor) y 2  $\mu$ L de colorante.

#### **7.5.4.- Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)**

Los productos de PCR fueron separados por DGGE para conocer la huella genómica de cada muestra. Este método nos permitió evaluar la diversidad de los microorganismos presentes en cada muestra a través de la separación de fragmentos de PCR en un gradiente desnaturalizante y del análisis del patrón de bandas obtenido. El DGGE se llevó a cabo en un sistema DCODE para DGGE de Bio-Rad, en donde la electroforesis se realizó por tiempo, voltaje y temperatura establecida. El porcentaje de acrilamida empleado fue el requerido según el tamaño del fragmento a separar, el gradiente de agentes desnaturalizantes (urea y formamida) nos sirve para una mejor separación de los componentes de las muestras. El protocolo detallado de DGGE se muestra en el Anexo 5, (Fischer y Lerman 1983; Myers y col. 1987).

#### **7.5.5.- Extracción de DNA de aislados y amplificación de los genes 16S/18S rRNA**

La extracción de DNA se llevó a cabo de 2 mL de cultivo líquido de cada aislado, empleando el Kit UltraClean Microbial DNA Isolation (MOBIO). La identificación molecular de las bacterias de interés se llevó a cabo mediante la amplificación del

16S rDNA, empleando los primers Bac8f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Para el dominio Eukarya se emplearon los siguientes *primers*; para hongos GC-Euk1A y Euk516, Para algas y levaduras, EukA (5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') y EukB (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'). La mezcla de reacción de PCR y condiciones de amplificación se muestran en Anexo 4 (Turner y col. 1999; Tamura y col. 2011).

#### **7.5.6.- Clonación de genes ribosomales e identificación de aislados**

Dos microlitros de productos de PCR purificados fueron clonados con el kit de ligación pGEM-T Easy Vector Systems (Promega), siguiendo el protocolo del fabricante. La reacción de ligación fue empleada para transformar células de *Escherichia coli* XL1 Blue y los clones recombinantes fueron seleccionados en medio sólido LB (marca SIGMA) que contenía ampicilina (100 µg mL<sup>-1</sup>), tetraciclina (15 µg mL<sup>-1</sup>), IPTG (0.1 mmol L<sup>-1</sup>) y X-Gal (0.05 mg mL<sup>-1</sup>). Colonias blancas fueron seleccionadas al azar para crecerlas 16 horas en medio LB conteniendo tetraciclina y ampicilina. Para extraer el plásmido se empleó el kit UltraClean Standard Mini Plasmid Prep (MoBio), siguiendo el protocolo del fabricante. Se llevó a cabo una reacción de PCR (25 µL) para verificar la presencia del inserto con los primers F24 (5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3') y R22 (5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'), (Anexo 4). Una vez obtenido el inserto de interés, se empleó el Kit Ultraclean PCR Clean-up de la marca MOBIO para su purificación. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con otras bacterias

usando la base de datos del Genbank, mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) <http://blast.ncbi.nih.gov/Blast.cgi>.

## **7.6.- Caracterización de microorganismos aislados**

### **7.6.1.- Producción de exopolímeros**

Para la detección de exopolímeros producidos por los aislados se emplearon tres colorantes específicos. Se seleccionaron colonias con más de 48 horas de crecimiento en medio sólido, las colonias fueron colocadas sobre portaobjetos y empleadas para las pruebas de nigrosina y azul alciano (Lamenti y col. 2000).

Una muestra de la colonia fue cubierta con tinta china o nigrosina al 1% (p/v) preparada en etanol al 95% y cubreobjetos. Éste tipo de tinción ha sido llamada negativa, ya que los polisacáridos no se tiñen con el colorante. Los polisacáridos repelen la carga negativa de la tinta. La prueba es positiva al observar un halo brillante alrededor de las células, en contraste con el fondo negro.

Otro colorante empleado para la identificación de polisacáridos fue el azul alciano al 1% (p/v) preparado en ácido acético al 3% (v/v) y ajustado a pH 2.5. Este es un colorante específico para mucopolisacáridos ácidos. La prueba es considerada positiva al observar el color azul alrededor de las células y negativa si el color es magenta.

Para la determinación de exopolímeros derivados de D-glucanos se empleó rojo congo (RC) en una concentración de 30 mg/L (Dick y col. 2006), agregado al medio



de cultivo sólido. Los exopolímeros secretados por los microorganismos normalmente adquieren la coloración roja, por lo que las colonias se ven de color rojo, la prueba es positiva si en las primeras 24 horas se observa esta coloración.

Para la determinación cuantitativa de exopolímeros, se realizó la determinación en los cuatro medios líquidos empleados en el experimento, con los tres aislados capaces de precipitar calcio como  $\text{CaCO}_3$ . El ensayo realizado fue el método de Friedman y col. (2001). Este ensayo se llevó a cabo con las muestras de cultivo bacteriano en la evaluación de la precipitación de  $\text{CaCO}_3$ . Los cultivos bacterianos fueron colectados una vez que alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento. Los cultivos fueron lavados con buffer PBS (pH 7.4) y resuspendidos en el mismo buffer para alcanzar una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0.2. El colorante RC fue adicionado en una concentración de 35 mg/L. La suspensión fue incubada a 30°C por 30 minutos con mezclado por inversión cada 10 minutos. Como control negativo se empleó el buffer PBS con el colorante. Las células fueron removidas por centrifugación a 14,000 rpm durante 5 minutos. Los sobrenadantes fueron medidos a  $\text{DO}_{480\text{nm}}$ . Una curva estándar de linealidad fue obtenida con concentraciones de RC entre 0.5 y 50 mg/L (Anexo 2d). La DO fue determinada con un espectrofotómetro Genesys 20 (Thermo Scientific, USA). Los colorantes empleados fueron grado reactivo de la marca Hycel.

### **7.6.2.- Precipitación de calcio**

La prueba de precipitación de calcio se realizó con base en los procedimientos descritos por Kiel y Gaylarde (2006) y Dick y col. (2006), para bacterias, hongos, algas y levadura aislados del segundo muestreo.

El método consistió en sembrar los microorganismos de interés en cajas Petri con medio sólido conteniendo un exceso de cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) a una concentración de 7.5 g/L. La prueba fue positiva cuando se observó alrededor de las colonias un precipitado blanco, para estas observaciones se empleó el microscopio estereoscópico. Como control se utilizó el mismo medio con exceso de calcio, pero sin la presencia del microorganismo.

La purificación y cuantificación de los cristales de  $\text{CaCO}_3$  se llevó a cabo aproximadamente después de dos semanas de observado el crecimiento colonial en medio sólido. Los cristales fueron colectados de la superficie del agar, lavados con agua estéril y secados 16 horas a  $60^\circ\text{C}$ . Los cristales secos fueron examinados por MEB, DEX y DRX.

Los cristales obtenidos de cultivo líquido fueron filtrados a través de filtros Whatman No. 41 (los filtros fueron llevados a peso constante a  $80^\circ\text{C}$  por 16 horas). Los precipitados obtenidos fueron secados a  $65^\circ\text{C}$  por 16 horas y posteriormente fueron pesados.

### **7.6.3.- Efecto de la urea y del calcio en la precipitación de $\text{CaCO}_3$**

Los aislados bacterianos que mostraron resultados positivos en precipitación de calcio en medio sólido fueron evaluados en medio líquido. Los medios de cultivo empleados fueron medio BG11 con peptona, glucosa y extracto de levadura (PGY), medio PGY con  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en una concentración de  $51.02 \text{ mmol L}^{-1}$  (PGY- $\text{Ca}^{2+}$ ), medio PGY con urea al 2% (PGY-Urea) y medio PGY con  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en una concentración de  $51.02 \text{ mmolL}^{-1}$  y urea al 2% (PGY-Urea- $\text{Ca}^{2+}$ ).

Al término de la cinética de crecimiento se tomaron alícuotas de cada condición y se determinó por peso seco el calcio precipitado como  $\text{CaCO}_3$  y el calcio soluble en el medio mediante la técnica de murexida (ASTM D 1126-92).

Para la determinación de calcio soluble en el medio de cultivo se tomó una alícuota del medio de 0.5 mL y se aforó a 5 mL con agua destilada como volumen final para su manejo, se agregaron 5 gotas de NaOH 4N para favorecer un pH básico (11 o 12) y permitir que la reacción de color se desarrollara, a la mezcla se le agregaron 50 mg del colorante preparado (murexida en  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ), esta muestra fue titulada con EDTA 0.01N hasta observar un vire de color rosa a magenta. Los millieq  $\text{L}^{-1}$  de calcio se obtuvieron empleando la fórmula que divide el producto de los mL de EDTA gastados por la normalidad de la solución por mil entre los mL de muestra empleados.

Para la determinación de  $\text{CaCO}_3$  precipitado se tomó una alícuota de 3 mL que fue filtrada a través de un papel Whatman #41, previamente llevado hasta peso constante en un horno de  $80^\circ\text{C}$ . La muestra en el filtro fue lavada con agua destilada, finalmente el filtro con la muestra se llevó nuevamente hasta peso constante en una estufa a  $65^\circ\text{C}$  por 16 horas (Ferrer y col. 1998; Zamarreño y col. 2009).

#### **7.6.4.- Producción de ácidos o cambios de pH**

Para evaluar la capacidad de los microorganismos para producir sustancias ácidas que pueden provocar cambios en el pH, se llevaron a cabo cultivos en medio líquido BG11, empleando 1% de glucosa (p/v) para bacterias y 2% de glucosa (p/v) para los hongos (Videla y col. 2003).

El pH del medio fue ajustado a 7.0 con NaOH 0.1N y los medios esterilizados con calor húmedo a 121°C por 15 minutos. Los cambios de pH fueron medidos respecto al tiempo cada 24 horas por 3 días (Videla y col. 2003) con ayuda de un potenciómetro. La prueba se consideró positiva si la diferencia de pH fue mayor a la observada en el medio de cultivo control en condiciones abióticas.

#### **7.6.5.- Actividad nitrogenasa**

La primera forma de evaluar la capacidad de algunos microorganismos para fijar nitrógeno atmosférico fue mediante el sembrado de éstos en medio BG11 sólido modificado (es decir medio libre de nitrógeno). Se sabe que el nitrógeno es un elemento indispensable para el crecimiento de cualquier microorganismo, sin éste no es posible el crecimiento, salvo cuando los microorganismos tienen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico. Las cajas inoculadas fueron incubadas en una cámara (desecador de vidrio con tapa y control de vacío) con gas nitrógeno, que se hizo pasar por el sistema por 15 minutos. La prueba fue entonces positiva al observar el crecimiento.

Después de la primera selección de microorganismos fijadores de nitrógeno se propuso llevar a cabo una segunda selección con sistemas de acetileno, específico para microorganismos que poseen el sistema nitrogenasa, capaz de transformar el acetileno ( $C_2H_2$ ) a etileno ( $C_2H_4$ ).

En botellas serológicas de 120 mL con 30 mL de medio BG11 modificado y una atmósfera del 10% de acetileno (v/v) de alta pureza, (gas marca PRAXAIR), los aislados de interés fueron inoculados y se evaluó la capacidad de transformar el

acetileno a etileno por cromatografía de gases (Madigan y col. 2006; Ohki y Fujita 1988). El equipo empleado fue un cromatógrafo de gases HP 5890 series II, con detector de ionización de flama, columna HP 624 (6% Cinanopropilfenil - 94% dimetil siloxano copolímero), de 30m de longitud, 0.32 mm de diámetro interno, 1.8 $\mu$ m de espesor de la fase estacionaria y con helio como gas acarreador. Las condiciones cromatográficas para el análisis fueron; inyector 200°C, horno 100°C y detector 220°C. Las botellas serológicas se incubaron a 30°C y 150 rpm.

### **7.7.- Experimentos en ambiente controlado**

Los bloques de ignimbrita (6cm X 6cm X 2cm) fueron esterilizados sumergiéndolos en etanol al 70% por 12 horas y posteriormente secados a 80°C por 36 horas. Los bloques fueron inoculados con cultivos bacterianos con 24 horas de crecimiento y depositados en palanganas de plástico estériles con tapa (Dick y col. 2006; Miller y col. 2008). Cada semana a lo largo de cuatro meses fueron humedecidos por aspersión de medio líquido PGY y medio PGY-Ca<sup>2+</sup> (51.02 mmol/L), en condiciones de esterilidad e incubados a 30°C. Posteriormente se tomaron muestras de 20 zonas seleccionadas en la superficie de los bloques, mediante bisturí estéril. Las muestras fueron evaluadas mediante MEB y DEX, se evaluó la resistencia a la ruptura de cada uno de los bloques mediante el empleo de un esclerómetro y se analizó la ignimbrita por DRX.

## 7.8.- Actividad ureasa

La actividad ureasa fue determinada para los tres aislados capaces de precipitar el  $\text{Ca}^{+2}$  como  $\text{CaCO}_3$ . La prueba se llevó a cabo por medición del amonio producido en la hidrólisis de urea de acuerdo con el ensayo Fenol-Hipoclorito (Natarajan 1995). Las mediciones se llevaron a cabo con los sobrenadantes del cultivo y se tomaron en diferentes intervalos de tiempo a la largo de la curva de crecimiento (Achal y col. 2010). Una unidad ureasa ha sido definida como la cantidad de enzima que hidroliza una micromol de urea por minuto.

La actividad ureasa fue determinada en aislados bacterianos bajo cuatro condiciones de crecimiento distintas. Los medios de cultivo empleados fueron; PGY, PGY- $\text{Ca}^{2+}$ , PGY-Urea y PGY-Urea- $\text{Ca}^{2+}$ . La urea y el cloruro de calcio fueron esterilizados por filtración y adicionados al final. Los sobrenadantes anteriormente obtenidos, a diferentes tiempos de crecimiento, fueron empleados para evaluar el consumo de urea, mediante la producción amonio por el ensayo fenol-hipoclorito (Natajaran 1995; Achal y col. 2010).

La proteína fue cuantificada por el método de Bradford (Bradford 1976), empleando el colorante azul de Coomassie G-250, de acuerdo a las condiciones descritas por el fabricante. Una parte del reactivo de Bradford fue diluido en cuatro partes de agua. Para la reacción se tomaron 200 uL del reactivo diluido y se mezclaron con 10 uL de la muestra, después de 10 minutos de iniciada la reacción, la muestra fue leída a  $\text{DO}_{595\text{nm}}$  en el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, USA). La

determinación de proteína fue empleada para valores específicos de la actividad ureasa.

### **7.9.- Análisis estadísticos**

Los datos de la prueba de resistencia a la ruptura fueron analizados mediante un análisis de varianza con el programa NCSS (2007, versión 1). Los árboles filogenéticos presentados para la comparación del análisis de bandas en los geles de DGGE, se obtuvieron con ayuda del programa Mega 5.2.2, mediante el método estadístico de distancia filogenética UPGMA.

## **8.- RESULTADOS Y DISCUSIONES**

El presente trabajo es pionero en evaluar el biodeterioro de patrimonio edificado construido con ignimbritas. Hasta ahora el deterioro de la Catedral de Morelia, había sido estudiado desde el punto de vista ingenieril, considerando solamente los daños provocados por factores ambientales (Alonso y Martínez 2003). Por otra parte en la Catedral de Morelia, desde hace ya más de 100 años se han llevado a cabo una serie de estrategias de mantenimiento y restauración que van desde aplicación de pintura hasta la sustitución de bloques de ignimbrita, por bloques nuevos con características similares a la ignimbrita usada en la construcción ([www.conaculta.gob.mx/turismocultural/destino\\_mes/morelia/](http://www.conaculta.gob.mx/turismocultural/destino_mes/morelia/)). Sin embargo tanto en la investigación como en el mantenimiento de la Catedral no se ha considerado la actividad microbiana sobre el deterioro de las rocas.

### **8.1.- Muestreos**

La capital Michoacana es conocida por mantener un clima templado con humedad media. La Figura 6 muestra las condiciones climatológicas, precipitación total y temperatura media, observadas en la Ciudad de Morelia entre los años 2001 y 2012 (Correa-García 2009; [www.smn.conagua.gob.mx](http://www.smn.conagua.gob.mx)). En la Figura 6 se indica con flechas los meses del año en los que se llevaron a cabo los muestreos del presente trabajo.



Como se puede ver en la Figura 6A en los meses de mayo a octubre se presenta la mayor precipitación pluvial en la ciudad. Es necesario recordar que se llevó a cabo un análisis preliminar para la inspección de la azotea e identificar cada uno de los sitios de interés. El no tomar muestras durante la temporada de lluvias fue una propuesta que consideró evitar el lavado de las superficies por la lluvia. La Figura 6B muestra las temperaturas promedio de la ciudad, como se observa en la gráfica, la mayor parte del año las temperaturas promedio se encuentran por arriba de los 20°C, característico de éste tipo de climas ([www.smn.conagua.gob.mx](http://www.smn.conagua.gob.mx)).

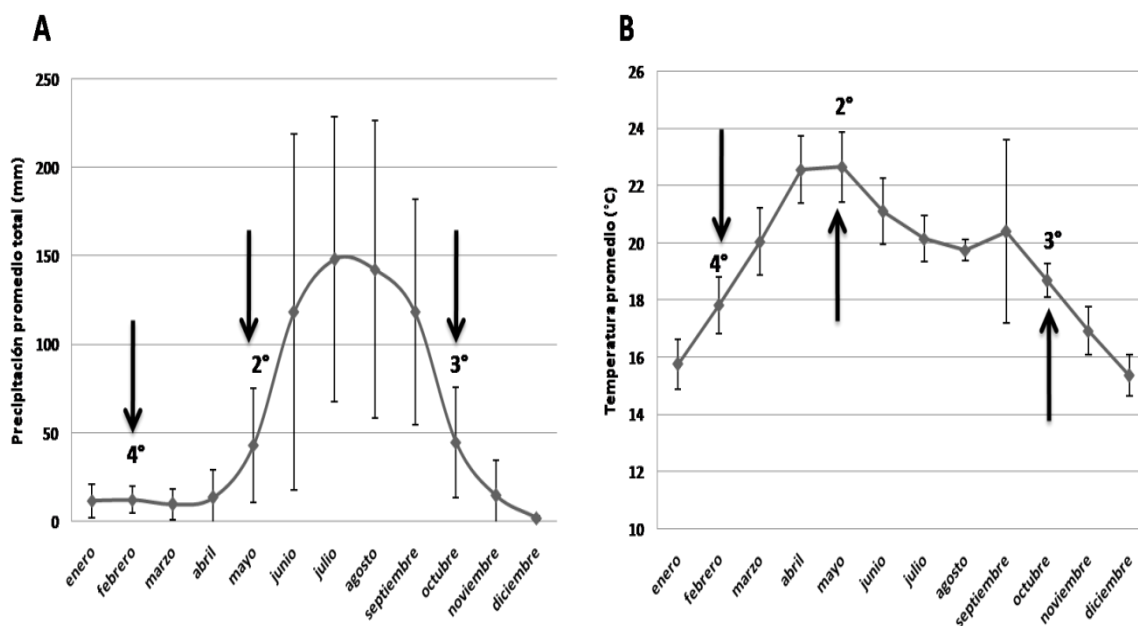


Figura 6. Condiciones climatológicas mensuales en Morelia entre los años 2001 y 2012. A) Precipitación promedio total. B) Temperatura media. ([www.smn.cna.gob.mx](http://www.smn.cna.gob.mx)). Las flechas indican los meses del año correspondientes a los tres muestreos, los números corresponden a; 2° = Segundo muestreo; 3° = Tercer muestreo y 4° = Cuarto muestreo.

La radiación solar es uno de los factores más importantes que se debe considerar en el deterioro de las construcciones, además de la temperatura y de la humedad (Feilden 1982). Estos dos últimos factores climáticos son considerados agentes que promueven el deterioro fisicoquímico de los materiales de construcción.

Los factores climáticos pueden generar ambientes internos en las construcciones provocando la presencia de microclimas, que involucran variaciones de la humedad relativa, generados por la exposición a la radiación solar. Esto provoca desbalances internos en los materiales y promueve su deterioro.

Cuando revisamos la construcción, se notó que la Catedral presenta, en todas sus caras laterales, sitios con manchas oscuras que corresponden a bajadas de agua de lluvia (Figura 7A<sub>2</sub>, 7B<sub>4</sub>, 7B<sub>7</sub> y 7D<sub>10</sub>) identificadas como líneas oscuras sobre la pared. Se observó lo mismo en sitios con poca pendiente (zonas en las cuales se puede acumular agua) como esquinas (7A<sub>1</sub>), ábaco en columna (7A<sub>3</sub>), cornisas (7B<sub>5</sub>, 7B<sub>6</sub> y 7D<sub>11</sub>) y algunos acabados. También se encontraron manchas de color verde en varios tonos, aparentemente líquenes, como se muestra en las Figuras 7C<sub>8</sub> y 7C<sub>9</sub> (tapete verde sobre pretil) y cúpula (7D<sub>12</sub>).

La presencia de manchas de color o pátinas sobre la superficie los materiales de construcción son el primer indicador de la presencia de microorganismos y de deterioro, por lo que se empleó como criterio para la selección de los sitios a muestrear. Hemos observado que cuando la humedad es continua, predominan las

cianobacterias mientras que cuando la humedad no es permanente, se observan líquenes.

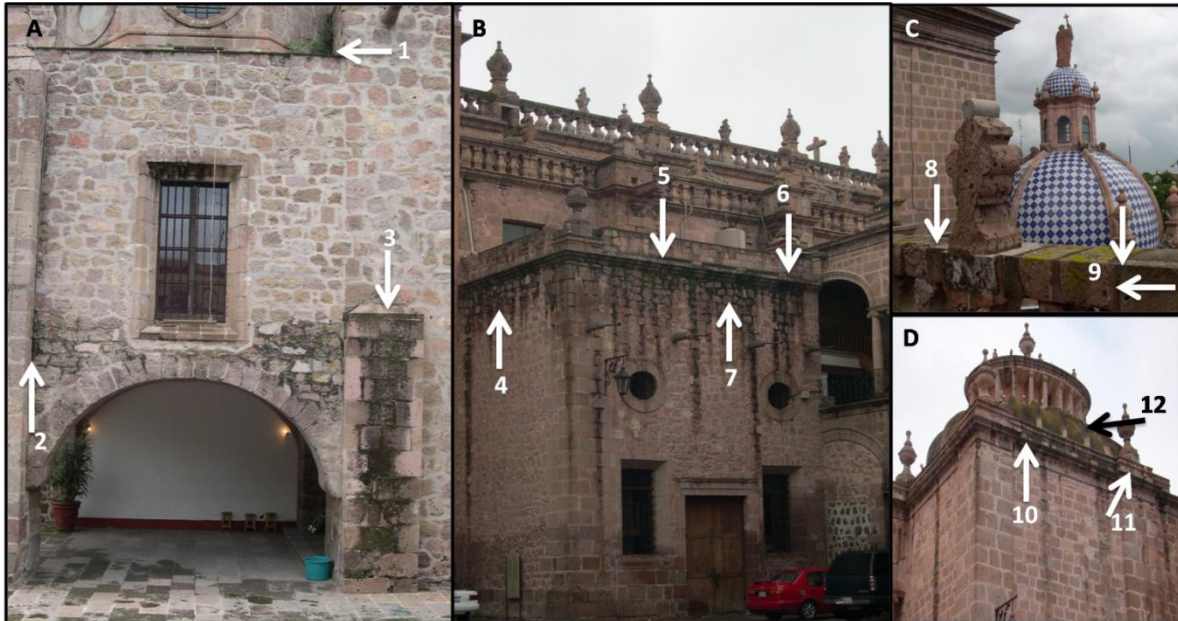


Figura 7. Evidencia de la presencia de manchas negras y de color en caras laterales de la Catedral en zonas de acumulación de agua. A) Entrada a las oficinas de la Catedral; B) Fachada trasera de la nave poniente (altar del sagrado corazón); C) Cúpula central de la Catedral; D) Fachada trasera de capilla de la sagrada familia. Las flechas señalan los sitios que presentaron cambios de color o pátinas y los números indican los sitios específicos descritos en el texto.

Las muestras obtenidas a lo largo de cada muestreo se resumen en la Tabla 3 presentada a continuación.

Tabla 3. Muestras obtenidas de la Catedral durante los 3 muestreos realizados. La nomenclatura corresponde a las 3 primeras letras del sitio (CAT de Catedral), seguidas por el número correspondiente al sitio muestreado (de 1 a 9) y el número del muestreo realizado; segundo (2°), tercero (3°) y cuarto (4°). Las X indican las muestras que no se tomaron en cada periodo.

Sitio	Descripción del sitio	Muestreos		
		2°	3°	4°
<b>CAT1</b>	Hoyo de pumicita en campanario	x	CAT13	CAT14
<b>CAT2</b>	Biopelícula en campanario	CAT22	CAT23	CAT24
<b>CAT3</b>	Biopelícula en arco	CAT32	CAT33	CAT34
<b>CAT4</b>	Biopelícula en torre de fachada derecha	CAT42	CAT43	CAT44
<b>CAT5</b>	Biopelícula en fachada central	CAT52	CAT53	CAT54
<b>CAT6</b>	Hoyos de pumicita en torres traseras	CAT62	CAT63	CAT64
<b>CAT7</b>	Mortero derecha	CAT72	CAT73	CAT74
<b>CAT8</b>	Mortero izquierda	CAT82	CAT83	x
<b>CAT9</b>	Hoyos en ventana central	CAT92	x	x

Como se puede observar en la tabla anterior, los sitios muestreados básicamente pueden dividirse en biopelículas y hoyos de pumicita obtenidos de ignimbritas y por otra parte los morteros encontrados en dos sitios, que fueron empleados para restaurar la base de los pretilos laterales de la azotea. Los morteros fueron empleados como medio de comparación. En efecto los morteros están constituidos principalmente por  $\text{CaCO}_3$  mientras que las ignimbritas son rocas con  $\text{SiO}_2$  como componente principal. El propósito de ésta comparación fue observar si existían similitudes o diferencias entre los microorganismos colonizadores y el biodeterioro entre éstos dos materiales pétreos.

A continuación en la Figura 8 se muestran las imágenes de cada uno de los sitios muestreados en la azotea de la Catedral durante los muestreos.

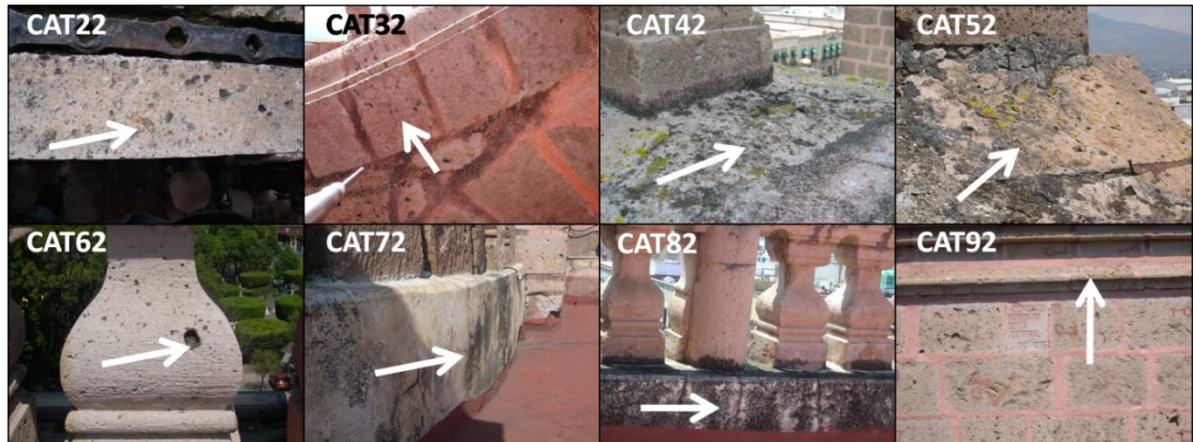


Figura 8. Sitios muestreados en la Catedral de Morelia. Las flechas señalan los sitios en donde fueron tomadas las muestras, durante los muestreos.

Los tres muestreos realizados a lo largo de 10 meses desde mayo del 2008 y hasta febrero del 2009, siempre fueron tomados en el mismo sitio y sus alrededores, lo cual aseguró la obtención de muestras similares en cada periodo estacional.

Los sitios etiquetados con CAT62 y CAT92 en la Figura 8, mostraron fácil desprendimiento de la superficie de la roca al momento del rascado, este tipo de superficies es conocida como hoyos de pumicita, ignimbrita extrusiva generada por flujos piroclásticos poco soldados, también conocidos como espumas piroclásticas, lo cual justifica su poca dureza. Otra muestra que presentó fácil desprendimiento al momento del rascado fue CAT32 ya que la superficie seleccionada se observaba con una gran cantidad de poros, sin ser un hoyo.

Los dos sitios correspondientes a morteros (CAT72 y CAT82) al momento de tomar las muestras presentaron prácticamente el desmoronamiento del material con solo tocar la superficie, todo el mortero empleado para la restauración en estos sitios se observaba cubierto con manchas de color negro, posiblemente melanina pigmento producido por hongos.

Los morteros empleados en los pretilos son conocidos como morteros de cal y arena y se emplean para la protección superficial de muros así como para la adhesión o unión de rocas. La figura CAT82 permite observar claramente que los morteros fueron los primeros colonizados, ya que en la base de las torres se puede apreciar una mancha negra que proviene de ellos.

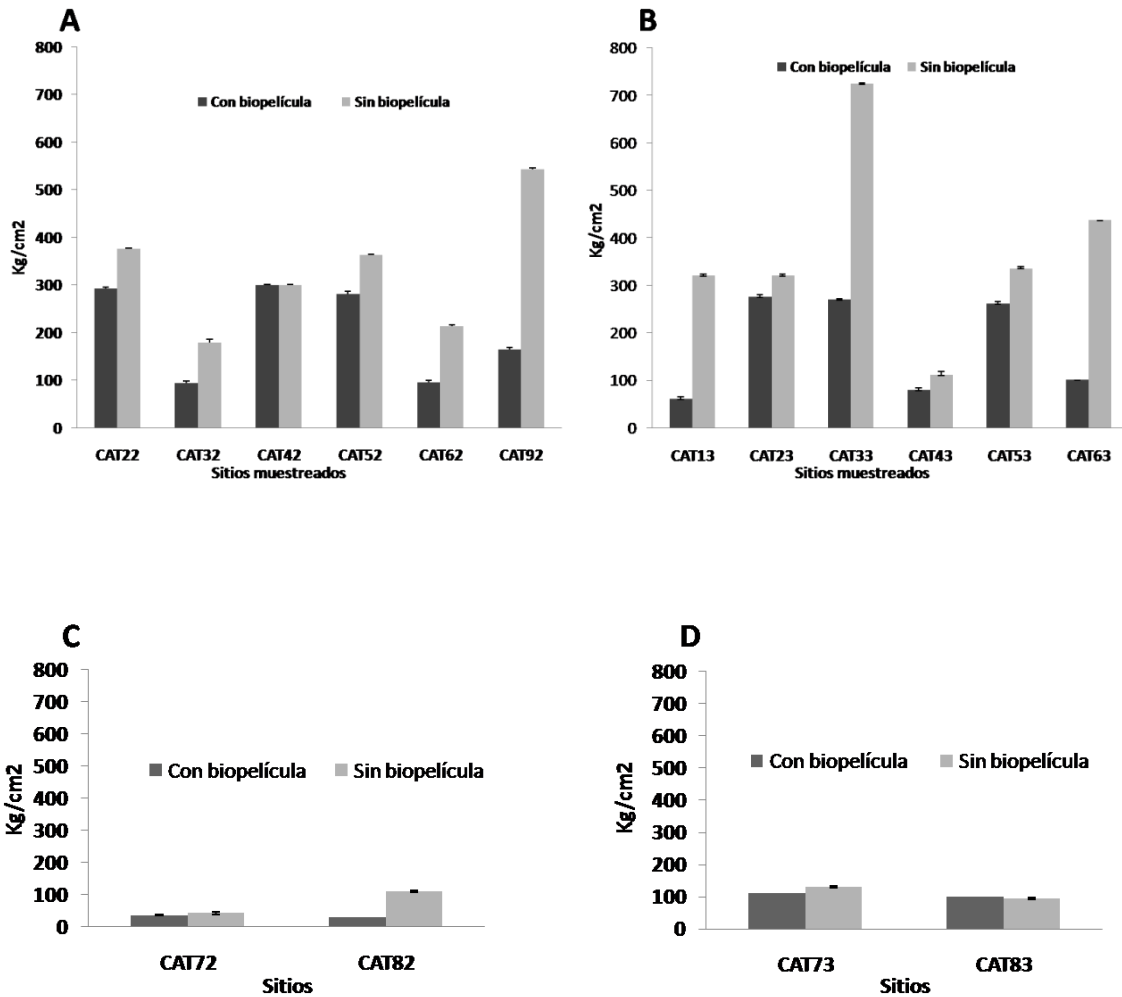
El desprendimiento de material pétreo debajo de las biopelículas muestreadas es indicador del deterioro del sustrato. La presencia de biopelículas favorece el deterioro de los materiales debido a que las asociaciones microbianas ahí presentes propician procesos mecánicos y bioquímicos que actúan sinérgicamente para alterar poco a poco la roca (Decho 2000).

## **8.2.- Caracterización de materiales y superficies**

### **8.2.1.- Resistencia a la ruptura**

Durante los muestreos dos y tres se llevó a cabo la evaluación de la resistencia a la ruptura en cada uno de los sitios muestreados. Esta prueba permitió conocer la fuerza que debe aplicarse en cada sitio analizado para conseguir fracturar la roca bajo las condiciones en las que se encuentra. Los puntos evaluados fueron aquellos

que presentaron biopelícula o pátinas comparado contra aquellos cercanos (alrededor, o un costado) que no las presentaban. Los resultados obtenidos se reportan en la Figura 9.



**Figura 9.** Evaluación de la resistencia a la ruptura en superficies de la Catedral con y sin biopelículas. A yB, segundo (izquierda) y tercer muestreo (derecha) en ignimbritas. C y D, segundo (izquierda) y tercer (derecha) muestreo en morteros.

En la Figura 9, observamos que los valores de resistencia a la ruptura obtenidos en cada uno de los sitios muestreados durante el segundo (Figura 9A) y tercer muestreo

(9B) presentan tendencias muy similares entre ellos. Se puede observar que en presencia de una biopelícula las ignimbritas requieren menor esfuerzo para su ruptura, comparado con los sitios sin biopelícula para cada caso. Las mayores diferencias entre los valores de esfuerzo para el mismo sitio se observan en los sitios CAT92, CAT33 y CAT63. Los sitios mencionados fueron hoyos en ventana central, biopelícula en arco y hoyos en torres, respectivamente. Encontramos que al momento de tomar las muestras en estos sitios, en especial estos tres, presentaron fácil desprendimiento de su superficie. Esto indica que la biopelícula en su superficie provoca que estos sitios sean los más frágiles.

Por otra parte solo el sitio CAT4 no presentó prácticamente ninguna diferencia en esta prueba y bajo las condiciones evaluadas, la tendencia se mantuvo en los dos muestreos realizados (CAT42 y CAT43). Este sitio corresponde a una biopelícula en la torre de la fachada central y encontramos que la mancha de color o biopelícula observada en el sitio se distribuía prácticamente en toda la zona, dejando algunos espacios limpios entre la biopelícula, estos espacios sin biopelícula aparente, fueron los evaluados en la prueba y podría ser la razón principal de no encontrar diferencias. Sugerimos que el sitio ya había sido afectado por estar totalmente rodeado de la biopelícula.

En general se observó que en presencia de una biopelícula el esfuerzo a la ruptura fue menor. Por lo tanto, pareciera que, se requiere de un menor esfuerzo para romper las superficies cubiertas de una biopelícula, lo cual indica que las biopelículas son indicadores de deterioro en la roca ya que favorecen la fragilidad de los



materiales de construcción (Ortega-Morales 2006; Gaylarde 2006; Shirakawa y col. 2011), en este caso de la ignimbrita y el mortero.

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) para saber si existían diferencias significativas entre los valores de resistencia a la ruptura en los sitios con y sin biopelícula, y así validar nuestra conclusión acerca del efecto dañino de las biopelículas sobre la ignimbrita. Con este análisis estadístico, se rechazó la hipótesis nula de igualdad entre las muestras con un nivel de significancia menor a 0.05. Esto indica que sí existen diferencias significativas entre los sitios evaluados con y sin biopelículas en la prueba de esfuerzo o resistencia a la ruptura.

La Figura 9C y 9D también muestra los resultados obtenidos de la prueba de esfuerzo a la ruptura pero en este caso para morteros, de igual manera que con la ignimbrita, se observa que en presencia de biopelícula el esfuerzo a la ruptura fue menor que cuando no hay una biopelícula. Se llevó a cabo una ANOVA para encontrar diferencias significativas entre las resistencias obtenidas. El análisis confirmó que solo existen diferencias significativas en los sitios CAT82 y CAT73, al comparar la presencia o ausencia de las biopelículas.

Se confirma al igual que con la ignimbritas que los sitios con biopelículas presentan una menor resistencia a la ruptura. Es importante destacar que en todas las ocasiones en que se recolectó la muestra, estos sitios mostraban pocos espacios sin biopelícula y prácticamente toda la restauración se observaba negra y débil al tacto.

También es necesario destacar que, los valores de la fuerza de compresión obtenidos en morteros se encuentran entre los rangos de 0 a 140 kg/cm<sup>2</sup>, esta fuerza

de compresión es significativamente menor al compararla con las fuerzas de compresión obtenidas para las muestras de ignimbritas, que se observan dentro del rango de los 50 a 700 kg/cm<sup>2</sup>. La justificación a este hecho sería la composición del material de construcción, uno hecho por el hombre y otro una roca.

Los morteros son empleados para la protección superficial y para la unión de rocas durante las construcciones, las ignimbritas son empleadas como material de construcción y soporte. La abundancia de calcio en el mortero favorece el metabolismo microbiano en el sitio. Debido a que se observó una superficie negra sobre prácticamente todo el mortero, destacamos la posibilidad de la presencia de hongos en este lugar. La presencia de hongos ha sido considerada un factor deteriorogénico para los materiales de construcción, ya que son capaces de taponar poros, generar estrés mecánico y daño estético principalmente por la producción de colorantes y producción de ácidos que pueden disolver el material empleado (Gaylardey col. 2003; Capitelli y col. 2007b). Los resultados aquí presentados apoyan la hipótesis de que los morteros son el origen de la colonización microbiana y favorecen la colonización de la ignimbrita por contacto o cercanía con éste material.

### **8.3.- Análisis de superficies**

#### **8.3.1.- Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

De los fragmentos de roca (ignimbrita) obtenidos en el segundo muestreo, se logró observar la interfase entre la roca y la biopelícula, así como diversas formas de

crecimiento y morfologías bacterianas. Las micrografías correspondientes se presentan a continuación en la Figura 10.

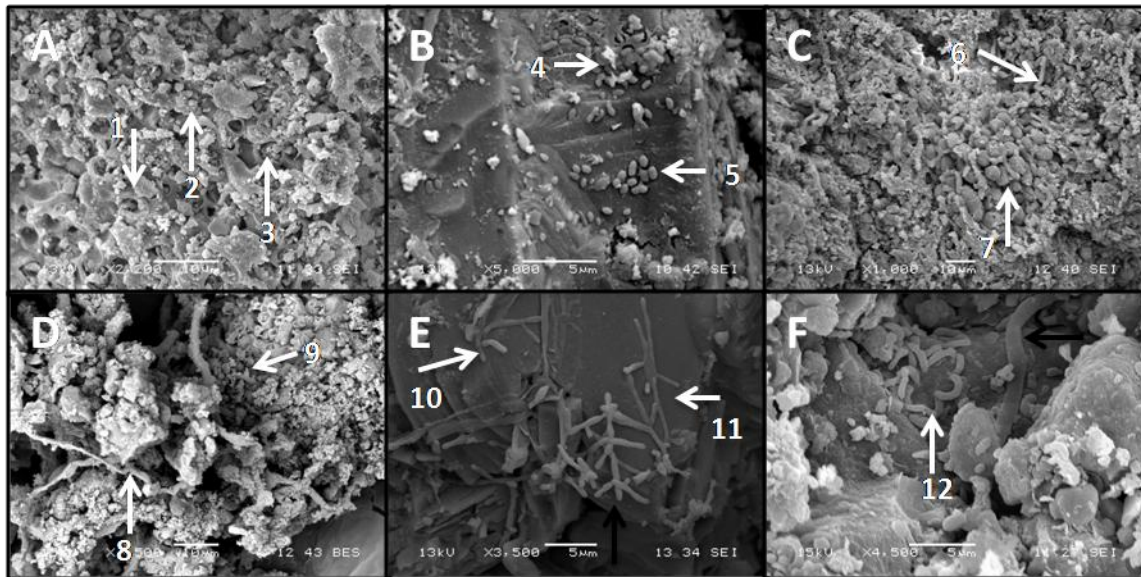


Figura 10. Micrografías MEB de muestras de la Catedral tomadas durante el segundo muestreo. A) Muestra CAT22, B) Muestra CAT32, C) Muestra CAT42, D) Muestra CAT52, E) Muestra CAT62, y F) Muestra CAT92. Las flechas señalan la ubicación de microorganismos.

La observación de las muestras por MEB permitió comprobar la presencia de células embebidas o dentro de los poros de la roca (Figura 10A<sub>1</sub>, 10A<sub>2</sub> y 10A<sub>3</sub>) y el crecimiento bacteriano sobre la roca (Figura 10B<sub>5</sub>), además de la presencia de polímeros que favorecen la adhesión de las células bacterianas a la superficie de la roca (Figura 10B<sub>4</sub>).

También observamos la presencia de estructuras cocoidales reportadas como cianobacterias, embebidas en una matriz (Figura 10C<sub>7</sub>), en donde podemos destacar la presencia de estructuras filamentosas que permiten el agrupamiento de las cianobacterias (Figura 10C<sub>6</sub>), tal como lo reportado por De los Ríos y col., (2004).

También fue posible observar la presencia de hifas en microfracturas (Figura 10D<sub>8</sub> y 10D<sub>9</sub>) y lo que puede considerarse pseudomicelio en la Figura 10E<sub>10</sub> y 10E<sub>11</sub>, además de diversas estructuras bacterianas como bacilos y posibles vibrios como se observan en la Figura 10F<sub>12</sub>.

El examen de resistencia a la ruptura en las ignimbritas aunado a la presencia de microorganismos observados es consistente con el mayor deterioro de la roca en las zonas con biopelículas. Los microorganismos presentes pueden ocupar los espacios vacíos de los poros, provocando su taponamiento y posteriormente la ruptura (daño físico) de la roca, la producción de polímeros extracelulares por diversos microorganismos favorece el anclaje de más bacterias en la superficie de la misma y su desarrollo. El crecimiento sobre la roca a su vez permite la retención de agua lo cual incrementa la humedad en la superficie y junto con la producción de pigmentos, favorecen la presencia de manchas de color o pátinas (daño estético). La generación de productos de desecho del metabolismo microbiano como ácidos o álcalis, pueden inducir la biosolubilización (daño químico) de la roca y liberar iones como Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> utilizados en el metabolismo microbiano. Las comunidades microbianas presentes en las biopelículas actúan sinérgicamente para el mantenimiento de la misma, pudiendo emplear los elementos encontrados en la roca para su beneficio, lo que provoca el biodeterioro del material de construcción (Jroundi y col. 2010; Miller y col. 2012).

### **8.3.2.- Dispersión energética de rayos X (DEX)**

Se llevó a cabo un análisis elemental en muestras de ignimbrita sana, roca intacta sin biopelícula, obtenida de bloques de ignimbrita empleados para la restauración de la

Catedral, (Alonso y Martínez 2003) y en las seis muestras recolectadas durante el segundo muestreo.

Se encontró que la ignimbrita sana ésta constituida principalmente por elementos como el oxígeno, aluminio, sodio y sílice. El resultado de DEX sugiere que los posibles compuestos que integran a la ignimbrita sana son la albita y el cuarzo como lo descrito por Alonso y Martínez (2003). En la mayoría de las muestras, de CAT22 a CAT92, se encontraron cuatro tipos distintos de superficies en cada sitio muestreado: roca blanca (F), roca lisa (R), polvo de roca (Z) y cristales (C). La Figura 11 muestra un ejemplo de estas superficies.

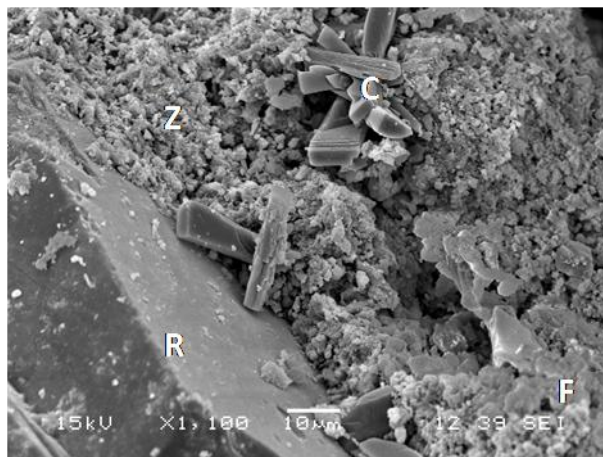


Figura 11. Micrografía de tipos de superficies observadas en muestras de ignimbritas cubiertas por biopelículas. La imagen corresponde a la muestra CAT52. Cristales (C), roca blanca (F), roca lisa (R) y polvo de roca (Z).

Los análisis elementales realizados fueron puntuales y por triplicado sobre cada una de las superficies mencionadas arriba. Estos análisis revelaron la presencia de oxígeno, sílice, aluminio, carbono, sodio y calcio como principales elementos

presentes en estas superficies. La mayoría de las muestras con biopelículas (CAT22, CAT32, CAT42, CAT52, CAT62 y CAT92) presentaron roca blanca, roca lisa, polvo de roca y cristales. En la ignimbrita sana o control solo fue posible observar roca blanca y polvo de roca. La estructura cristalina solo fue encontrada en las muestras CAT22, CAT32 y CAT52.

El porcentaje de calcio observado en la ignimbrita sana para estas estructuras fue en promedio menor a 1% comparado con el 7% en promedio para las demás muestras. Es decir que las muestras de los sitios analizados contenían 7 veces más calcio que la ignimbrita sana y los análisis por DEX mostraron que en los sitios CAT22, CAT32 y CAT52 los cristales encontrados estaban compuestos por calcio, carbono y oxígeno, sugiriendo que el compuesto probable fue el  $\text{CaCO}_3$ , como se mencionó anteriormente los cristales no fueron observados en la ignimbrita sana. La formación de  $\text{CaCO}_3$  puede deberse a la biosolubilización de la ignimbrita, es decir el secuestro de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en la estructura de la roca y su posterior precipitación como  $\text{CaCO}_3$ , posiblemente por biomineralización. La composición elemental de los tres sitios con cristales se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición elemental de cristales observados en las muestras CAT22, CAT32 y CAT52. Los valores mostrados se expresan en porcentaje de cada elemento detectado por DEX.

Elemento	C	O	Ca	Al	Si
<b>CAT22</b>	27.4	43.4	12.8	2.9	15.9
<b>CAT32</b>	32.6	42.3	29.2	0.7	1.3
<b>CAT52</b>	23.8	33.3	5.6	5.6	35.9

Como se observa en la Tabla 4, la composición elemental de los cristales fue carbono, oxígeno, aluminio, sílice y calcio. El principal compuesto detectado en las muestras fue  $\text{CaCO}_3$ . La presencia de estructuras cristalinas, como  $\text{CaCO}_3$ , en muestras expuestas al deterioro ambiental y microbiano y no en la ignimbrita sana podría ser un indicador del deterioro en el material de construcción (Alonso y Martínez 2003). La presencia de microorganismos en la superficie de las rocas puede favorecer la disolución de la misma y permitir el secuestro de iones de sus sitios de unión, esto mediante la hidratación de los iones. Una vez que los iones se encuentran libres, las bacterias pueden emplearlos para procesos metabólicos y favorecer el proceso de cristalización que provoca cambios volumétricos en las rocas y esfuerzo en los poros, generando el desmoronamiento. Este tipo de daño ingenierilmente es considerado intemperismo del material de construcción. En este trabajo se propone que no solo las condiciones ambientales son las responsables de cambios químicos o físicos en las rocas. Mediante la identificación de capacidades específicas en los microorganismos aislados que se presentan más adelante, mostramos la posible participación microbiana en el deterioro de la ignimbrita.

### **8.3.3.- Difracción de rayos X (DRX)**

Se realizó el análisis de la composición mineral por DRX de las muestras obtenidas en el segundo muestreo y de muestras de ignimbrita sana, empleada como control para evidenciar cambios en esta roca.

Se emplearon difractogramas de minerales plagioclastas o aluminosilicatos, como la andesita ((Na,Ca), (Si,Al) $_4$ O $_8$ ), labradorita ((Ca,Na) Al(Al,Si) Si $_2$ O $_8$ ), bitownita ((Ca,Na)

( $\text{Si,Al}_4\text{O}_8$ ), anortita ( $(\text{Ca,Na})(\text{Al,Si})_2\text{Si}_2\text{O}_8$ ) y albita ( $\text{Na}(\text{Si}_3\text{Al})\text{O}_8$ ) además del cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ), como referencias para encontrar los patrones espectrales característicos presentes en la ignimbrita sana de acuerdo a lo reportado por Marshall (1935) y Alonso y col. (1998). Como componente principal de la ignimbrita sana, se encontró el cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ) en fase cristalina hexagonal, la anortita, bitownita y albita (Tabla 5). La Tabla 5 muestra el resumen de los componentes minerales determinados por DRX, tanto en muestras control; bloques de ignimbrita sanos (sin biopelícula) y las muestras obtenidas durante el segundo muestreo en Catedral. Los bloques de ignimbrita sanos fueron piezas de ignimbrita de 6cm X 6cm X 2cm, obtenidos de ignimbritas sanas de canteras cercanas a Morelia, bloques 1 (color blanco) y bloques 2 (color rosa), éstos fueron empleados como control, ya que no habían sido empleado para la construcción.



Tabla 5. Composición mineral de muestras y controles obtenida por DRX para muestras del segundo muestreo.

MUESTRA	CUARZO SiO <sub>2</sub>	ALBITA (Na; Ca) {Si <sub>3</sub> Al}O <sub>8</sub>	ANORTITA (Ca; Na) {Al, Si} <sub>4</sub> O <sub>8</sub>	BITOWNITA (Ca, Na) {Al, Si} <sub>4</sub> O <sub>8</sub>	TRIDIMITA {ortorrómbica} SiO <sub>2</sub>	CRISTOBALITA {tetragonal} SiO <sub>2</sub>	CALCITA CaCO <sub>3</sub>
Bloques 1	✓	✓	✓	✓	✓	x	x
Bloques 2	✓	✓	✓	✓	x	x	x
CAT22	✓	✓	✓	✓	✓ <	✓	✓ >
CAT32	✓	✓	✓	✓	✓ >	✓	✓ >
CAT42	✓ >	✓	✓	✓	✓	✓	✓
CAT52	✓	✓	✓	✓	✓ >	✓ >	✓ >
CAT62	✓ <	✓ >	✓ >	✓	✓ >	✓ >	✓
CAT92	✓	✓	x	✓	✓	✓	✓

En la Tabla 5 la ✓ indica la presencia del compuesto, la x ausencia del compuesto, el signo menor que (<) y mayor que (>) indican una mayor o menor proporción del compuesto en la muestra.

La Tabla 5 presenta los componentes minerales que integran a cada muestra y permite confirmar que para el caso de las muestras tomadas del segundo muestreo, la presencia de cristobalita y tridimita confirman la desvitrificación de la ignimbrita. La desvitrificación se refiere al metamorfismo del cristal, en este caso tanto la tridimita, cristobalita y cuarzo, están constituidos por SiO<sub>2</sub>, sin embargo, la principal diferencia entre ellos consiste en su arreglo espacial. En las muestras control prácticamente solo está presente el cuarzo hexagonal, pero en las muestras de los seis sitios analizados, encontramos también cristobalita y tridimita, cristales que indican el

cambio de forma hexagonal a tetragonal y ortorrómbica, respectivamente. Lo que indica reacomodos o cambios rotacionales del cristal probablemente debidos a las condiciones ambientales a las que se encuentran expuestas las construcciones en estudio a lo largo del tiempo (Ostrooumov, 2001).

El difractograma con el perfil de picos característicos de la ignimbrita sana, se muestra en la Figura 12.

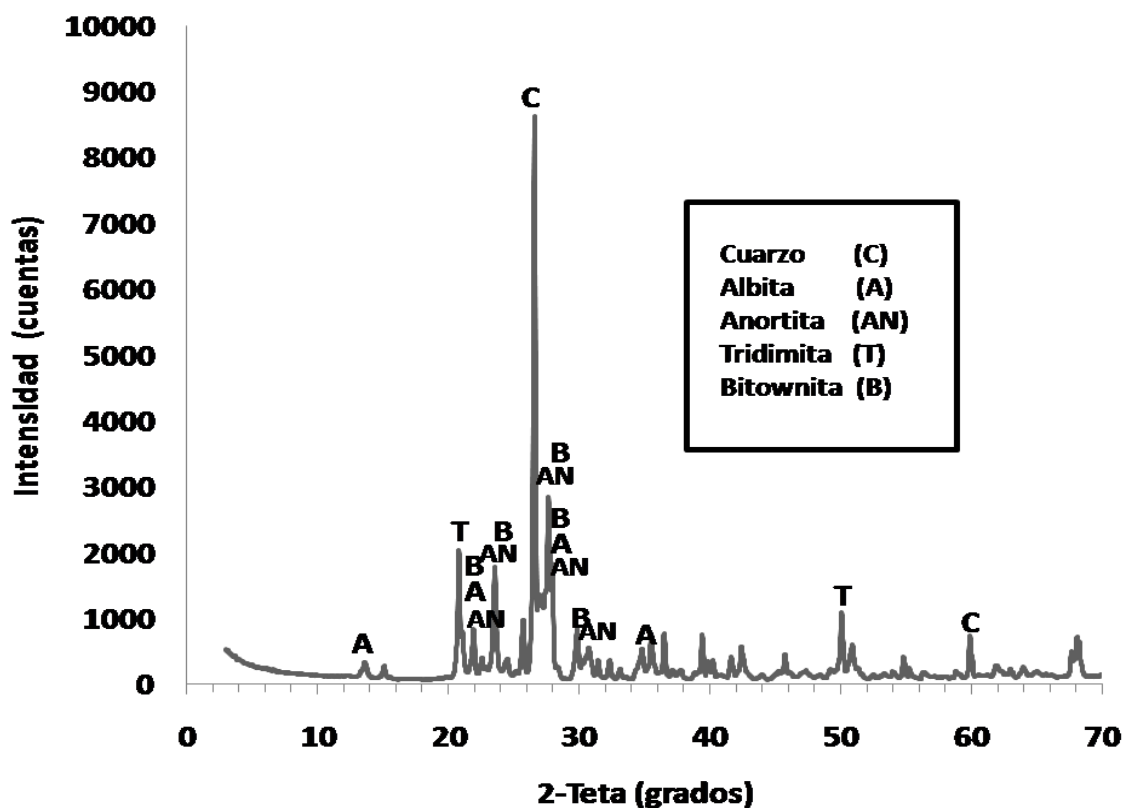


Figura 12. Difractograma de rayos X de polvo de ignimbrita sana. Se observa la presencia de los componentes principales de la ignimbrita sana: el cuarzo, la albita, anortita, bitownita y tridimita.

Como ya se mencionó anteriormente el cuarzo fue el principal componente de la ignimbrita, pero además se identificaron otros minerales, como anortita y bitownita.

Este hecho se justifica ya que la bitownita es una interespecie de la anortita para las plagioclastas, como la ignimbrita evaluada en este trabajo (Ostrooumov 2001).

Es importante destacar que la ignimbrita sana no contiene calcita ( $\text{CaCO}_3$ ) como parte de su estructura, la calcita es parte de los componentes considerados indicadores de deterioro en esta roca (Alonso 2002). La Figura 13 muestra los picos característicos para la calcita. Se observan los picos de calcita en los valores 30, 36 y 42 de los grados 2-Teta además de los componentes típicos de la ignimbrita.

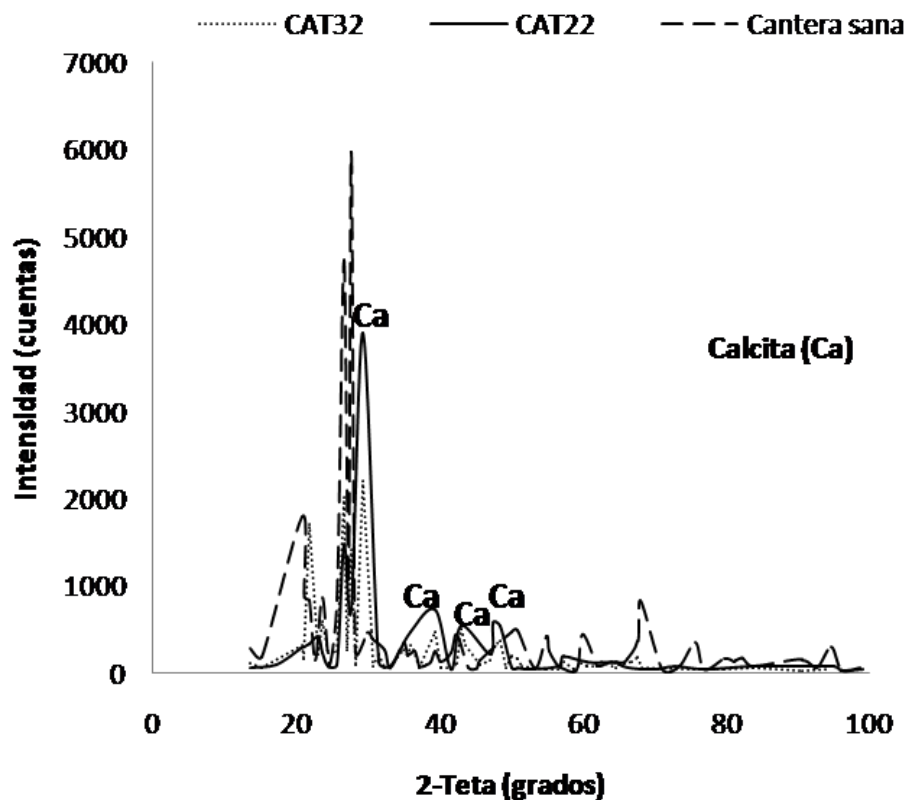


Figura 13. Difractograma de muestras de los sitios CAT22, CAT32 e ignimbrita sana. Se señalan los picos característicos de la calcita (Ca) no observados en el control (ignimbrita sana).

En todas las muestras de Catedral fue posible observar la presencia de calcita ( $\text{CaCO}_3$ ) la cual es un indicador de deterioro en la roca. Las muestras CAT22, CAT32 y CAT52 mostraron mayor abundancia de este mineral como se describe en la Tabla 5. Esta información reafirma que el incremento de calcio observado en el análisis elemental se debe probablemente a la formación de calcita y que el calcio es posiblemente obtenido por biosolubilización de la anortita, uno de los componentes de la ignimbrita.

Finalmente queda claro que la calcita fue el componente observado como indicador de deterioro en todas las muestras intemperizadas. Los minerales plagioclastas del grupo de los feldespatos propuestos como parte de la estructura de la ignimbrita se resumen en tres; albita, anortita y bitownita. Estos minerales podrían haber sido biosolubilizados por los microorganismos, haciendo disponibles algunos elementos como el calcio, lo cual explicaría la formación de calcita a partir del calcio liberado (Herrera y col. 2004; Nuhoglu y col. 2006).

#### **8.3.4.- Espectroscopia de infrarrojo (IR)**

Se llevó a cabo el análisis de cada una de las muestras obtenidas en Catedral durante el segundo muestreo por IR. Los espectros obtenidos permitieron identificar ciertos grupos funcionales, observados en longitudes de onda características (tensiones) de cada uno de esos grupos. En las muestras CAT22, CAT32, CAT52, CAT62 y CAT92 se encontró la huella del carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ), con tensiones alrededor de  $1700\text{ cm}^{-1}$ , además de la presencia de un pico intenso cercano a  $1000\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al enlace sencillo entre carbono y oxígeno ( $\text{C}-\text{O}$ ). Estos dos picos no

fueron observados ni en la ignimbrita sana ni en la muestra CAT42. La presencia de grupos carbonilo puede ser un indicador de la presencia de carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) o bicarbonatos ( $\text{HCO}_3^-$ ).

La presencia de carbonatos en las muestras intemperizadas es un posible indicador de deterioro ya que podría indicar la formación de  $\text{CaCO}_3$ . El  $\text{CaCO}_3$  ha sido observado en biomineralización. Este mineral se encuentra naturalmente en 5 formas cristalinas: las fases anhidras (calcita, aragonita y vaterita) y las fases hidratadas (monohidrocalcita  $\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e ikaite  $\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). El  $\text{CaCO}_3$  es precursor de complejos de calcita e indicador de deterioro en rocas (Radha y col. 2010).

El análisis de las muestras de ignimbrita por las diferentes técnicas mencionadas arriba, destaca la presencia de elementos minerales como el sodio y el calcio principalmente. Autores como McCormack (1996) han reportado que el calcio puede ser desplazado de su matriz binaria por un mecanismo de intercambio de iones que involucra amonio y magnesio. La liberación de iones como sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio podrían usarse como índice de biodeterioro en construcciones o edificios en general.

La liberación de elementos iónicos de las rocas es conocida como biosolubilización y puede llevarse a cabo debido a la presencia de ácidos orgánicos que indiquen un descenso en el pH. Estos ácidos orgánicos pueden ser generados por bacterias y hongos presentes en biopelículas o costras. La capacidad acidificante de los microorganismos sugiere que uno de los mecanismos de biodeterioro podría estar vinculado con un ataque ácido de la estructura de la roca teniendo como resultados la solubilización de los elementos estructurales del mineral (Videla y col. 2003).

#### 8.4.- Estudios de biorreceptividad de la ignimbrita

Se llevó a cabo la caracterización de los bloques de ignimbrita para determinar su bioreceptividad. La bioreceptividad es definida como las propiedades de los materiales de construcción que contribuyen a la estabilización o anclaje de una comunidad microbiana. Este término se ha empleado para evaluar a los materiales de construcción y seleccionarlos. Se evaluaron las propiedades intrínsecas de la ignimbrita en condiciones de laboratorio como se describió en materiales y métodos (Papida y col. 2000).

Tabla 6. Evaluación de características físicas y químicas de ignimbritas, bloques 1 (color blanco) y bloques 2 (color rosa).

Muestra	Humedad Actual (%)	Densidad Roca (g/cm <sup>3</sup> )	Densidad Grano (g/cm <sup>3</sup> )	Porosidad (%)	Contenido Agua (%)	Volumen Geométrico (cm <sup>3</sup> )
<b>BLOQUES 1</b>						
<b>1</b>	0.436	1.237	1.693	31.915	25.782	68.4
<b>2</b>	0.205	1.486	2.1412	35.888	24.135	72
<b>3</b>	0.719	1.345	2.4225	36.805	27.347	72
<b>Promedio</b>	0.454	1.357	2.086	34.870	25.755	70.8
<b>Desviación estándar</b>	0.257	0.125	0.368	2.6	1.606	2.078
<b>BLOQUES 2</b>						
<b>1</b>	0.722	1.391	1.937	34.659	24.909	69.62
<b>2</b>	0.787	1.495	2.313	29.172	19.511	69.62
<b>3</b>	0.785	1.443	2.014	35.880	24.850	69.62
<b>Promedio</b>	0.765	1.443	2.087	33.238	23.091	69.62
<b>Desviación estándar</b>	0.037	0.052	0.199	3.573	3.1	0

El pH promedio obtenido para los bloques de ignimbrita blancos fue de  $7.18 \pm 0.21$ , mientras que para los bloques de ignimbrita el pH promedio fue de  $6.39 \pm 0.12$ . Los

valores de porosidad obtenidos para los bloques de ignimbrita en ambos casos fue de alrededor del 30% lo que nos indica que se trata de rocas medianamente porosas, en general la máxima porosidad observada en rocas es del 50% (Sanders 1998).

### 8.5.- Microscopia óptica

Las muestras de los tres muestreos realizados, fueron observadas bajo el microscopio óptico con bajo aumento (40x) para detectar posibles estructuras características de los microorganismos presentes en la biopelícula. En la Figura 14 se presentan algunos ejemplos de las estructuras observadas, como hifas, vainas fúngicas, esferas tipo anacystos y microalgas (Madigan y col. 2006).

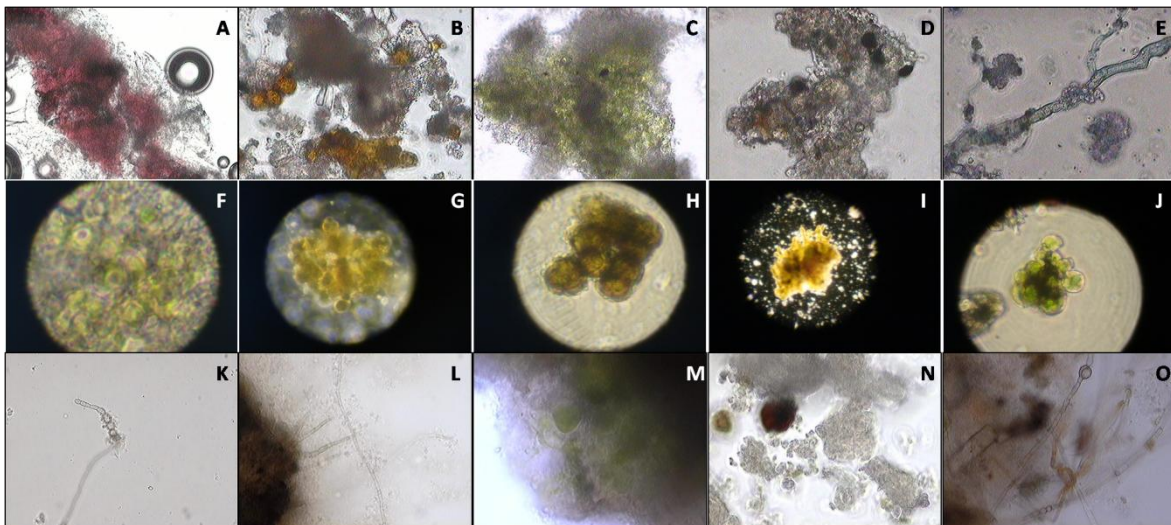


Figura 14. Estructuras microbianas observadas en el microscopio óptico, preparaciones en fresco de biopelículas con un aumento 40X. De A a E, segundo muestreo; F a J, tercer muestreo y K a O, cuarto muestreo. Los sitios correspondientes fueron CAT2, CAT3, CAT42, CAT5 y CAT6 de izquierda a derecha para cada muestreo.

En la Figura 14 se observa principalmente la presencia de microalgas o cianobacterias (imágenes A, B, C, D, F, G, H, J, M y N). En particular, se observan estructuras esféricas verdes y cafés, en algunos casos con núcleo definido. Las imágenes E, K, L y O muestran estructuras típicas de hongos, como hifas con esporas.

Las morfologías fúngicas encontradas fueron típicas de hongos filamentosos, ya que se observaron vainas no septadas (Figura 13E), así como hifas aéreas y conidios (Figura 13 K y L) que forman cuerpos fructíferos en forma de árbol (Madigan y col. 2006).

La tinción con azul de algodón fue empleada para identificar estructuras fúngicas en cada muestra original. Se llevó a cabo la tinción de Gram de las biopelículas muestreadas y se observó abundancia de bacterias Gram positivas ya que alrededor del 90% de las bacterias presentes en las muestras se tiñeron de azul-morado (Figura 15).

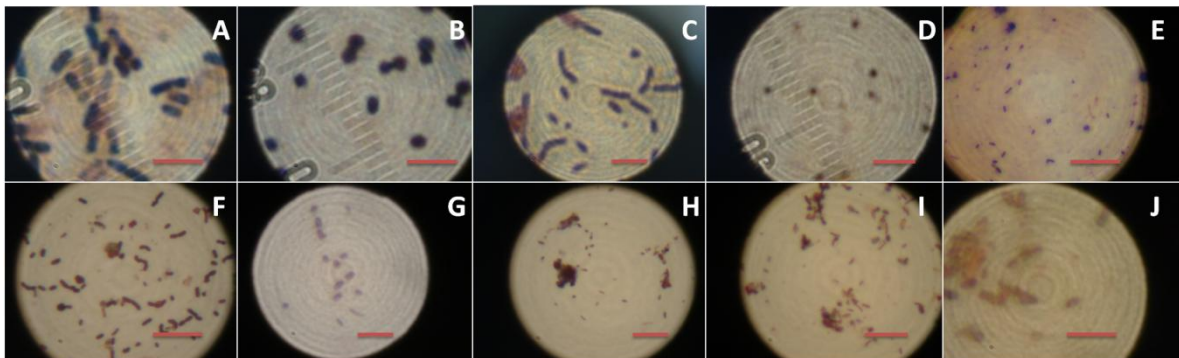


Figura 15. Tinciones Gram de muestras de biopelículas. A-E, segundo muestreo. F-J, cuarto muestreo. Los sitios correspondientes fueron CAT2, CAT3, CAT42, CAT5 y CAT6 de izquierda a derecha para cada muestreo. Las observaciones se llevaron a cabo con aumento 100X. Las líneas corresponden a 5 micras.



Diversos autores han reportado que, en general la colonización microbiana de rocas, se inicia con una variedad de microorganismos fototróficos, cianobacterias y algas. Esta biomasa acumulada usualmente se encuentra embebida en una biopelícula enriquecida con sustancias orgánicas e inorgánicas y factores de crecimiento. La acumulación de biomasa fotosintética provee de una excelente base de nutrientes orgánicos para la colonización por organismos heterótrofos (Tiano 2002; Tomaselli y col. 2000; Ortega-Morales 1999).

### **8.6.- Presencia de pigmentos fotosintéticos**

Como ya se ha mencionado en antecedentes, la formación de una biopelícula sobre materiales de construcción depende de los colonizadores primarios, es decir algas y cianobacterias, microorganismos observados en las muestras del presente trabajo. Para cuantificar la presencia de algas o cianobacterias en nuestras muestras, como una referencia del grado de colonización se empleó la clorofila a como biomarcador (Schuman y col. 2005). Para esto se llevó a cabo la extracción de pigmentos fotosintéticos en muestras del segundo, tercer y cuarto muestreo, como se describió en la sección de materiales y métodos. Posteriormente, se cuantificó la clorofila a que es un pigmento característico de cianobacterias y algas (Falkow 1992).

Los espectros obtenidos corroboraron la presencia de clorofila a con picos característicos a 680 y 430 nm, además de un pico para carotenoides a 480 nm. En la Tabla 7 se muestran las concentraciones de clorofila a obtenidas.

Tabla 7. Concentraciones específicas de clorofila a. Las unidades son; mg de clorofila a sobre mL de extracto por gramo de muestra de biopelícula.

Sitio	Clorofila a (mg/mL*g)		
	2°	3°	4°
<b>CAT22</b>	24.72	324.98	57.367
<b>CAT32</b>	18.45	42.35	39.398
<b>CAT42</b>	42.21	43.83	25.130
<b>CAT52</b>	71.70	139.26	81.977
<b>CAT62</b>	15.33	66.93	4.166
<b>CAT92</b>	10.93		

La Figura 16 muestra una variedad de tonos verdes y café, provenientes de las muestras de ignimbrita colonizada o con presencia de biopelícula, los extractos obtenidos fueron empleados para la cuantificación de clorofila a, los tonos café podrían corresponder a la presencia de carotenoides o ficobilinas característicos de microalgas y cianobacterias, respectivamente (Madigan y col. 2006).

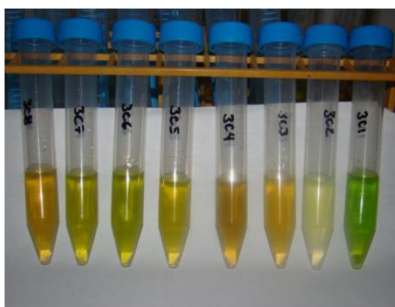


Figura 16. Extractos de pigmentos de microorganismos fotosintéticos obtenidos a partir de muestras de biopelículas de Catedral. La imagen muestra los extractos obtenidos en las muestras del tercer muestreo.

La presencia de estos pigmentos, además de las observaciones al microscopio óptico 40x, evidencia la presencia de microorganismos fotosintéticos. La presencia

de este tipo de organismos depende de factores ambientales como la disponibilidad de agua, el pH del medio, el clima o temperatura, la fuente de nutrientes, así como la composición mineral de la roca, su porosidad y permeabilidad. Tomados en conjunto, estos parámetros permiten definir la biorreceptividad de una roca (Prieto y Silva 2005; Prieto y col. 2006; Arino y Saiz-Jimenez 1995), que se define como el potencial de colonización de una roca. La ignimbrita ha sido poco estudiada en cuanto a biodeterioro y este es uno de los primeros estudios realizados, en donde se conocen los microorganismos colonizadores.

## **8.7.- Análisis molecular**

Para el análisis molecular de las muestras obtenidas a lo largo de los muestreos, inicialmente se llevó a cabo la extracción de DNA de cada una de ellas, seguido de la obtención de amplicones por PCR y el análisis de poblaciones microbianas por DGGE. Los perfiles de bandas obtenidos fueron posteriormente analizados estadísticamente por el método de distancia filogenética UPGMA como se describe en la sección de materiales y métodos.

### **8.7.1.- Extracción de DNA metagenómico**

De la extracción de DNA total de cada una de las muestras colectadas en Catedral, se obtuvo DNA no degradado y de alto peso molecular (Anexo 5). El DNA total de muestras ambientales es también llamado metagenoma. La cantidad de muestras empleadas para la extracción fue de entre 150 y 400 mg. Las concentraciones de

DNA obtenidas variaron desde los 0.4 hasta los 25 ng/uL con relaciones de pureza 260/280 muy cercanas a 1.8 en la mayoría de los casos (Anexo 5).

### **8.7.2.- Amplificación de dominios específicos por PCR**

Para los metagenomas de las muestras del segundo muestreo, se llevó a cabo la amplificación de fragmentos específicos de los genes ribosomales de la subunidad pequeña de los dominios *Bacteria* y *Eukarya*, así como de los grupos de cianobacterias. Se utilizaron como controles positivos cepas de microorganismos pertenecientes a cada uno de estos dominios o grupos. Para el dominio *Eukarya* se empleó a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el alga *Chlorella protothecoides*. Para cianobacterias, se utilizó a *Spirulina maxima*, esta última no fue un cultivo axénico, ya que se encontraba contaminada con bacterias, sin embargo se aseguró que fuera la única cianobacteria presente en el cultivo. Para el dominio *Bacteria* se empleó *E. coli*. Para hongos las especies fueron *Trametes versicolor*, *Penicillium pinophyllum* y *Phanerochaete chrysosporium*.

#### **a) Dominio *Bacteria***

Para la obtención de amplicones del dominio *Bacteria* se utilizó una estrategia de PCR anidado. Para ello, se llevó a cabo primero la amplificación de una región universal del gene 16S rRNA de 520 pb con los *primers* Bac8f y Univ529r. El amplicon de 520 pb se observa en la figura 17A, a la altura de la segunda banda del marcador, que corresponde a 500 pb. Una vez conseguido éste fragmento, se amplificó la región V3 de este mismo gene con una longitud de 180 pb utilizando los

primers gc-338f y Univ529r. Los amplicones de 180 pb se observan en la figura 17B al medio de las dos primeras bandas del marcador en el gel.

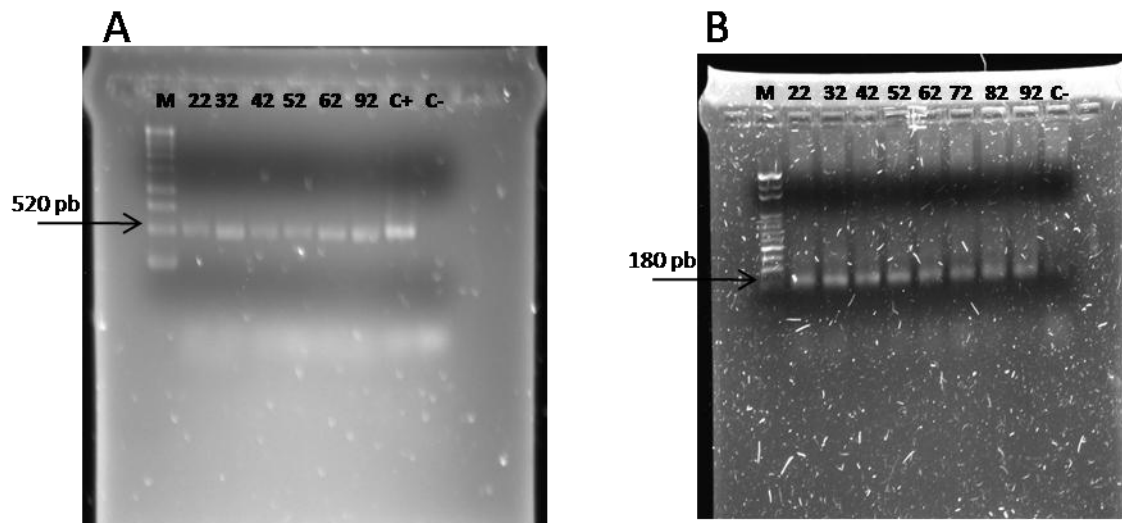


Figura 17. Análisis por electroforesis en geles de agarosa de amplicones de 520 y 180 pb, para el dominio *Bacteria*. En A) se utilizó el marcador de peso molecular 1 kb y en B) el marcador 100 pb. Control positivo (C+) *E. coli* y control negativo (C-) reacción sin DNA. Los sitios muestreados se numeran del 22 al 92.

## b) Cianobacteria

Un grupo bacteriano de especial interés fueron las cianobacterias debido a que forman parte de los colonizadores primarios en muchas biopelículas subaéreas. Para su estudio, se llevó a cabo la amplificación de la región V3-V5 del gene 16S rRNA de cianobacterias con los primers específicos GC-CYA359f y CYA781r, obteniéndose productos de PCR de 422 pb (Figura 18).

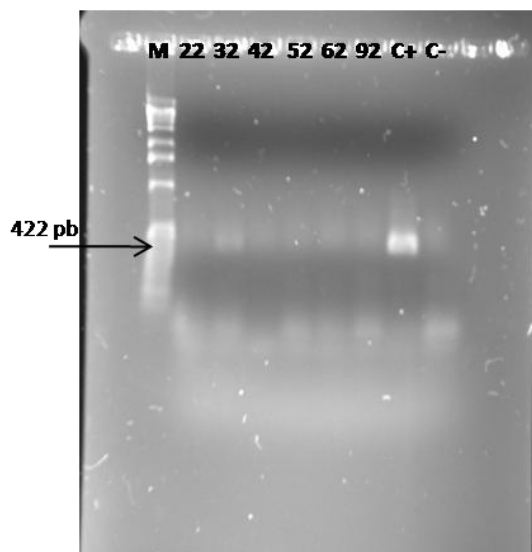


Figura 18. Análisis de electroforesis en gel de agarosa de amplicones de 422 pb para el grupo cianobacteria de muestras de Catedral, segundo muestreo de 22 a 92. Se empleó el marcador de peso molecular de 100 pb. Control positivo (C+) *Spirulina maxima* y control negativo (C-) reacción sin DNA.

### c) Dominio *Eukarya*

Para la amplificación de fragmentos del dominio *Eukarya* se emplearon los primers

Euk1Af y Gc-Euk516r para amplificar la región V1-V3 del gene 18S rRNA,

obteniéndose amplicones de 528 pb (Figura 19).

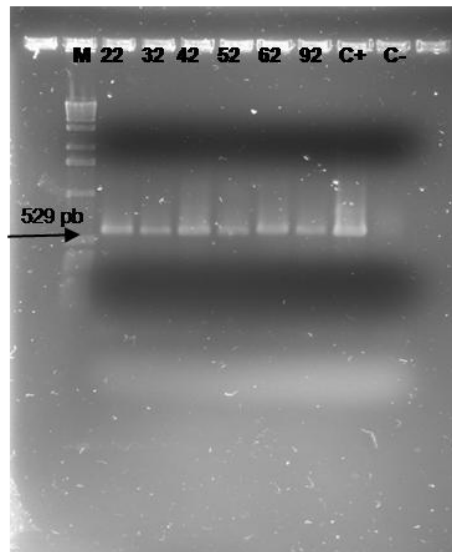


Figura 19. Análisis de electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR para el dominio *Eukarya* de muestras Catedral segundo muestreo de 22 a 92. Control positivo (C+) *Chlorella protothecoides* y control negativo (C-) reacción sin DNA. El marcador empleado fue de 1kb.

#### d) Hongos

En la amplificación de fragmentos para hongos, inicialmente se llevó a cabo la reacción de PCR con las cepas control mencionadas anteriormente, para la reacción se usaron los primers NS1f y Gc-Fungr. La Figura 20A muestra los productos de PCR de 370 pb obtenidos con los controles. Como se observa en este gel, las bandas son muy definidas y claras. Se llevó a cabo la obtención de amplicones para las muestras del segundo muestreo bajo las mismas condiciones (Figura 20B).

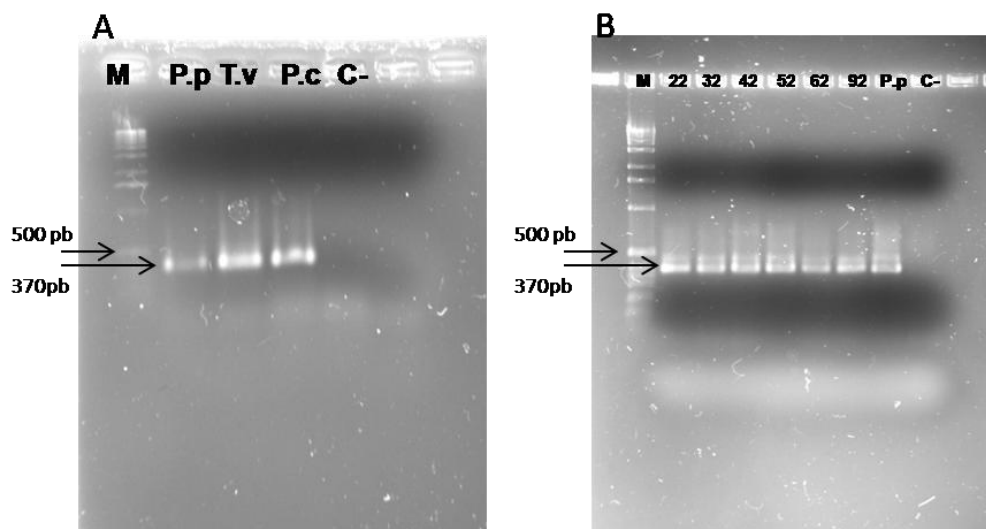


Figura 20. Análisis de electroforesis en gel de agarosa de amplicones de 370 pb para hongos. A) Productos de PCR de cepas control, las cepas empleadas fueron *Phanerochaete chrysosporium* (P.c), *Trametes versicolor* (T.v) y *Penicillium pinophylum* (P.p), el control negativo (C-) reacción sin DNA. B) Productos de PCR para obtención de amplicones para hongos de muestras del segundo muestreo de los sitios 22 al 92, el marcador empleado fue 100 pb.

Como se puede observar en la Figura 20B, los amplicones obtenidos para las muestras analizadas mostraron dobles bandas, incluyendo el control positivo (*Penicillium pinophylum*), por esta razón se llevó a cabo un gradiente de temperaturas de alineación de 50 a 60°C, ya que en la literatura se encontró que para los primers empleados en esta amplificación, las temperaturas de alineación usadas fueron desde los 50 y hasta 58°C (Das y col. 2007; May y col. 2001), para estas pruebas el DNA empleado fue *P. pinophylum*.

El gradiente de temperaturas mostró que las posibles temperaturas de alineación para la obtención de una sola banda podrían ser entre 52 y 55°C (Figura 21A). Una vez seleccionadas estas temperaturas se realizó un nuevo gradiente, en esta ocasión con 52, 53, 54 y 55°C y con ocho concentraciones de magnesio (de 1.5 a 5.0 mM



con incrementos de 0,5 mM) para cada temperatura. El DNA empleado en estas pruebas fue de *P. pinophylum* (Figura 21B).

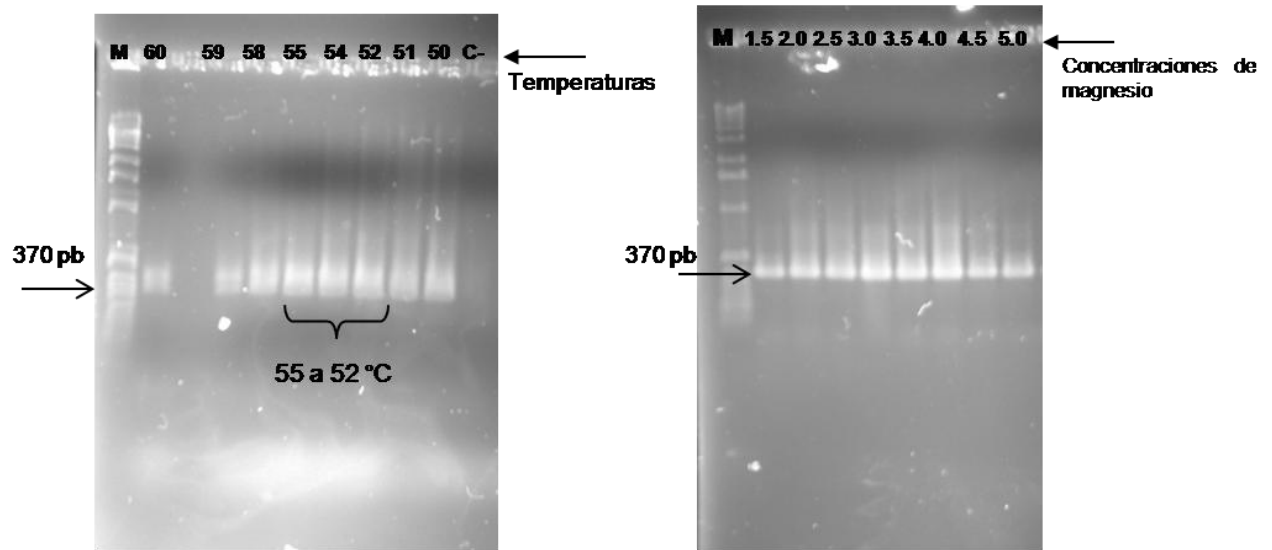


Figura 21. Análisis de electroforesis en gel de agarosa de amplicones de 370 pb para hongos. A) Amplicones obtenidos por gradiente de temperaturas de alineación. B) Amplicones obtenidos a 55°C con ocho concentraciones diferentes de  $MgCl_2$  (mM) El marcador empleado fue 1kb.

Con el segundo gradiente de temperaturas, se consiguió seleccionar la temperatura de 55°C como temperatura de alineación óptima y una concentración de 2.5 mM de magnesio (Figura 21B). Una vez establecidas estas condiciones se prosiguió a la obtención de amplicones para las muestras del segundo muestreo. En la Figura 22 se muestran los amplicones obtenidos para estas muestras, como podemos observar bajo estas condiciones sólo se amplifica una banda en cada muestra.

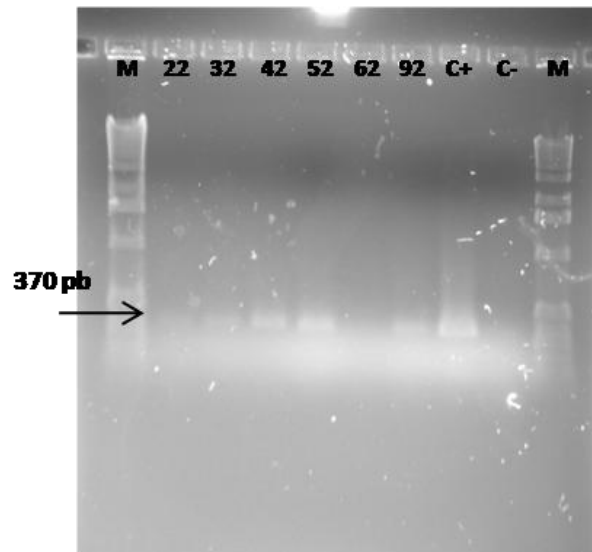


Figura 22. Análisis de electroforesis en gel de agarosa de amplicones de 370 pb para hongos. Los sitios analizados fueron del 22 al 92, el control positivo (C+) fue *P. pinophylum* y el control negativo (C-) reacción sin DNA. El marcador empleado fue 100 pb.

Finalmente se consiguieron los amplicones deseados para el análisis de comparación de poblaciones entre cada uno de los sitios muestreados del segundo periodo, mayo 2008. El hecho de haber podido amplificar secuencias de interés para cada dominio o grupo descrito anteriormente, nos asegura la presencia de éstos microorganismos en las biopelículas muestreadas.

### 8.7.3.- Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

#### a) Dominio *Bacteria*

Los amplicones obtenidos para el dominio *Bacteria* fueron separados por DGGE, para conocer la composición y estructura de la comunidad bacteriana presente en las muestras. Para un mejor análisis comparativo de las poblaciones bacterianas en las diferentes muestras, se llevó a cabo la obtención de dendrogramas con el programa MEGA 5.2.2, lo cual permitió evidenciar las similitudes y diferencias entre los sitios analizados.

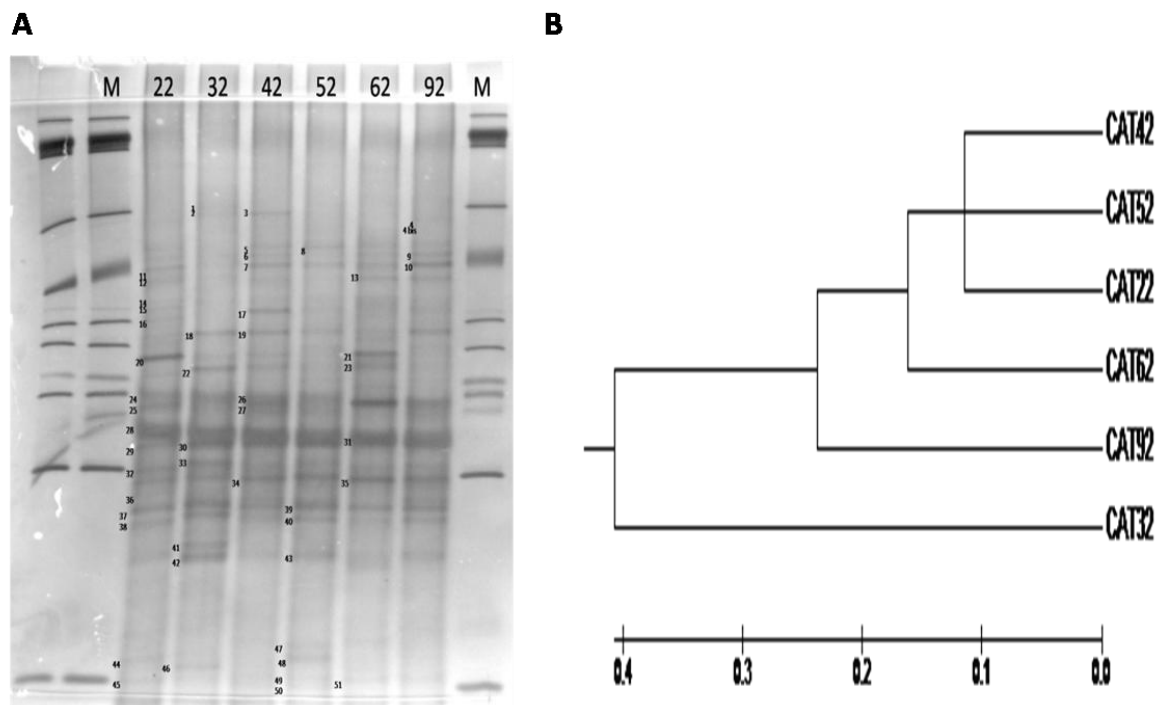


Figura 23. Análisis de la composición de bacterias en las biopelículas presentes en muestras de ignimbrita de Catedral (CAT), segundo muestreo. Sitios 22, 32, 42, 52, 62 y 92. A) Gel de acrilamida en donde los dos primeros carriles y el último fueron empleados como referencia para mantener una línea horizontal con ayuda del marcador 100 pb. B) dendrograma de las mismas muestras obtenido por el método de agrupamiento UPGMA.

La Figura 23 muestra la imagen del gel de DGGE obtenido para el dominio *Bacteria* (Figura 23A) y el dendrograma correspondiente (Figura 23B). Los seis carriles centrales corresponden a muestras de Catedral (CAT) del segundo muestreo para todos los sitios muestreados de CAT22 hasta CAT92. Los patrones de bandas observados muestran la similitud que existe entre la mayoría de los sitios muestreados ya que se pueden observar numerosas bandas comunes entre las diferentes muestras. Aunque en algunos casos la intensidad de las bandas fue diferente entre sitios como es el caso de las bandas 22, 41 y 42 que se observan con mayor intensidad en el sitio CAT32.

Se observan tres grupos de bandas que prácticamente permanecen en todas las muestras, estos grupos se encuentran en la parte media baja del gel. El primer grupo lo forman las bandas 5, 6, 7 y 8 que se encuentran constantes para todas las muestras a excepción del sitio CAT32. El segundo grupo incluye a las bandas 24, 25, 26, 27, 28 y 30, pero en esta ocasión este patrón no es observado para los sitios CAT62 y CAT92, aquí es de interés destacar que las muestras CAT62 y CAT92 fueron las únicas que se tomaron de hoyos de pumicita y está podría ser la principal razón de la falta de este patrón de bandas. El tercer patrón de bandas observado incluye la 32, 33, 34, 35, 37 y 38 que fueron encontradas en todos los sitios, lo que indica la misma composición bacteriana en las muestras.

La observación del perfil de bandas obtenidas por DGGE nos permite indicar que los sitios CAT32, CAT62 y CAT92 son los que presentaron la mayor diferencia entre ellos y que los sitios CAT22, CAT42 y CAT52 son los más similares según la huella observada para cada caso.

El dendrograma obtenido por método de UPGMA, nos dio a conocer que el sitio con menor similitud fue el CAT32 y que el grupo más similar incluye a los sitios CAT22, CAT42 y CAT52.

Estas técnicas nos permiten concluir a priori que los sitios del segundo muestreo con mayor similitud fueron el CAT22, CAT42 y CAT52. En todos los casos se trata de biopelículas oscuras y con una superficie bien consolidada. El sitio CAT22 fue el más distante entre ellos, ya que éste se tomó de uno de los campanarios y las muestras CAT42 y CAT52 de la azotea. Sin embargo, como se describe páginas más adelante al comparar los aislados obtenidos en estos sitios, el CAT22 y CAT52 presentan la mayor coincidencia en el tipo de bacterias aisladas de ellos.

## **b) Cianobacteria**

Una vez conseguidas las amplificaciones de la región V3-V5 del gene 16S rRNA de cianobacterias, se prosiguió con la separación de los amplicones mediante DGGE bajo las mismas condiciones que para el dominio *Bacteria*. El perfil de bandas y las similitudes entre las muestras se observan a continuación en la Figura 24.

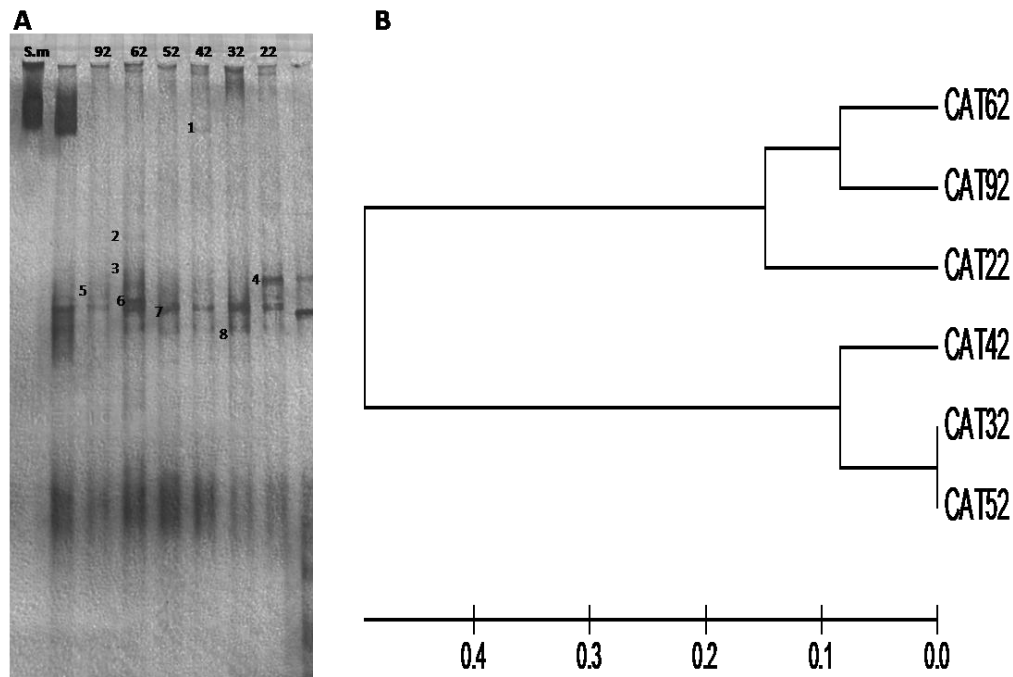


Figura 24. Análisis de la composición de comunidades de cianobacterias presentes en muestras de ignimbrita de Catedral (CAT) de los sitios 22, 32, 42, 52, 62 y 92. Se empleó la *Spirulina maxima* (S.m) como referencia en el gel. A) Patrones de bandas obtenidas por DGGE. B) dendrograma obtenido por el método de agrupamiento UPGMA.

El perfil de bandas generado por los primers específicos para cianobacterias (Nübel y col. 1997) permite observar la composición y estructura de las comunidades de cianobacterias en las muestras de ignimbrita deteriorada.

Las bandas observadas en los patrones de cianobacterias fueron escasas y solo se observó la coincidencia de la banda 7 en las seis muestras comparadas. La banda 1 solo fue observada para el sitio CAT42 y las bandas 2 y 3 solo fueron encontradas en el sitio CAT62. La cantidad de bandas observado coincide con lo reportado por Nübel y col. (1997) para tapetes microbianos y muestras ambientales, en donde ellos

presentan no más de 7 bandas por muestra. Ortega-Morales (2006), reportó que en construcciones mayas la diversidad de cianobacterias en biopelículas se encuentra alrededor de 10 especies.

El dendrograma presenta dos grupos diferentes en las seis muestras, el primer grupo se representa por las muestras CAT22, CAT62 y CAT92 compuesto por una biopelícula en superficie firme y dos hoyos de pumicita. El segundo grupo se compone por las muestras CAT32, CAT42 y CAT52 que son biopelículas en arco, con fácil desprendimiento y dos de superficie firme, respectivamente.

### **c) Dominio *Eukarya***

Una vez obtenida la amplificación de fragmentos para el dominio *Eukarya* se procedió a la separación de éstos por DGGE. La Figura 25 muestra el perfil de bandas obtenido para este dominio.

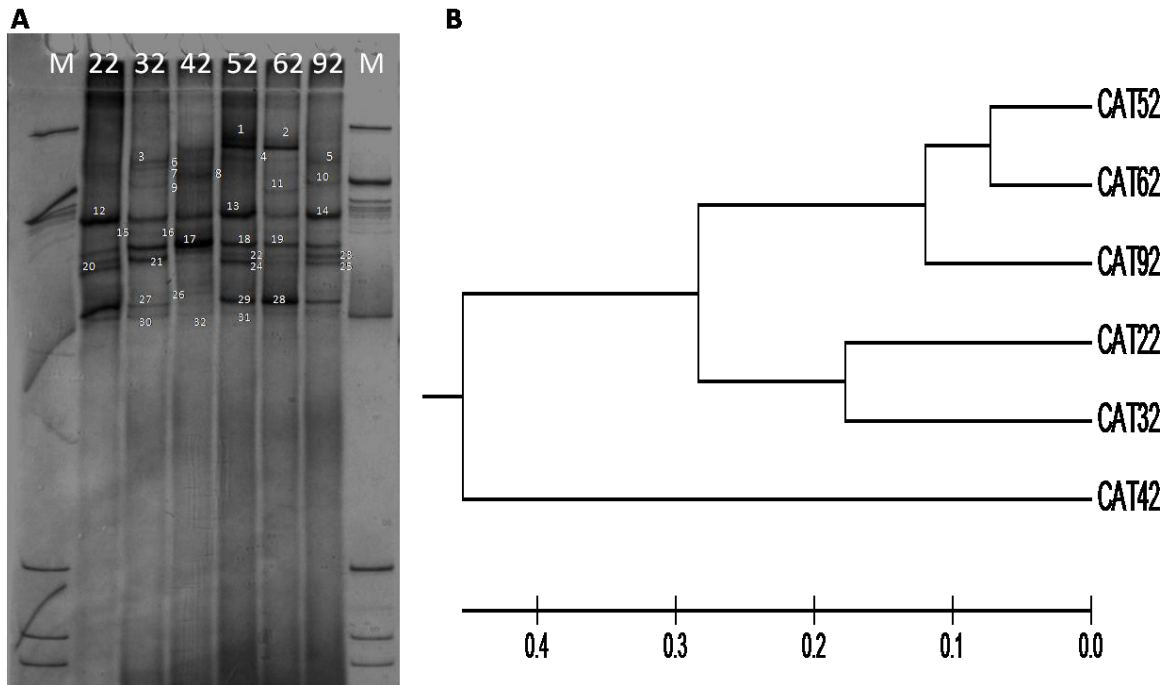


Figura 25. Análisis de la composición de comunidades de eucariotas presentes en muestras de ignimbrita de Catedral (CAT) de los sitios 22, 32, 42, 52, 62 y 92. Se empleó marcador de 1Kb como referencia de linealidad a cada lado de las muestras. A) Patrones de bandas obtenidas por DGGE de amplicones de Eukaryas. B) dendrograma de las mismas muestras obtenido por el método de agrupamiento UPGMA.

En la Figura 25A, se muestran los 6 carriles centrales con el perfil de bandas para los sitios analizados. Se observó un perfil de bandas similar en los seis sitios y la intensidad de bandas también fue similar en cada uno de ellos, lo que indica que las muestras presentan la misma diversidad. Las bandas repetidas u observadas en los seis sitios muestreados fueron la 12, 17, 20, 21, 27 y 30. El perfil de bandas de DGGE indica que el sitio CAT42 fue la muestra con menor número de bandas similares entre los sitios analizados.

El dendrograma obtenido del perfil de bandas observadas en el gel de DGGE se muestra en la Figura 25B. Este análisis muestra tres grupos en donde el sitio CAT42



se mantiene con las menores similitudes. Los grupos con mayores similitudes fueron dos, el primero formado por los sitios CAT52, CAT62 y CAT92 y el segundo por los sitios CAT22 y CAT32. Al revisar el origen de las muestras, no fue posible encontrar alguna característica de coincidencia entre los sitios similares y su origen, es decir; el primer grupo está formado por 2 muestras de hoyo de pumicita (CAT62 y CAT92) y una biopelícula de la azotea (CAT52), y los sitios más cercanos fueron el CAT52 y CAT62. El segundo grupo con mayores similitudes está formado por una biopelícula en el campanario (CAT22) y otra obtenida de un arco (CAT32) ubicado en la azotea. Finalmente es importante recordar que las muestras analizadas fueron biopelículas expuestas al medio ambiente y que los microorganismos ahí presentes tienen como medio de transporte, al aire.

#### **d) Comparación de resultados**

El análisis molecular de las comunidades presentes en las biopelículas muestreadas de la Catedral durante el segundo muestreo, establece que la diversidad y estructura de *Bacteria* y *Eukarya* en estas muestras es amplia y diferente para cada dominio. Para el dominio *Bacteria* tres de los sitios analizados presentan la mayor similitud en la composición y estructura de la comunidad poblacional, estos sitios fueron; CAT22, CAT42 y CAT52.

En el grupo cianobacteria además de observar una baja diversidad poblacional en las comunidades muestreadas, también se encontraron dos grupos diferentes entre sí pero con grandes similitudes entre los miembros que los integran. El grupo 1 formado por los sitios CAT22, CAT92 y CAT62. El grupo 2 formado por los sitios CAT32, CAT42 y CAT52.

Finalmente para el dominio *Eukarya*, observamos que las poblaciones encontradas en cada uno de los sitios muestreados mantienen una gran similitud entre sí y que solo el sitio CAT42 mostró grandes diferencias con respecto a los otros 5 sitios.

### **8.8.- Aislamiento e identificación de microorganismos**

#### **8.8.1.- Aislamientos microbianos**

Mediante técnicas de microbiología clásica se consiguió el aislamiento de bacterias, hongos, algas y una levadura de las muestras de Catedral (CAT), durante los muestreos realizados. En la siguiente tabla se muestra el total de aislados obtenidos en los sitios muestreados.

Tabla 8. Resumen de aislados obtenidos de cada uno de los muestreos realizados.

Sitio	Descripción	Número de aislados/muestreo		
		2°	3°	4°
<b>CAT1</b>	Hoyo de pumicita en campanario	NR	11	13
<b>CAT2</b>	Biopelícula en campanario	7	3	10
<b>CAT3</b>	Biopelícula en arco	10	11	17
<b>CAT4</b>	Biopelícula en torre de fachada	5	7	14
<b>CAT5</b>	Biopelícula en fachada	8	4	12
<b>CAT6</b>	Hoyos de pumicita en torres traseras	5	8	16
<b>CAT9</b>	Hoyos de pumicita en ventana central	6	NR	NR
<b>Total</b>		41	44	82

A continuación presentaremos los aislamientos de bacterias para los seis sitios muestreados en Catedral durante el segundo muestreo. Los aislados incluyen desde crecimientos típicos de colonias redondas, cóncavas, de orilla definida hasta aquellas colonias de aspecto rugoso, brillosas, semitransparentes y finalmente las que gotean. Estas últimas colonias que crecen rodeadas de lo que pudieran ser exopolímeros, podrían ser capaces de fijar nitrógeno atmosférico, ya que éste tipo de crecimiento es característico de este tipo de bacterias (Falkow y col. 1992). Los colores de las colonias se encuentran desde las blancas hasta las rosas o naranjas.

Se llevó a cabo la Tinción Gram para las bacterias aisladas en este muestreo y los resultados mostraron que de las 31 bacterias aisladas 21 de ellas dieron Gram positivas. Diversos autores han reportado que la mayoría de las bacterias consideradas deteriogénicas para los materiales de construcción han sido

clasificadas como positivas en la tinción de Gram (Kiel y Gaylarde 2006; Dick y col. 2006) lo cual concuerda con los resultados del presente trabajo. Las bacterias Gram positivas, contienen en su estructura una gruesa capa de peptidoglicanos que le confieren mayor resistencia a condiciones ambientales adversas.

Otro tipo de microorganismos que se logró aislar fueron los hongos, estos se obtuvieron de los sitios; CAT22, CAT32, CAT52 y CAT92, en general mostraron crecimientos filamentosos. Finalmente, se consiguió también el aislamiento de una microalga en dos sitios CAT22 y CAT92 y una levadura del sitio CAT32. La Figura 26 muestra algunos ejemplos de los morfotipos coloniales observados en los diferentes aislados obtenidos.

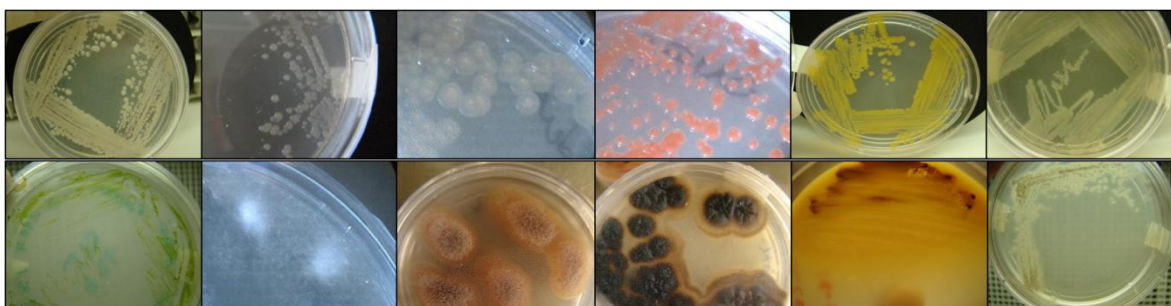


Figura 26. Principales morfotipos coloniales observados en los aislados del segundo muestreo.

Como se observó en los resultados anteriores las muestras de ignimbrita obtenidas contienen una gran diversidad de microorganismos, sin embargo no todos son cultivables, está reportado que solo el 1% de los microorganismos presentes en las biopelículas son cultivables (Amann y col. 1995).

## 8.8.2.- Identificación molecular

Los aislados obtenidos bacterias, hongos, algas y levadura, fueron identificados molecularmente mediante la secuenciación de sus genes 16S rRNA para las bacterias y 18S rRNA para las microalgas y hongos (Anexo 4d y 4e). Los aislados identificados y algunas de sus características se muestran a continuación en la Tabla 9.

Tabla 9. Identificación molecular de bacterias aisladas.

Sitio	Aislado	# Acceso	% Similitud	Phylum	Microorganismo
CAT22 Biopelícula en campanario	2a	AB682185	100.00	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
	2b	AB042083	99.66	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacterium</i> sp
	2d	AJ512504	99.40	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>
	2ebg	Y12703	100.00	<i>Proteobacteria</i>	<i>Paracoccus marcusii</i>
	2e	HQ242733	99.00	<i>Proteobacteria</i>	<i>Enterobacter cancerogenus</i>
CAT32 Biopelícula en arco	3a	AY862988	99.00	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i> sp
	3b	AB680524	100.00	<i>Proteobacteria</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	3d	AB680524	100.00	<i>Proteobacteria</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	3e	AY522568	100.00	<i>Actinobacteria</i>	<i>Janibacter melonis</i>
	3f	EU918731	100.00	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacterium oxydans</i>
	3g	AB680238	100.00	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
	3h	EF440185	99.26	<i>Proteobacteria</i>	<i>Rhizobium selenireducens</i>
CAT42 Biopelícula en torre de fachada	4a	HE613377	100.00	<i>Actinobacteria</i>	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>
	4b	JF496533	100.00	<i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i>
	4c	AB680573	99.85	<i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
	4d	X77445	99.85	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacterium testaceum</i>
	4e	AJ312209	100.00	<i>Actinobacteria</i>	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>
CAT52 Biopelícula en fachada central	5a	AY533561	99.86	<i>Actinobacteria</i>	<i>Janibacter marinus</i>
	5c	AB680239	99.85	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
	5d	HM151733	99.86	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter</i> sp / <i>humicola</i>
	5f	CP002379	100.00	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>
	5g	NR102783	99.00	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CAT62 Hoyos de pumicita en torres traseras	6b	EU275352	99.70	<i>Proteobacteria</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
	6c	EU275352	99.40	<i>Proteobacteria</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
	6d	EU373360	99.30	<i>Proteobacteria</i>	<i>Massilia timonae</i>
	6e	EF622537	99.20	<i>Firmicutes</i>	<i>Planococcus rifietoensis</i>
	6f	JN637317	99.70	<i>Proteobacteria</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
CAT92 Hoyos de pumicita en ventana central	9a	AF202056	99.20	<i>Firmicutes</i>	<i>Sporosarcina aquimarina</i>
	9d	AY111497	100.00	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter koreensis</i>
	9e	AB680573	99.70	<i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudomona stutzeri</i>
	9c	AB298784	100.00	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus pumilus</i>

La diversidad de bacterias observadas en cada sitio fue comparada y encontramos repetidos los aislados en sitios distintos. En los sitios, CAT22, CAT32, CAT52 y CAT92 se aislaron miembros del género *Bacillus*. En los sitios CAT22, CAT32 y CAT42 estuvieron presentes componentes de los géneros *Microbacterium*. En los sitios CAT22, CAT52 y CAT92 se encontró a miembros del género *Arthrobacter*. En especial el sitio CAT62 presentó una diversidad microbiana totalmente distinta a los otros 5 sitios ya que no se encontró coincidencia entre los aislados como se muestra en la Tabla 9. La identificación molecular de los hongos y algas se presenta en la Tabla 10.

Tabla 10. Hongos, algas y levaduras identificados de las muestras de la Catedral, segundo muestreo.

Sitio	Microorganismo	Aislado	# Acceso	% similitud	Phylum	Identificación
CAT22	Alga	2b	JQ043183	98	<i>Chlorophyta</i>	<i>Asterarcys quadricellulare</i>
	Hongo	2e	EF638698	99	<i>Ascomiceto</i>	<i>Ascomycete sp</i>
CAT32	Levadura	3c	EU723509	100	<i>Basidiomiceto</i>	<i>Cryptococcus vishniacii</i>
	Hongo	3b	EF638698	99	<i>Ascomiceto</i>	<i>Ascomycete sp</i>
		3a	EF060765	99	<i>Ascomiceto</i>	<i>Clavicipitaceae sp</i>
CAT52	Hongo	5e	JF807398	99	<i>Ascomiceto</i>	<i>Ascomycete sp</i>
		5d	EF060735	99	<i>Ascomiceto</i>	<i>Clavicipitaceae sp</i>
		5h	HM165488	99	<i>Ascomiceto</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
CAT92	Alga	9b	AF388375	99	<i>Chlorophyta</i>	<i>Asterarcys quadricellulare</i>
	Hongo	9f	EU710737	100	<i>Ascomiceto</i>	<i>Penicillium sp</i>

Se encontró que, de los 6 sitios, solo se obtuvo el aislamiento de hongos en 4 de ellos. En tres de ellos (CAT22, CAT32 y CAT52) se consiguió aislar a hongos de la clase *Ascomycete*, y en los sitios CAT32 y CAT52, se aislaron hongos de la familia

*Clavicipitaceae*. También se obtuvo el aislamiento de hongos de los géneros *Fusarium* y *Penicillium* para los sitios CAT52 y CAT92, respectivamente. Se aisló una levadura del género *Cryptococcus* en el sitio CAT32. Las algas aisladas de los sitios CAT22 y CAT92, fueron identificadas como *Asterarcys quadricellulare*, como se muestra en la Tabla 10.

La diversidad microbiana reportada por diversos autores en biopelículas microbianas para muestras de construcciones deterioradas, incluyen; *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Ascomycete*, *Fusarium*, *Penicillium* entre otros, como podemos observar en las Tablas 9 y 10, estos microorganismos coinciden con algunos de los identificados en nuestra investigación y han sido considerados microorganismos capaces de deteriorar materiales de construcción. Tanto bacterias como hongos han sido reportados con la capacidad de producir sustancias ácidas que favorezcan la biosolubilización de los materiales de construcción, además de haberse encontrado en crecimientos endolíticos que taponan los poros al igual que las hifas cuando crecen a través de estos, el taponamiento de poros favorece la acumulación de agua y periodos de hidratación y desecación que terminan favoreciendo la fractura de la roca. Los hongos han sido reconocidos por la producción de melanina, pigmento de color negro que provoca daño estético a las superficies en las que se desarrolla el hongo (Lan y col. 2010; Gurtner y col. 2000; Guiamet y col. 2013).

### **8.8.3.- Caracterización de aislados**

Las bacterias, hongos, algas y la levadura obtenidos del segundo muestreo, fueron caracterizados por su capacidad deteriogénica, con pruebas como producción de ácidos, de polímeros, precipitación de calcio y fijación de nitrógeno. Los resultados se presentan a continuación.

#### **a) Producción de sustancias acidas**

La prueba consistió en evaluar la capacidad de fermentar glucosa por parte de los aislados como se describió en materiales y métodos. La fermentación de glucosa se midió mediante el cambio del pH, que fue monitoreado respecto al tiempo. Solo 6 bacterias fueron capaces de fermentar glucosa y disminuir el pH desde 0.96 hasta 1.54 unidades de pH. Para el caso de los hongos solo tres fueron capaces de fermentar la glucosa, disminuyendo el pH del medio desde 0.4 hasta 1.36 unidades. Las algas también fermentaron la glucosa y el intervalo de pH fue de hasta 2.44 unidades. Estos resultados junto con los de las siguientes pruebas se presentan en la Tabla 11.



Tabla 11. Pruebas deteriogénicas de los aislados de Catedral segundo muestreo. Sólo se muestran los aislados que presentaron al menos un resultado positivo. Los subíndices indican los grupos de aislados distintos a las bacterias, v= alga, l= levadura, h= hongo. NA= No aplica la prueba.

<b>Pruebas deteriogénicas</b>				
<b>Aislado</b>	<b>Producción de sustancias ácidas</b>	<b>Producción de polímeros</b>	<b>Precipitación de calcio</b>	<b>Tinción Gram</b>
<b>22a</b>	-	+	-	+
<b>22b<sup>v</sup></b>	+	-	-	<b>NA</b>
<b>22e</b>	+	+	+	-
<b>32a</b>	-	+	+	+
<b>32b</b>	-	+	-	-
<b>32c<sup>l</sup></b>	+	-	-	<b>NA</b>
<b>32e</b>	-	+	-	+
<b>42a</b>	-	+	-	+
<b>42b</b>	+	-	-	-
<b>42d</b>	+	-	-	+
<b>42e</b>	+	-	-	+
<b>52a</b>	-	+	-	+
<b>52c</b>	-	+	-	+
<b>52d</b>	-	+	-	+
<b>52f</b>	-	+	-	-
<b>52g</b>	-	+	+	+
<b>52d<sup>h</sup></b>	+	-	-	<b>NA</b>
<b>52e<sup>h</sup></b>	+	-	-	<b>NA</b>
<b>52h<sup>h</sup></b>	+	-	-	<b>NA</b>
<b>62d</b>	-	+	-	+
<b>92a</b>	-	+	-	+
<b>92b<sup>v</sup></b>	+	-	-	<b>NA</b>
<b>92d</b>	+	-	-	+

La presencia de bacterias capaces de disminuir el pH indica el potencial que tienen para deteriorar la roca por producción de sustancias ácidas que pueden biosolubilizar los componentes principales del material de construcción. El daño químico por acción de ácidos a las construcciones es uno de los principales tipos de deterioro que se han reportado en construcciones expuestas al medio ambiente (Jroundi y col. 2010).

#### **b) Producción de polímeros**

La presencia de polímeros en la biopelícula fue esperada ya que éstos permiten el inicio de la misma mediante el anclaje de los microorganismos. La producción de polímeros fue evaluada en los aislados del segundo muestreo. Se emplearon tres tipos de colorantes, la nigrosina como tinción negativa, el azul alciano para polisacáridos ácidos y el RC para polisacáridos derivados de D-glucanos. En esta prueba solo se obtuvieron resultados positivos para las bacterias y el 42% de ellas dieron positivo en al menos dos de las tres pruebas. Inicialmente a la de nigrosina y después a alguna de las otras dos, (azul alciano o RC). Los resultados de esta prueba se presentan en la Tabla 11. La presencia de microorganismos capaces de producir polímeros permite sugerir que estos pueden emplearlos como adherentes en la superficie de los materiales de construcción y favorecer el anclaje de microorganismos, así como la acumulación de agua, partículas o polvo e iniciar una sucesión poblacional, en donde los fotosintéticos son los primeros colonizadores y los heterótrofos los colonizadores secundarios (Scheerer y col. 2009).

### **c) Fijación de nitrógeno atmosférico**

La capacidad de fijar nitrógeno atmosférico fue evaluada en las bacterias aisladas, con la finalidad de determinar la presencia de la actividad nitrogenasa, que permite obtener amonio ( $\text{NH}_3$ ) del nitrógeno atmosférico ( $\text{N}_2$ ), el amonio es empleado por las bacterias como fuente de nitrógeno en su metabolismo. Esta actividad es de gran interés para la explicación de la sucesión poblacional en las biopelículas microbianas en ambientes pobres de nutrientes. La obtención de  $\text{NH}_3$  a partir de  $\text{N}_2$ , favorece el incremento del pH y la disolución de carbono inorgánico como el  $\text{CO}_2$ , que puede reaccionar con iones de calcio para finalmente precipitar como  $\text{CaCO}_3$ . El  $\text{CaCO}_3$  es considerado un indicador de deterioro en los materiales de construcción (Hammes y col. 2003; Valdés y col. 2005; DeAngelis y col. 2008; David y col. 1980).

Inicialmente se llevó a cabo una prueba previa al ensayo nitrogenasa con la finalidad de descartar rápidamente aislados sin la capacidad buscada. Cada uno de los aislados fueron sembrados en placas con medio libre de nitrógeno y fueron descartados del ensayo nitrogenasa aquellos que no mostraron crecimiento en estas condiciones. En la primera resiembra el 47% de los aislados crecieron, pero al realizar una segunda resiembra sólo 21% mostraron crecimiento en medio libre de nitrógeno. Estos aislados fueron: CAT22a, CAT22ebg, CAT22e, CAT32a, CAT32e y CAT52g.

Estos microorganismos fueron empleados en el ensayo nitrogenasa, en donde se evaluó la capacidad de la enzima a transformar acetileno a etileno. Los

microorganismos evaluados bajo este ensayo no mostraron la capacidad de transformar el acetileno a etileno en el ensayo nitrogenasa. Algunos de los factores que pudieron influir en el resultado negativo de esta prueba se mencionan a continuación; exceso de luz, altas temperaturas de incubación, altas concentración de oxígeno ya que estas bacterias generalmente son micro-aerofílicas o anaerobias y la presencia de compuestos nitrogenados.

#### **d) Precipitación de calcio**

Otra prueba para determinar la capacidad deteriogénica de los aislados fue la precipitación de calcio, en forma  $\text{CaCO}_3$ , para ello todos los microorganismos aislados del segundo muestreo fueron sembrados en placa en medio PGY- $\text{Ca}^{2+}$  como se describe en materiales y métodos.

Para este experimento se comprobó que la cantidad de calcio presente en el medio de cultivo no precipitaba. De esta forma nos aseguramos que el calcio en el medio estuviera disponible para ser asimilado o biomineralizado por los microorganismos.

Las placas inoculadas fueron incubadas por alrededor de 3 semanas a  $30^\circ\text{C}$ , solo en el caso de las siembras en medio mineral BG11 la incubación duró alrededor de 5 semanas, de todos los aislados solo tres con nutrición heterótrofa presentaron un precipitado blanco alrededor de las colonias entre los días 7 y 10. En la Figura 27 se muestran los aislados antes y después de sembrarse en medio PGY- $\text{Ca}^{2+}$ .

En medio PGY, el aislado 22e formó colonias grandes e irregulares que al paso del tiempo generaba una apariencia de colonias goteadoras. En medio PGY- $\text{Ca}^{2+}$ , las

colonias fueron pequeñas y redondas y los cristales se acumularon sobre toda la colonia. Para los aislados 32a y 52g la morfología colonial fue similar en ambos medios. Para estos aislados los cristales calcio se acumularon en la periferia de las colonias en medio PGY-Ca<sup>2+</sup>.

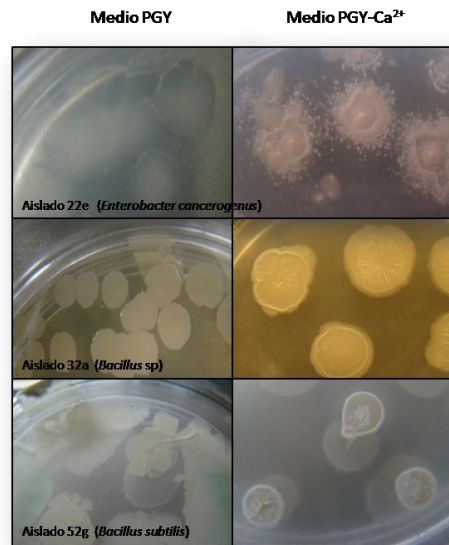


Figura 27. Aislados capaces de precipitar calcio, izquierda se observa el crecimiento en presencia de medio PGY (0.072 g/L CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O) y a la derecha el crecimiento con medio enriquecido en calcio PGY-Ca<sup>2+</sup> (7.5 g/L de CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O).

La formación del precipitado blanco alrededor de las colonias se explica por la capacidad de los microorganismos para llevar a cabo la precipitación de calcio como CaCO<sub>3</sub> conocida como carbonatagénesis; que por definición se refiere a la inducción bacteriana de la precipitación de CaCO<sub>3</sub>. Una forma de realizar este proceso se conoce como litificación que es la conversión de un sedimento a roca, este proceso favorece la disminución del pH en el medio (Ercole y col. 2007).

Después de concluidas las pruebas para determinar la capacidad de los aislados para la producción de ácidos y de polímeros, precipitar el calcio y fijar el nitrógeno atmosférico. Se propuso a los siguientes aislados como posibles candidatos para el experimento en condiciones controladas. Los aislados propuestos fueron; CAT22e, CAT32a, y CAT52g, debido a que al menos poseen un par de las capacidades evaluadas.

Para los aislados de morteros también se llevó a cabo la prueba de precipitación de calcio y contrario a lo observado para las muestras de ignimbritas, en los morteros 16 de las 20 bacterias aisladas fueron capaces de formar cristales, lo cual corresponde al 80% de los aislados, comparado con tan solo el 10% de los aislados encontrados con esta capacidad para las muestras de ignimbritas. La información sugiere que esta capacidad puede ser expresada como una forma de selección por sustrato, ya que los morteros son elaborados a base de cal (CaO) y yeso (CaSO<sub>4</sub>) minerales ricos en calcio.

## **8.9.- Precipitación de CaCO<sub>3</sub> e influencia del calcio en la producción de sustancias poliméricas extracelulares y formación de biopelículas**

### **8.9.1.- Producción y análisis de cristales de CaCO<sub>3</sub>**

Las tres bacterias identificadas con capacidad de precipitar el calcio como CaCO<sub>3</sub> fueron la 22e, 32a y 52g. Estas bacterias fueron identificadas como *Enterobacter cancerogenus*, *Bacillus* sp., y *Bacillus subtilis*, respectivamente. Las tres bacterias fueron capaces de precipitar cristales de CaCO<sub>3</sub>, después de 7 días de incubación en

medio sólido PGY-Ca<sup>2+</sup> (con 7.5 g/L de CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O). Los cristales producidos fueron de color café y blanco, con morfologías irregulares, estos fueron observados bajo el microscopio óptico con aumento 10X. Los cristales recuperados fueron analizados por MEB, DEX y DRX. Las imágenes de MEB muestran morfologías específicas para los cristales producidos por cada uno de los aislados (Figura 28).

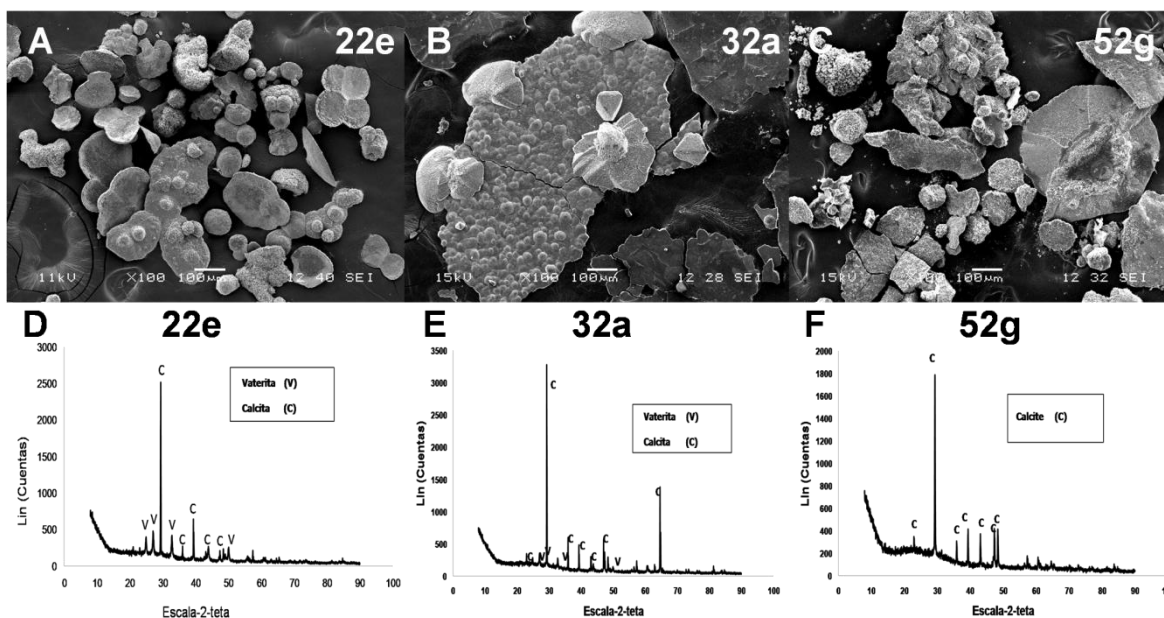


Figura 28. Imágenes de MEB (A, B y C) y patrones de DRX (D, E y F) de formas precipitadas de CaCO<sub>3</sub> por los aislados 22e, 32a y 52g en medio PGY-Ca<sup>2+</sup>.

Los cristales del aislados 22e, se observan de superficie plana con pequeñas estructuras esféricas bien definidas en sus centros. Los cristales del aislado 32a se observan de superficies largas y planas, así como estructuras amorfas. Para el aislado 52g los cristales se observan principalmente de estructuras amorfas y esferas aglomeradas. El análisis de DEX sobre los cristales reportó que las estructuras estaban compuestas únicamente por los elementos; calcio, carbono y oxígeno y el compuesto sugerido fue el CaCO<sub>3</sub>.

Los análisis de DRX realizados sobre estos cristales revelan que, para los aislados 22e y 32a los cristales están constituidos por una mezcla de calcita romboidal y vaterita hexagonal. Para el aislado 52g los cristales solo estaban compuestos por calcita romboidal.

Se ha reportado que factores como el medio de cultivo, temperatura, agitación y tipo de cepa, tienen influencia sobre el tipo de cristales producidos. En nuestro caso los tres aislados crecieron bajo las mismas condiciones, por lo que la diferencia en el tipo o forma de cristales obtenidos solo depende del microorganismo (Jiménez-López y col. 2007; Shirakawa y col. 2011).

Algunos autores también han reportado diferencias en la mineralogía y morfología de los cristales de  $\text{CaCO}_3$  producidos por diferentes aislados de *Bacillus sphaericus* crecidos en medio sólido suplementado con 30 mM de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 20 g/L de urea. Las diferencias observadas fueron atribuidas a diferencias en la expresión ureasa y el efecto del calcio en la actividad ureasa. Para algunos aislados se reportó un incremento de la actividad ureasa en presencia de 30 mM de calcio (Hammes y col. 2003). Sondi y Matijevic (2001) reportaron que algunos aminoácidos cargados en la superficie de la ureasa pueden interactuar con el  $\text{CaCO}_3$  y afectar la mineralogía de los cristales obtenidos.

Las razones de porque las bacterias precipitan diferentes cristales de  $\text{CaCO}_3$  aún no son claras e involucran factores como; estructura externa de la membrana, EPS, proteínas, enzimas o actividad metabólica, todo esto se ha observado tanto en la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  ureolítica, como la no ureolítica.



### **8.9.2.- Efecto de la urea y el calcio en la actividad ureasa y la precipitación de cristales de $\text{CaCO}_3$**

Los tres aislados fueron crecidos en medios líquidos diferentes; medio PGY, PGY- $\text{Ca}^{2+}$ , PGY-Urea y PGY-Urea- $\text{Ca}^{2+}$ . Los cultivos fueron crecidos por aproximadamente 10 horas o hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. El crecimiento del aislado 22e fue disminuido hasta en 72% en presencia de urea. La cinética de crecimiento terminó cuando se alcanzó la fase estacionaria. Para el aislado 22e en presencia de urea la fase estacionaria de crecimiento se alcanzó en 0.5 de  $\text{DO}_{595}$ . Para los otros dos aislados 32a y 52g, el crecimiento no fue afectado por la presencia de urea. La fase estacionaria para los dos aislados 32a y 52g fue alcanzada con una  $\text{DO}_{595\text{nm}}$  promedio de 1.1 y 0.9, respectivamente, en todos los medios empleados.

La actividad ureasa solo se pudo comprobar para los tres aislados en el sobrenadante (ureasa extracelular) ya que esta actividad no fue detectada en la célula. La Tabla 12 presenta la máxima actividad ureasa detectada para cada aislado en los diferentes medios probados.

Tabla 12. Actividad ureasa de los tres aislados creciendo en los diferentes medios de cultivo. ND = actividad no detectada.

Medio	Actividad ureasa (Uml <sup>-1</sup> )		
	22e	32a	52g
PGY	ND	3.2 ± 1.21	4.1 ± 1.1
PGY-Ca <sup>2+</sup>	ND	2.8 ± 1.01	5.9 ± 0.9
PGY-Urea	35.3 ± 7.1	3.6 ± 1.57	7.3 ± 1.4
PGY-Urea-Ca <sup>2+</sup>	28 ± 9.12	2.3 ± 0.65	7 ± 1.2

Para el aislado 22e la máxima actividad ureasa se detectó en la fase estacionaria de crecimiento y solo en presencia de urea. Para este aislado la actividad ureasa no fue detectada en los medios de cultivo PGY y PGY-Ca<sup>2+</sup>, es decir sin urea.

Los aislados 32a y 52g no mostraron diferencias significativas en la actividad ureasa en presencia o ausencia de urea, por lo que asumimos que para estos aislados la actividad ureasa es constitutiva. La máxima actividad ureasa para los aislados 32a y 52g se observó en la fase de latencia y estacionaria, respectivamente. Los valores de actividad ureasa para los aislados 32a y 52g fueron bajos en comparación con las actividades obtenidas para el aislado 22e, como se observa en la tabla 12.

Las tres bacterias aisladas fueron capaces de precipitar calcio en medio líquido sin urea, pero en presencia de ésta la precipitación de calcio se incrementó. Para el aislado 22e la precipitación de CaCO<sub>3</sub> en presencia de urea se incremento 12 veces. Para los aislados 32a y 52g el incremento en la precipitación de CaCO<sub>3</sub> en presencia de urea fue de 2.8 y 1.9 veces mayor, respectivamente. Sin embargo los niveles de precipitación para los aislados 32a y 52g fueron menores comparados con lo precipitado por el aislado 22e (Tabla 13).

Tabla 13. Precipitación de  $\text{CaCO}_3$  por los tres aislados crecidos en diferentes medios de cultivo.

Medio	Cristales precipitados( $\text{gl}^{-1}$ )		
	22e	32a	52g
PGY- $\text{Ca}^{2+}$	0.46	1.4	1.5
PGY-Urea- $\text{Ca}^{2+}$	5.60	3.9	2.9

Finalmente el incremento en la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  en presencia de urea para los aislados 32a y 52g, no está claramente relacionado con la actividad ureasa, el incremento pudiera estar relacionado simplemente con la presencia de urea. La urea es un osmolito que puede modificar de forma local el medio ambiente de la célula. En presencia de urea el pH del medio se incrementa, se libera  $\text{CO}_2$  y amonio que en presencia de iones de calcio favorecen la deposición de  $\text{CaCO}_3$ .

### **8.9.3.- Efecto del calcio en la producción de EPS y colonización de bloques de ignimbrita**

La producción de EPS fue evaluada en los tres aislados que fueron cultivados en PGY, PGY- $\text{Ca}^{2+}$ , PGY-Urea y PGY-Urea- $\text{Ca}^{2+}$  usando el ensayo de RC. Para el aislado 22e los EPS fueron principalmente encontrados en el medio de cultivo en lugar de asociados a la célula (Figura 29A y 29B). El contenido de EPS decreció ligeramente en el medio PGY- $\text{Ca}^{2+}$  tanto en presencia como en ausencia de urea (Figura 29B).

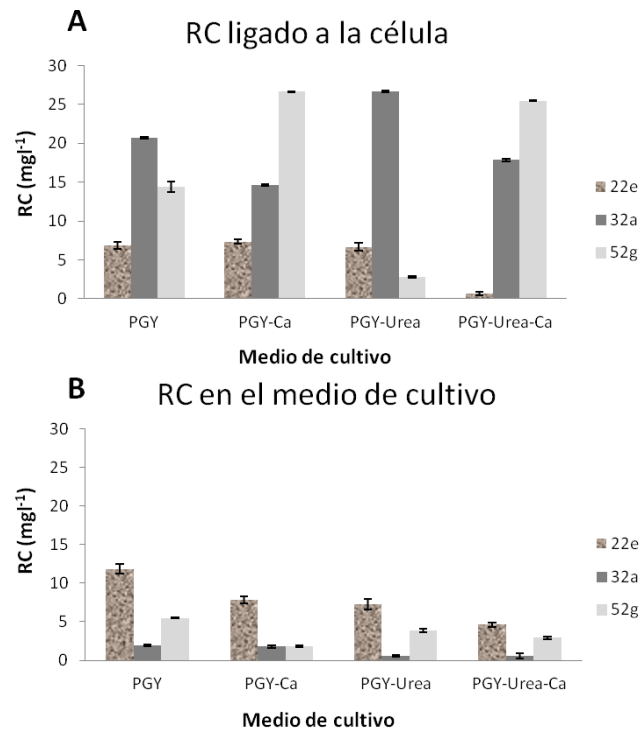


Figura 29. Ensayo de RC de los aislados 22e, 32a y 52g crecidos en 4 medios líquidos distintos. A) RC unido a la célula, fue evaluado mezclando del RC con las células colectadas por centrifugación. B) RC en el medio de cultivo, fue evaluado después de que el RC estuvo en contacto con el sobrenadante obtenido después de la centrifugación para separar células.

Para el aislados 32a y 52g los EPS se encontraron asociados a la célula (Figura 29A). Un decremento de EPS fue observado para el aislado 32a en presencia de medio PGY-Ca<sup>2+</sup> y en medio PGY-Urea-Ca<sup>2+</sup>, en medio PGY-Urea los EPS incrementaron. Los niveles de EPS se incrementaron hasta casi 2 veces para el aislado 52g, en medio PGY-Ca<sup>2+</sup> y PGY-Urea-Ca<sup>2+</sup>. En presencia de PGY-Urea para este aislado los niveles de EPS también decrecieron (Figura 29A).

Observamos que la presencia de calcio y urea en el medio de cultivo tienen influencia en la cantidad de EPS producidos. A la par, se evaluó la colonización de la

ignimbrita por estos 3 aislados, en medio PGY y medio PGY-Ca<sup>2+</sup>. Después de 4 meses de iniciado el experimento bajo condiciones controladas en el laboratorio, se llevaron a cabo observaciones por MEB. Los bloques de ignimbrita inoculados inicialmente con cada uno de los tres aislados, mostraron que con el medio de cultivo PGY (Figura 30D, E y F) los bloques no presentaron bacterias sobre su superficie. Cuando se empleó medio de cultivo PGY-Ca<sup>2+</sup> (Figura 30A, B y C) sí fue posible observar bacterias en la superficie de la ignimbrita. Las bacterias se encontraban cubriendo la superficie de la ignimbrita y con lo que aparentemente eran polímeros para su anclaje (Figura 30A y B). Las observaciones por MEB y DEX no mostraron la presencia de precipitados de CaCO<sub>3</sub>. Los análisis de DRX confirmaron que no fue posible encontrar bajo ninguna de las condiciones evaluadas la presencia de CaCO<sub>3</sub>, ni como calcita o vaterita. Este experimento permitió concluir que el calcio en exceso permite la adhesión de las células a la superficie de la ignimbrita. Este efecto fue observado con los tres aislados, lo que confirma que la adhesión celular no es específica de estas cepas. Se propone que el ion calcio sirvió de “puente” entre la ignimbrita que es una roca silicea con carga negativa y las bacterias, también con carga negativa en su superficie, permitiendo así la colonización de esta roca. Esto explicaría porque no se observó precipitación de calcio como calcita (o vaterita) ya que el calcio se encontraba involucrado en la unión entre la roca y las bacterias.

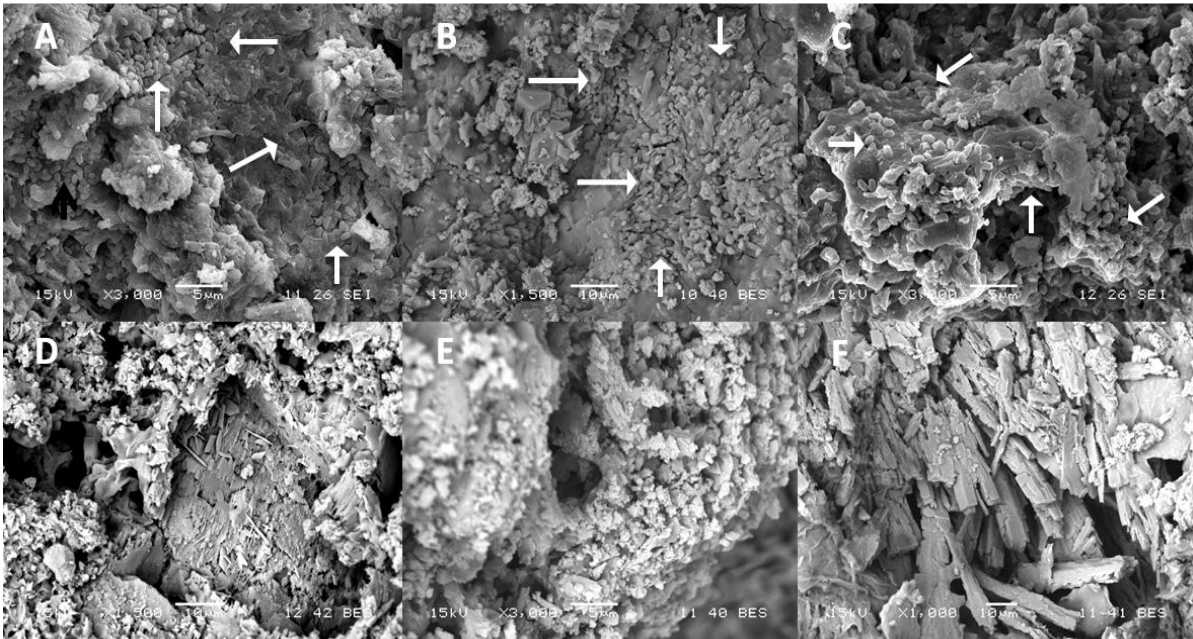


Figura 30. Imágenes de MEB de ignimbrita después de 4 meses de haber sido inoculada con los aislados 22e, 32a y 52g. A, B y C) Ignimbrita inoculada por los aislados 22e, 32a y 52g, respectivamente, en presencia de medio PGY- $\text{Ca}^{2+}$ . Las flechas indican la presencia de bacterias. D, E y F) Ignimbrita inoculada por los aislados 22e, 32a y 52g, respectivamente, en presencia de medio PGY.

El anclaje de las bacterias es importante como uno de los primeros pasos en la formación de la biopelícula y depende del tipo de superficie y rugosidad de la roca (Hernández-Mariné y Roldan Molina 2012). Estudios realizados por Rodríguez-Navarro y col. (2012), describen que el anclaje en la roca incrementa la supervivencia de la bacteria y promueve actividades metabólicas que favorecen la precipitación de una capa adherente de calcita en rocas carbonatadas.

El experimento bajo condiciones controladas llevado a cabo con los bloques de ignimbrita, pone a la luz, que el exceso de calcio en el medio de cultivo usado para el mantenimiento de las bacterias inoculadas sobre las ignimbritas, favoreció la

formación de una biopelícula. Tanto la producción de EPS y la precipitación de calcio fue observada en los aislados empleados en este experimento.

Las propiedades de la roca o material de construcción como la rugosidad, porosidad y composición química o mineralogía influyen en el desarrollo y la colonización microbiana (Miller y col. 2012). Estas propiedades pueden ofrecer a los microorganismos sitios de supervivencia o promover actividades metabólicas (Rodríguez-Navarro y col. 2012) tal como se observó para los aislados de ignimbritas y de morteros. En los aislados de ignimbritas solo el 10% de ellos presentaron la capacidad de precipitar el calcio como  $\text{CaCO}_3$  contrario a lo observado con los aislados de morteros, en donde el 80% de ellos presentó esta capacidad. Los morteros se han empleado como material de restauración y de unión en la Catedral de Morelia y se ha observado que es en estos sitios de unión a base de morteros, en donde hay mayor presencia de microorganismos. Los resultados permiten sugerir que el tipo de sustrato influye en el grado de colonización biológica y deterioro.

Los diversos materiales para la construcción presentan una amplia área de investigación para la evaluación del biodeterioro. Es importante establecer estrategias para evitar el deterioro de estos materiales, especialmente los considerados Patrimonio Mundial. La formación de una nueva capa de  $\text{CaCO}_3$  por parte de las bacterias permitiría la restauración del daño provocado a lo largo del tiempo en rocas de tipo caliza pero no en ignimbritas.

## 9.- RESUMEN DE RESULTADOS

Las muestras tomadas durante el segundo muestreo en la Catedral de Morelia, fueron analizadas por técnicas moleculares y de microbiología clásica, permitiendo mostrar que la diversidad poblacional entre sitios en general se mantiene. Se consiguió aislar microorganismos con al menos una capacidad deteriogénica (precipitación de calcio, producción de EPS o sustancias ácidas) corroborándose que la asociación de diversos microorganismos en las superficies de rocas o edificios puede favorecer la acción sinérgica de microorganismos con capacidades deteriogénicas, provocando el daño físico, químico y estético de construcciones.

Las propiedades intrínsecas de la ignimbrita indican que es una roca de mediana porosidad y ligeramente ácida, lo que la hace biorreceptiva. La prueba de resistencia a la ruptura demostró que los sitios que contienen en su superficie una biopelícula, muestran mayor fragilidad. Las biopelículas deterioran entonces la ignimbrita.

Mediante técnicas de MEB, DEX, DRX e IR, se pudo confirmar la presencia y acción deteriorogénica de las biopelículas en la superficie de la ignimbrita mediante la observación directa de los microorganismos y la detección de  $\text{CaCO}_3$  como calcita, un indicador de deterioro en la ignimbrita ya que este mineral no es un componente natural de la roca. Estas técnicas también mostraron cambios conformacionales de los componentes básicos de las ignimbritas expuestas al medio ambiente y a biopelículas. El cuarzo hexagonal sufrió de reacomodos espaciales provocados por



desvitrificación de la roca generando la presencia de tridimita y cristobalita, tetragonal y ortorrómbica, respectivamente.

Las diversas observaciones por MEB confirmaron que las bacterias y hongos pueden dañar mecánicamente a la ignimbrita, principalmente por tapotamiento de poros, debido al crecimiento epilítico y endolítico y la presencia de hifas en los poros de la roca.

Las observaciones por microscopio óptico confirmaron la presencia de algas y la extracción de pigmentos fotosintéticos permitió encontrar clorofila a y carotenoides, apoyando una posible sucesión poblacional iniciada por los fotótrofos en las biopelículas.

Por técnicas de microbiología clásica se consiguió el aislamiento de bacterias deteriorogénicas a partir de las biopelículas muestreadas. Las bacterias aisladas en su mayoría fueron Gram positivas. Las bacterias Gram positivas son frecuentemente detectadas en biopelículas formadas sobre fachadas de monumentos debido a su alto contenido de peptidoglicanos que las hace resistentes a condiciones ambientales extremas como falta de agua, ausencia de nutrientes y radiaciones.

Mediante el uso de técnicas moleculares (DGGE), se demostró la similitud entre biopelículas, es decir que la composición microbiana entre los sitios muestreados fue poco variable. Esta conservación poblacional podría entonces deberse al tipo de

sustrato, más que a las condiciones ambientales. Este efecto se confirmó al comparar los aislados identificados en las diferentes biopelículas muestreadas.

Tres de las bacterias aisladas, identificadas como *Enterobacter cancerogenus* 22e, *Bacillus* sp. 32a, y *Bacillus subtilis* 52g, fueron capaces de precipitar el calcio como calcita y/o vaterita. Los cristales de  $\text{CaCO}_3$  producidos por cada uno de los aislados mostraron morfologías diferentes bajo las mismas condiciones de crecimiento, lo que sugiere que la morfología de los cristales de  $\text{CaCO}_3$  depende más del tipo de microorganismo que lo produce que del medio. Se comprobó que la urea favorece un incremento en la precipitación de calcio, para las tres bacterias con capacidad de precipitar el  $\text{CaCO}_3$ .

La precipitación de calcio y producción de EPS en presencia de urea para cada una de las bacterias con capacidad de precipitar  $\text{CaCO}_3$ , mostró comportamientos diferentes. Para la enterobacteria 22e, la cantidad de EPS producidos disminuyó en presencia de calcio y la urea no afectó esta producción, sin embargo en presencia de urea la precipitación de calcio se vio favorecida. Para el aislado *Bacillus* sp., 32a, la urea favoreció la precipitación de calcio y la producción de EPS. La producción de EPS en presencia de sólo calcio o calcio más urea disminuyó. Para el aislado *Bacillus subtilis* 52g, la urea favoreció la precipitación de calcio y la producción de EPS, pero en presencia de calcio, solo o con urea, disminuyó la producción de EPS.

El exceso de calcio empleado en el medio durante el experimento de colonización de ignimbritas por los aislados 22e, 32a y 52g (por separado) en condiciones de laboratorio favoreció la colonización de la superficie de las ignimbritas por estos microorganismos, independientemente del aislado empleado.

## 10.- CONCLUSIONES

La adhesión de bacterias a la superficie de rocas depende de la mineralogía de las rocas (calcareas contra silíceas) y de las características propias de las bacterias (carga de sus superficies, entre otras). Las biopelículas desarrolladas sobre las ignimbritas contienen comunidades microbianas complejas dentro de las cuales fue posible aislar bacterias con la capacidad de precipitar  $\text{CaCO}_3$ . Las comunidades microbianas encontradas se conservan entre sitios muestreados. La composición de las comunidades microbianas en biopelículas formadas sobre las ignimbritas depende probablemente más de la mineralogía de este sustrato que de las condiciones ambientales.

Las ignimbritas contienen una pequeña cantidad de calcio que una vez (bio) solubilizado puede favorecer el anclaje de ciertas bacterias sobre la superficie de esta roca ácida debido a que el calcio podría servir de puente entre las bacterias y la roca, ambas con carga negativa. Se mostró adicionalmente que algunas bacterias producen más EPS en presencia de iones de calcio libres. Los EPS son especialmente importantes para el desarrollo y mantenimiento de biopelículas. Por lo tanto el calcio es importante para la formación de biopelículas.

En este trabajo se propusieron posibles mecanismos de biodeterioro como; la biosolubilización de la roca, el secuestro de iones (de calcio) y la producción de EPS, mediante la detección de estas capacidades entre los aislados obtenidos.

En particular, se encontró que:

- La presencia de biopelículas sobre la ignimbrita disminuye la resistencia de la roca a la ruptura.
- La presencia de biopelículas y la exposición al medio ambiente de ignimbritas cambia la estructura conformacional del cuarzo, principal componente de la ignimbrita. En algunos casos, se encontró también calcita ( $\text{CaCO}_3$ ) que no es un componente natural de las ignimbritas, por lo tanto este mineral se consideró un producto de deterioro.
- La presencia de iones calcio libres en el medio favorece la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  por ciertas bacterias. La presencia de urea favorece también la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  por estas bacterias.
- La producción de EPS en estas bacterias carbonatogénicas se ve modificada (incrementa o disminuye) en presencia de calcio en exceso en el medio. La abundancia de calcio en el medio favorece la colonización de la ignimbrita por estas bacterias pero no la precipitación de calcio sobre la roca.

Sugerimos que la composición del sustrato favorece una selección en el tipo de microorganismos que lo habitan debido a que prácticamente todos los aislados de morteros mostraron la capacidad de precipitar el calcio, contrario a lo observado en los aislados de la ignimbrita. Los morteros son esencialmente constituidos de minerales de calcio mientras que las ignimbritas contienen calcio solo en una

pequeña cantidad. Esto explicaría porque se encontraron pocos aislados carbonatogénicos en ignimbritas y muchos más en morteros.

Se ha descrito que es posible emplear la capacidad de precipitar el calcio como  $\text{CaCO}_3$  para la restauración y consolidación de material de construcción rico en calcio o roca tipo caliza. De acuerdo a los resultados obtenidos aquí, esta estrategia no es aplicable a ignimbritas debido a que (1) el constituyente principal de la ignimbrita es el  $\text{SiO}_2$ ; (2) la presencia de  $\text{CaCO}_3$  fue un indicador de daño a la roca y (3) no se observó la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  en ignimbritas inoculadas con bacterias carbonatogénicas durante un experimento controlado en laboratorio.

## 11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achal V., Abhijit M., Sudhakara MR. 2010. Characterization of two urease-producing and calcifying *Bacillus* spp. isolated from cement. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(11):1571-1576.
- Ahmed Z., Sasahara H., Bhuiyan SH., Saiki T., Shimonishi T., Takada G., Izumori K. 1999. Production of D-xylose from D-glucose by microbial and enzymatic reactions. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88(6):676-678.
- Alonso E., Bedolla E., Gómez LM. 1998. SEM study on the ignimbrites from ancient monuments in Morelia, Michoacan. Mexico. International Conference on Electron Microscopy, ICEM, 14, Cancun, Mexico. August 31 to September 4. Symposium FF III. *Advances in Imaging and Electron Physics* 127.
- Alonso GEM. 2002. Propiedades mecánicas y deterioro de materiales basados en rocas ígneas. Tesis de doctorado. Facultad de Química de la UNAM.
- Alonso GEM., Martínez L. 2003. The role environmental sulfur on degradation of ignimbrites of the Cathedral in Morelia, México. *Building and Environment* 38:861-867.
- Amann RL., Ludwig W., Schleifer KH. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cell without cultivation. *Microbiological Reviews* 59:143-169.
- Arino X., Saiz-Jimenez C. 1995. Factors affecting the colonization and distribution of cyanobacteria, algae and lichens in ancient mortars. In: Riederer J (ed) *Proceedings of the Eighth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*. Rathgen-Forschungslabor, Berlin, 725–731.
- Aviam O., Bar-Nes G., Zeiri Y., Sivan A. 2004. Biodegradation of cement by sulfur-oxidizing bacteria as a bioassay for evaluating immobilization of low-level radioactive waste. *Applied and Environmental Microbiology* 70(10):6931-6036.
- Bachmeier KL., Williams AE., Warmington JR., Bang SS. 2002. Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. *Journal of Biotechnology* 93:171-181.
- Barberousse H., Rout B., Yéprémian C., Boulon G. 2007. An assessment of façade coatings against colonization by aerial algae and cyanobacteria. *Building and Environment* 42:2555-2561.

- Bennett A., Bogorad L. 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green algae. *The Journal of Cell Biology* 58. Pp 419-435.
- Benson HJ. 2002. "Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology". Eighth edition, Mc Graw Hill.
- Bérchez J. 1992. La arquitectura mexicana de los siglos XVII y XVIII. Colección Arte Novohispano. Colección ISBN 968-608447-9, tomo 3 ISBN 968-6084-50
- Berdoulay M., Salvado JC. 2009. Genetic characterization of microbial communities living at the surface of building stones. *Letters in Applied Microbiology* 49:311-316.
- Brad T., Braster M., Breukelen BM., Straalen NM., Röling WFM. 2008. Eukaryotic diversity in an anaerobic aquifer polluted with landfill leachate. *Applied and Environmental Microbiology* 74(13): 3959-3968.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-54.
- Britton G. 1985. General carotenoids methods. *Methods in Enzymology* 111:113-158.
- Cacchio P., Ercole C. 2003. Calcium carbonate precipitation by bacterial strains isolation from a limestone cave and from a loamy soil. *Geomicrobiology Journal* 20:85-98.
- Capitelli F., Sorlini C. 2008. Microorganisms attack synthetic polymers in items representing our cultural heritage. *Applied and Environmental Microbiology* 74(3): 564-569.
- Capitelli F., Toniolo L., Sansonetti A., Gulotta D., Ranalli G., Zanardini E., Sorlini C. 2007a. Advantages of using microbial technology over traditional chemical technology in removal of black crust from stone surfaces of historical monuments. *Applied and Environmental Microbiology* 73(17):5671-5675.
- Cappitelli F., Principi P., Pedrazzani R., Toniolo L., Sorlini C. 2007b. Bacterial and fungal deterioration of the Milan Cathedral marble treated with protective synthetic resins. *Science of the Total Environment* 385(1-3):172-81.
- Chahal N, Rajor A., Siddique R. 2011. Calcium carbonate precipitation by different bacterial strains. *African Journal of Biotechnology* 10(42): 8359-8372.



- Chen J., Blume HP., Beyer L. 2000. Weathering of rocks induced by lichen colonization - a review. *Catena* 39:121-146.
- Correa-García A. 2009. Calidad del aire en la ciudad de Morelia. *ContactoS* 74:29-36.
- Crispim CA., Gaylarde CC. 2004. Cyanobacteria and biodeterioration of cultural heritage: A review. *Microbial Ecology* 49:1-9.
- Crispim CA., Gaylarde PM., Gaylarde CC., Neilan BA. 2006. Deteriogenic cyanobacteria on historic buildings in Brazil detected by culture and molecular techniques. *International Biodeterioration and Biodegradation* 57:239-243.
- Das M., Royer TV., Leff LG. 2007. Diversity of fungi, bacteria, and actinomycetes on leaves decomposing in a stream. *Applied and Environmental Microbiology* 73(3): 756-767.
- David KAV., Apte SK., Banerji A., Thomas J. 1980. Acetylene reduction assay for nitrogenase activity: chromatographic determination of ethylene per sample less than one minute. *Applied and Environmental Microbiology* 39(5): 1078-1080.
- De los Ríos CA. 2005. Contributions of in situ microscopy to the current understanding of stone biodeterioration. *International Microbiology* 8:181-188.
- De los Ríos CA., Galván V., Ascaso C. 2004. In situ microscopical diagnosis of biodeterioration processes at the convent of Santa Cruz la Real, Segovia, Spain. *International Biodeterioration and Biodegradation* 54:113-120
- De los Ríos A., Cámara B., García del Cura MA., Rico VJ., Galvan V., Ascaso C. 2009. Deteriorating effects of lichen and microbial colonization of carbonate building rocks in the Romanesque churches of Segovia (Spain). *Science of the Total Environment* 407:1123-1134.
- DeAngelis KM., Lindow SE., Firestone MK. 2008. Bacterial quorum sensing and nitrogen cycling in rhizosphere soil. *FEMS Microbiology Ecology* 66:197-207.
- Decho AW. (2000). Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* 20:1257-1273.
- Dick J., De Windt W., De Graef B., Saveyn H., Van der Meeren P., De Belie N., Verstraete W. 2006. Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. *Biodegradation* 17:357-367.

- Diez B., Bauer K., Bergman B. 2007. Epilithic cyanobacterial community of a marine tropical beach rock (Heron Island, Great Barrier Reef): diversity and diazotrophy. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(11):3656-3668.
- Ercole C., Cacchio P., Botta AL., Centi V., Lepidi A. 2007. Bacterially induced mineralization of calcium carbonate: the role of exopolysaccharides and capsular polysaccharides. *Microscopy and Microanalysis* 13:45-50.
- Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. 1992. *The Prokaryotes*. Springer 1(II):534-553.
- Feilden BM. 1982. Conservation of historic buildings. London: Butterworth Architecture, Butterworth-Heinemann LTD [chapter 7]. pp 91-116.
- Fernández L., Rojas N., Roldán T., Ramírez M., Zegarra H. Uribe R., Arce JM. 2006. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicados a la remediación de sitios contaminados. Editorial SEMARNAT. México. pp. 22-27.
- Ferrer MR., Quevedo-Sarmiento J., Rivadeneyra MA., Bejar V., Delgado R., Ramos-Cormenzana A. 1998. Calcium carbonate precipitation by two groups of moderately halophilic microorganisms at different temperatures and salt concentrations. *Current Microbiology* 17:221-227.
- Ferris M., Hirsch CF. 1991. Method for isolation and purification of Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 57(5):1448-1452.
- Fischer SG., Lerman LS. 1983. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*80:1579-1583.
- Friedman LE., Passerini de Rosi BN., Messina MT., Franco MA. 2001. Phenotype evaluation of *Bordetella bronchiseptica* cultures by urease activity and Congo red affinity. *Letters in Applied Microbiology* 33:285-290.
- Gaylarde C., Silva Ribas M., Warscheid Th. 2003. Microbial impact on building materials: an overview. RILEM TC 183-MIB. pp.342-352.
- Gaylarde CC. 2006. Detección polifásica de cianobacterias en biopelículas de monumentos históricos en Brasil. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48(2):193-194

- Gaylarde CC., Gaylarde PM. 2005. A comparative study of the major microbial biomass of biofilms on exteriors of buildings in Europe and Latin America. *International Biodeterioration and Biodegradation* 55:131-139.
- Gaylarde CC., Gaylarde PM., Copp J., Neilan B. 2004. Polyphasic detection of cyanobacteria in terrestrial biofilms. *Biofouling* 20(2):71-79.
- Gaylarde PM., Crispim CA., Neilan BA., Gaylarde CC. 2005. Cyanobacteria from Brazilian building walls are distant relatives of aquatic genera. *OMICS: a Journal of Integrative Biology* 9:30-42.
- González JM., Saiz-Jiménez C. 2005. Application of molecular nucleic acid-based techniques for the study of microbial communities in monuments and artworks. *International Microbiology* 8:189-194.
- Griffin PS., Indictor N., Koestler RJ. 1991. The biodeterioration of stone: a review of deterioration mechanisms, conservation case histories and treatment. *International Biodeterioration* 28:187-207.
- Guiamet P, Crespo M, Lavin P, Ponce B, Gaylarde C, Gómez de Saravia S. 2013. Biodeterioration of funeral sculptures in La Recoleta Cemetery, Buenos Aires, Argentina: Pre- and post-intervention studies. *Colloids and Surface B: Biointerfaces* 101:337-342.
- Gundlapally SR., García-Pichel F. 2005. The community and phylogenetic diversity of biological soil crust in the Colorado plateau studied by molecular fingerprinting and intensive cultivation. *Microbial Ecology* 49(1):51-64.
- 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. *International Biodeterioration and Biodegradation* 46:229-239.
- Hammes F., Boon N., de Villiers J., Verstraete W., Siciliano SD. 2003. Strain specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Applied and Environmental Microbiology* 69(8):4901-4909.
- Hernández-Mariné M, Roldán Molina M. 2012. Biofilms on rocks. *Advances in Pharmaceutical Sciences II*: 1-13 ISBN:978-81-7895-569-8
- Herrera LK., Arroyave C., Guiamet P., Gómez de Saravia S., Videla H. 2004. Biodeterioration of peridotite and other constructional materials building of the

- Colombian cultural heritage. *International Biodeterioration and Biodegradation* 54:135-141.
- Herrera LK., Arroyave C., Videla HA. 2003. Atmospheric and biological deterioration of two churches from the cultural heritage of the city of Medellín, Colombia, In: *Molecular Biology and Cultural Heritage*. Edited by C. Saiz Jiménez. Lisse. The Netherlands: A.A. Balkema Publishers. pp. 271.
- Jimenez-Lopez C., Rodriguez-Navarro C., Piñar G., Carrillo-Rosúa FJ., Rodriguez-Gallego M., Gonzalez-Muñoz MT. 2007. Consolidation of degraded ornamental porous limestone Stone by calcium carbonate precipitation induced by the microbiota inhabiting the Stone. *Chemosphere* 68:1929-1936.
- Jroundi F., Fernández-Vivas A., Rodríguez-Navarro C., Bedmar EJ., González-Muñoz MT. 2010. Bioconservation of deteriorated monumental calcarenite Stone and identification of bacteria with carbonatogenic activity. *Environmental Microbiology* 60:39-54.
- Kiel G., Gaylarde CC. 2007. Diversity of salt-tolerant culturable aerobic microorganisms on historic buildings in Southern Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23:363-366.
- Kiel G., Gaylarde CG. 2006. Bacterial diversity in biofilms on external surfaces of historic buildings in Porto Alegre. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22:293-297.
- Knorre H., Krumbein WE. 2000. Bacterial calcification. In: Riding RE and Awramik SM (Eds), *Microbial Sediments*. Springer-Verlag, Berlin. pp 25-31.
- Lamenti G., Tiano P., Tomaselli L. 2000. Biodeterioration of ornamental marble statues in the Boboli Gardens (Florence, Italy) *Journal of Applied Phycology* 12: 427-433.
- Lan W., Li H., Wang WD., Katayama Y., Gu JD. 2010. Microbial community analysis of fresh and old microbial biofilms on bayon temple sandstone of Angkor Thom. *Microbial Ecology* 60:105-115.
- Madigan MT., Martinko JM., Parker J. 2006. *Brock, Biología de los microorganismos*. Pearson, Prentice Hall. pp. 601-603.
- Marker A. 1972. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshwater Biology* 2:361-384.

- Marshall P. 1935. Acid rocks of Taupo-Rotorua volcanic district. Transactions and Proceedings of the Royal Society of New Zealand 1868-196164:323-375.
- May LA., Smiley B., Schmidt MG. 2001. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. Canadian Journal of Microbiology 47:829-841.
- McCormack K., Morton LH., Benson JG., Osborne BN., McCabe RW. 1996. A preliminary assessment of concrete biodeterioration by microorganisms. Proceedings LABS 2, Biodeterioration & Biodegradation in Latin America. Porto Alegre, Brazil. pp.68-70
- Miller AZ., Laiz L., Gonzalez JM., Dionisio A., Macedo MF., Saiz-Jimenez C. 2008. Reproducing stone monument photosynthetic-based colonization under laboratory conditions. Science of the Total Environment 405:278-285.
- Miller AZ., Sanmartín P., Pereira-Pardo L., Dionisio A., Saiz-Jimenez C., Macedo M.F., Prieto B. 2012. Bioreceptivity of building stones: A review. Science of the Total Environment 426:1-12.
- Myers RM., Maniatis T., Lerman LS. 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. Methods in Enzymology 155:501–527.
- Natarajan KR. 1995. Kinetic study of the enzyme urease from *Dolichos biflorus*. Journal of Chemical Education 72(6):556-557.
- Navarro SLM., Martínez MW., Espinoza MA. 2007. Análisis de materiales. Segunda edición. UMSNH. Facultad de ingeniería civil. Capítulo III.
- Nübel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. Applied and Environmental Microbiology 63(8):3327-3332.
- Nuhoglu Y., Oguz E., Uslu H., Ozbek A., Ipekoglu B., Ocak I., Hasenekoglu I. 2006. The accelerating effects of the microorganisms on biodeterioration of stone monuments under air pollution and continental-cold climatic conditions in Erzurum, Turkey. Science of the Total Environmental 364: 272-283.
- O'Donnell GA., Whiteley SA. 1999. "Fluorescent In situ Hybridation" and the analysis of the single cell. In C. Edwards (ed). Methods in biotechnology environmental monitoring of bacterial. Humana Press Inc. Totowa, NJ. 12:221-236.

- O'Toole G., Kaplan HB., Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology* 54:49-79.
- Ohki K., Fujita Y. 1988. Aerobic nitrogenase activity measured as acetylene reduction in the marine non-heterocystous cyanobacterium *Trichodesmium* spp. grown under artificial conditions. *Marine Biology* 98: 111-114.
- Ortega-Morales BO. 2006. Cyanobacterial diversity and ecology on historic monuments in Latin America. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48(2):188-191.
- Ortega-Morales BO., Guezennec J., Hernández-Duque G., Gaylarde CC., Gaylarde PM. 2000. Phototrophic biofilms on ancient Mayan buildings in Yucatan, Mexico. *Current Microbiology* 40(2):81-5.
- Ortega-Morales BO., Lopez-Cortes A., Hernandez-Duque G., Crassous P., Guezennec J. 2001. Extracellular polymers of microbial communities colonizing ancient limestone monuments. In "Methods in Enzymology. Microbial Growth in Biofilms Part A: Developmental and Molecular Biological Aspects" (R.J.Doyle, Ed) 336:331-339. Academic Press, San Diego.
- Ortega-Morales BO.1999. Approche des communautés microbiennes et leur rôle dans la biodeterioration des monuments Mayas du site archéologique d'Uxmal (Yucatán, Mexique). PhD Thesis.France: University of Brest, Brest.
- Ostrooumov M. 2001. Mineralogía Avanzada México: conceptos, resultados futuras investigaciones. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Mineralogía* 14:7-16.
- Papida S., Murphy W., May E. 2000. Enhancement of physical weathering of building stones by microbial populations. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 46:305-317.
- Peter Ma., Muntean A., Meier SA., Böhm M. 2008. Competition of several carbonation reactions in concrete study. *Cement and Concrete Research* 38(12):1385-1393.
- Pinna D. 1993. Fungal physiology and the formaton of calcium oxalate films on stone monuments. *Aerobiologia* 9:157-167.
- Phillips AJ., Lauchnor E., Eldring JJ., Esposito R., Mitchell AC., Gerlach R., Cunningham AB., Spangler LH. 2013. Potential CO<sub>2</sub> leakage reduction through biofilm-induced calcium carbonate precipitation. *Environmental Science and Technology* 47:142-149.

- Prieto B., Silva B. 2005. Estimation of the potencial bioreceptivity of granitic rocks from their intrinsic properties. *International Biodeterioration and Biodegradation* 56:206-215.
- Prieto B., Silva B., Álvarez AL. 2006. Toward a definition of a bioreceptivity index for granitic rocks: Perception of Change in appearance of the rock. *International Biodeterioration and Biodegradation* 58:150-154.
- Qi-Wang., Guang-You Ma, Lin-Yan He, Xia-Fang Sheng. 2011. Caracterización of bacterial community inhabiting the surface of weathered bricks of Nanjing Ming city walls. *Science of the Total Environment* 409(4):756-762.
- Radha AV., Forbes TZ., Killian CE., Gilbert PUPA., Navrotsky A. 2010. Transformation and crystallization energetic of synthetic and biogenic amorphous calcium carbonate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(38):16438–16443.
- Ribas SM. 1995. Biological deterioration of concrete observed 61 in Brazilian Structures. *International Journal for Restoration of Buildings* 1(2):153-157.
- Rodriguez-Navarro C, Jroundi F, Schiro M, Ruiz-Agudo E, González-Muñoz MT. 2012. Influence of substrate mineralogy on bacterial mineralization of calcium carbonate: implications for stone conservation. *Applied and Environmental Microbiology* 78:4017-4029.
- Saiz-Jiménez C. 1997. Biodeterioration vs Biodegradation: the role of microorganisms in the removal of pollutants deposited on historic buildings. *International Biodeterioration and Biodegradation* 40(2):225-232.
- Sanders L. 1998. *A manual of field hydrogeology*. Prentice-Hall. pp. 381
- Santander GR. 1968. *Técnicas de microscopía electrónica en biología*. Editorial Aguilar.
- Scheerer S., Ortega-Morales O., Gaylarde C. 2009. Microbial deterioration of stone monuments-an updated overview. Chapter 5. *Advances in Applied Microbiology*. (66):105-114.
- Schuman R., Häubner N., Klausch S., Karsten U. 2005. Chlorophyll extraction methods for the quantification of green microalgae colonizing building facades. *International Biodeterioration and Biodegradation* 55:213-222.

- Shirakawa MA., Loh K., John VM., Silva MES., Gaylarde CC. 2011. Biodeterioration of painted mortar surfaces in tropical urban and coastal situations: Comparison of four paint formulations. *International Biodeterioration and Biodegradation* 65:669-674.
- Slöstrand SF. 1967. *Electron Microscopy of cells and tissue. Instrumentation and techniques.* Edit. Academic Press. New York. Vol 1.
- Sondi I., Matijevic E. 2001. Homogeneous precipitation of calcium carbonates by enzyme catalyzed reaction. *Journal of Colloid and Interface Science* 238:208-214.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2731-2739.
- Taylor S., May E. 1991. Detection of specific bacteria on stone using an enzyme-linked immunosorbent assay. *International Biodeterioration and Biodegradation* 34:155-167.
- Taylor S., May E. 1994. Detection of specific bacteria on stone using an enzyme linked immunosorbent assay. *International Biodeterioration and Biodegradation* 34(2):155-167.
- Tiano P. 2002. *Biodegradation of Cultural Heritage: Decay Mechanisms and control methods.* Centro di studio sulle "Cause Deterioramento e Metodi Conservazione Opere d'Arte" Via G. Capponi 9, 50121 Firenze, Italy.
- Tomaselli L., Lamenti G., Bosco M., Tiano P. 2000. Biodiversity of photosynthetic micro-organisms dwelling on stone monuments. *International Biodeterioration and Biodegradation* 46:251-258.
- Turner S., Pryer KM., Miao VPM., Palmer JD. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46:327-338.
- UNESCO. Centro de información de las Naciones Unidas. [whc.unesco.org](http://whc.unesco.org)
- Valdés M., Pérez NO., Estrada de los Santos P., Caballero-Medallo J., Peña-Cabriales JJ., Normand P., Hirsch AM. 2005. Non-Frankia Actinomycetes isolated from surface-sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology* 71(1):460-466.



Videla HA. 1998. Biodeterioration of the Ibero American cultural heritage. A problem to be solved. Proceedings LATINCORR/98. Paper No. S11-02. Pp. 5. Cancún, México.

Videla HA., Guiamet PS., Gómez de Saravia S. 2000. Biodeterioration of Mayan archaeological sites in the Yucatan peninsula, México. *International Biodeterioration and Biodegradation* 46:335-341.

Videla HA., Guiamet PS., Gómez de Saravia SG. 2003. Biodeterioro de materiales estructurales de sitios arqueológicos de la civilización maya. *Revista del Museo de La Plata. Publicación Técnica Didáctica.* 44:1-11.

Walter JJ., Pace NR. 2007. Phylogenetic composition of rocky mountain endolithic microbial ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* 73(11):3497-3504.

Warscheid T., Braams J. 2000. Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 46:343-368.

Warscheid T., Oetling M., Kumbrein WE. 1991. Physico-chemical aspects of biodeterioration processes on rocks with special regard to organic pollutants. *International Biodeterioration* 28:37-48.

Wasserbauer R., Zadak Z., Novotny J. 1988. Nitrifying bacteria on the asbestos-cement roofs of stable buildings. *International Biodeterioration and Biodegradation* 24:153- 165.

Yu Z., Morrison M. 2004. Comparisons of different hypervariable region of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-Denaturing Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 70(8):4800-4806.

Zamarreño DV., Inkpen R., May E. 2009. Carbonate crystals precipitated by freshwater bacteria and their use as a limestone consolidant. *Applied and Environmental Microbiology* 75(18): 5981-5990.

Zanardini E., Abbruscato P., Ghedini N., Realini M., Sorlini C. 2000. Influence of atmospheric pollutants on the biodeterioration of stone. *International Biodeterioration and Biodegradation* 45: 35-42.

[www.conaculta.gob.mx/turismocultural/destino\\_mes/morelia/](http://www.conaculta.gob.mx/turismocultural/destino_mes/morelia/) Página consultada el 25 de agosto de 2013.

[www.smn.conagua.gob.mx](http://www.smn.conagua.gob.mx) Servicio meteorológico nacional. 2013. Avenida observatorio 192, colonia observatorio, delegación Miguel Hidalgo, C.P. 11860.

## 12.- ANEXOS

### Anexo 1. Preparación de muestras para secado en punto crítico.

#### Procedimiento:

- A la muestra depositada en tubo de plástico de 1.5 mL, agregar glutaraldehído 2.5% hasta cubrirla y dejar por 24 horas.
- Sustituir el glutaraldehído por amortiguador de fosfatos 0.1 M, a pH 7.3, hasta eliminar el olor a glutaraldehído.
- Sustituir el amortiguador por una solución de tetraóxido de osmio al 2% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M a pH 7.4. El tetraóxido de osmio es un fijador secundario para lípidos. La mezcla se mantiene por 2 horas.
- Realizar lavados de las muestras con alcohol-agua a diferentes porcentajes; 30, 40, 50, 70, 80, 90 % y etanol absoluto. Se llevan a cabo dos lavados con cada una de estas mezclas permitiendo que las muestras se mantengan sumergidas en el líquido por 15 minutos aproximadamente.
- Una vez que las muestras se encuentran en alcohol absoluto, estas son depositadas en cámaras de desecación con papel Whatman # 42.
- Las cámaras con la muestra se mantienen sumergidas en etanol para evitar que estas se sequen.
- Las cámaras listas son depositadas en el desecador para sustituir el alcohol por CO<sub>2</sub> líquido y éste último por CO<sub>2</sub> gas por el método del punto crítico. El secado es realizado según la técnica reportada por Santander 1968 y Slöstrand 1967.

Una vez que las muestras están secas son montadas sobre cinta de carbón adherida a porta muestras de hierro, ya fijas se someten a baños de oro, lo cual nos permite dar a las muestras abultadas mayor firmeza para ser observadas en el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB).

#### Reactivos:

Glutaraldehído al 2.5%: El reactivo se diluye con amortiguador de fosfatos a pH 7.3.  
Amortiguador de fosfatos 0.1 M, a pH 7.3, con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

$$\text{pH} = \text{pk} + \log \left( \frac{[\text{base}]}{[\text{ácido}]} \right) \quad \text{Ecuación 1.}$$

$$[\text{base}] + [\text{ácido}] = \text{molaridad} \quad \text{Ecuación 2.}$$

Despejes y sustituciones:

$$[\text{base}] = \text{molaridad} - [\text{ácido}]$$

$$\text{pH} = \text{pk} + \log \left( \frac{[\text{molaridad} - \text{ácido}]}{[\text{ácido}]} \right)$$

$$\text{pH} - \text{pk} = \log \left( \frac{[\text{molaridad} - \text{ácido}]}{[\text{ácido}]} \right)$$

$\text{antilog}(\text{pH}-\text{pk}) = [\text{molaridad} - \text{ácido}] / [\text{ácido}]$

$\text{antilog}(\text{pH}-\text{pk}) = ([\text{molaridad}] / [\text{ácido}]) - 1$

$[\text{ácido}] = 1/((\text{antilog}(\text{pH}-\text{Pk}))+1)$

**Tenemos:**

$M = \eta / V$  ;  $M = (\text{masa}/\text{PM}) / V$ ; Despejando masa:  $\text{Masa} = M \cdot V \cdot \text{PM}$ .

## **Anexo 2. Preparación de colorantes empleados.**

### **2a) Tinción Gram (Benson 2002)**

Preparación de colorantes:

- Cristal violeta
  - Disolver 0.5 g de cristal violeta (85% seco) en 100 mL de etanol al 85%.
- Lugol
  - Disolver 2 g de yoduro de potasio para 100 mL de agua destilada y agregar 1 g de cristales de yoduro disueltos en alcohol.
- Safranina
  - Se requieren 10 mL de solución de safranina preparada como sigue: 2.55 de safranina en 10 mL de etanol al 95% y se afora a 100 mL con agua destilada.
- Decolorante
  - Se mezclan 300 mL de acetona con 500 mL de etanol.

Preparación de frotis.

Se tomo una gota de la muestra a observar con ayuda de una pipeta pasteur. La muestra fue depositada sobre un portaobjetos y extendida en su centro con un cubreobjetos. La muestra se dejo secar al aire para posteriormente llevar a cabo la tinción, como se describe a continuación.

Técnica de tinción Gram (Madigan y col., 2006)

- Agregar cristal violeta por 1 minuto
- Enjuagar con agua destilada
- Agregar lugol por 1 minuto
- Decolorar con alcohol-acetona
- Agregar safranina por 1 minuto
- Enjuagar con agua corriente
- Observar al microscopio

## 2b) Colorante de azul de algodón o lactofenol

Se prepara la solución de lactofenol como se describe a continuación: se mezclan 100 mL de ácido láctico con 100 g de fenol, 200 mL de glicerol y 100 mL de agua.

Se prepara la solución de algodón con 10 mL de solución saturada de azul de anilina, 10 mL de glicerol y 80 mL de agua.

Después de una noche de reposo en la oscuridad se mezclan las dos soluciones a partes iguales para su uso.

## 2c) Microcultivos para hongos.

Se prepara el medio de cultivo sólido como corresponde. Se vacía en placas para solidificarlo. Una vez sólido se cortan cubos de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> con bisturí estéril. Los cubos son depositados en cajas de petri con un portaobjetos al centro sobre una varilla de vidrio. El cubo de agar es inoculado por las 5 caras disponibles, mediante picadura con el asa. Se depositan aproximadamente 2 mL de agua estéril en el fondo de la caja para mantener condiciones de humedad óptimas para el crecimiento del hongo. El desarrollo de esta actividad se debe realizar en condiciones de esterilidad. Todo el material empleado debe esterilizarse por calor húmedo 120°C por 15 min.

## 2d) Curva de RC para polímeros derivados de D-glucanos.

El colorante RC fue preparado en buffer PBS a pH 7.4, su formulación se muestra a continuación.

Compuesto	g/L
NaCl	27.00
KCl	0.20
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.20

Para la curva control se realizaron diluciones de una solución concentrada de 175 mg/L del colorante, para obtener 9 concentraciones distintas.

<b>RC (mg/L)</b>	<b>Abs 480 nm</b>
43.75	0.73
21.87	0.35
17.50	0.30
10.94	0.17
8.75	0.13
4.37	0.06
2.19	0.03
1.09	0.014
0.55	0.00

La ecuación de la recta obtenida fue;  $y = 0.016x - 0.01$ , con una  $R^2 = 0.999$

### **Anexo 3. Formulación de medio mineral BG11 para cianobacterias y algas**

Medio mineral para autótrofos y suplementos para el aislamiento de heterótrofos.

<b>Componentes medio BG11</b>	<b>g/L</b>
NaNO <sub>3</sub>	1.500
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.030
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.075
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.036
Ácido cítrico	0.006
Citrato férrico amoniacal	0.006
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.020
Polvo de cantera	1.000
Agar noble	10.000
Micronutrientes (contiene EDTA)	1 mL

<b>Suplementos para medio rico</b>	<b>g/L</b>
Peptona de caseína	2.5
Glucosa anhidra	2.5
Extracto de levadura	2.5

**Medio Para Spirulina maxima modificado (Alba y Ogawa, 1977, Schlosser, 1994)**

Componente	Solución stock (g/L)	Cantidad usada (g)	Concentración final en el medio (M)
Solución1:	500 mL	----	---
NaHCO <sub>3</sub>	----	13.61	1.62X10 <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	----	4.03	3.80X10 <sup>-2</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	----	0.50	2.87X10 <sup>-3</sup>
Solución 2:	500 mL	---	---
NaNO <sub>3</sub>	---	2.50	2.94X10 <sup>-2</sup>
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	---	1.00	5.74X10 <sup>-3</sup>
NaCl	---	1.00	1.71X10 <sup>-2</sup>
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	---	0.08	8.11X10 <sup>-4</sup>
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	---	0.04	2.72X10 <sup>-4</sup>
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	---	0.01	3.60X10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O	---	0.08	2.15X10 <sup>-4</sup>
Agar			
Solución de metales traza	(ver abajo)	1 mL	----
Solución de cianocobalamina	(ver abajo)	1 mL	----

**Medio Bristol para algas**

Componente	g/L
NaNO <sub>3</sub>	0.250
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.025
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.075
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.075
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.175
NaCl	0.025
Agar noble	15.000
Proteasa peptona	1.000

Nota: Para favorecer el aislamiento de algas y cianobacterias se empleó el telurito de potasio en una concentración de 10 mg/L en el medio.

**Preparación de solución de micronutrientes**

***Micronutrientes para BG11.***

Preparación: se calientan a ebullición 500 mL de agua destilada y se agregan cada una de las sales de la tabla 12, hasta disolución. Por separado se disuelven 12.5 g de EDTA (disódico) en 250 mL de agua destilada. Las dos soluciones son mezcladas y el pH es ajustado a 6.8 con KOH al 20% (aproximadamente 10 mL de volumen). Finalmente la solución es aforada a 1L. Para su esterilización se emplean filtros de 0.45 µm. La solución estéril debe mantenerse en la oscuridad por 2 días antes de usarse.

Composición de la solución de micronutrientes, empleada para medio BG11.

Compuestos	g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.860
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1.810
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.222
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.439
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.079
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.045

**Metales traza para *Spirulina maxima*.**

Preparación de metales traza:

En 900 mL de agua destilada disolver el EDTA y posteriormente disolver cada uno de los componentes en el orden mostrado y aforar a 1000 mL.

Componente	Solución stock (g/L)	Cantidad usada	Concentración final en el medio (M)
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O	---	0.8 g	2.15X10 <sup>-6</sup>
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	---	0.7 g	2.52X10 <sup>-6</sup>
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1.0	1 mL	3.48X10 <sup>-9</sup>
MnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2.0	1 mL	8.97X10 <sup>-9</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10.0	1 mL	1.62X10 <sup>-7</sup>
Co(NO <sub>3</sub> ) 6H <sub>2</sub> O	1.0	1 mL	3.44X10 <sup>-9</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	1.0	1 mL	4.13X10 <sup>-9</sup>
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.005	1 mL	2.00X10 <sup>-11</sup>

**Cianocobalamina para *Spirulina maxima*.**

Solución stock de cianocobalamina:

Disolver la cianocobalamina en 1000 mL de agua destilada y esterilizar por filtración y almacenar en refrigeración.

Componente	Solución stock (g/L)	Cantidad usada	Concentración final en el medio (M)
Vitamina B <sub>12</sub>	----	5 mg	3.69X10 <sup>-9</sup>



Nota: para preparar el medio para Spirulina maxima las soluciones deben estar estériles y frías, las soluciones 1 y 2 deben mezclarse en cantidades iguales bajo condiciones estériles. La formulación es para la preparación de un litro de medio.

#### **Anexo 4. Condiciones de amplificación para todos los dominios evaluados.**

**Las condiciones de amplificación para el dominio Bacterias para los fragmentos de 521 y 180 pb, fueron;**

1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 15 min

10 ciclos de PCR “touchdown”

- 94°C durante 30 s
- 30 s con un decremento de 0.5°C/ciclo de 61 – 56°C
- 72°C durante 1 min

25 ciclos de PCR normal

- 94°C durante 30 s
- 56°C durante 30 s
- 72°C durante 1 min

Extensión final de 10 minutos a 72°C.

<b>Componente</b>	<b>Reacción de 25 uL</b>
H <sub>2</sub> O	20.375-X
Buffer HotStar Taq (10X)	2.5
dNTPs (10 mM)	0.5
Gc-338f / Bac8f (50 mM)	0.25
Univ529r (50 mM)	0.25
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0.25
BSA (10 mg/mL)	1.0
Enzima HotStar Taq DNA polimerasa (5U/uL)	0.125
DNA	X

Nota: para el cóctel es necesario siempre considerar media reacción de exceso para evitar faltantes, por el pipeteo.

### Condiciones de PCR para cianobacterias;

Las condiciones de amplificación de PCR fueron:

1 ciclo de desnaturalización inicial de 15 minutos a 95°C.

35 ciclos de

- 94°C durante 1 min
  - Alineación a 60°C durante 1 min
  - Extensión a 72°C durante 1 min
- Extensión final de 10 minutos a 72°C

Las condiciones de reacción de PCR fueron:

Componente	1 reacción de 25 UI
H <sub>2</sub> O	20.375-X
Buffer HotStar Taq (10X)	2.5
dNTPs (10 mM)	0.5
Gc-Cya359f (50 uM)	0.25
Cya781r (50 uM)	0.25
BSA (10 mg/mL)	1.0
Enzima HotStar Taq DNA polimerasa (5U/uL)	0.125
DNA	X

### Condiciones de PCR para hongos, DGGE

Las condiciones de amplificación para PCR fueron:

1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 15 min.

36 ciclos de

- 94°C durante 30 s
  - 55°C durante 30 s
  - 72°C durante 1 min
- Extensión final a 72°C durante 5 min

Las condiciones de reacción de PCR fueron:

Componente	1 reacción de 25 uL
H <sub>2</sub> O	17.875-X
Buffer HotStar Taq (10X)	2.5
dNTPs (10 mM)	0.5
NS1f (50 uM)	0.25
Gc-fungr ó fungr (50 uM)	0.25
BSA (10 mg/mL)	1.0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2.5
Enzima HotStar Taq DNA polimerasa (5U/uL)	0.125
DNA	X

### Condiciones de PCR para hongos, secuenciación;

Las condiciones de amplificación de PCR fueron:

1 ciclo de desnaturalización inicial de 15 minutos a 95°C

35 ciclos de

- 94°C durante 30 seg
- Alineación a 56°C durante 45 seg
- Extensión a 72°C durante 130 seg

Extensión final a 72°C por 10 minutos.

Las condiciones de reacción de PCR fueron:

Componente	1 reacción de 25 uL
H <sub>2</sub> O	17.875-X
Buffer HotStar Taq (10X)	2.5
dNTPs (10 mM)	0.5
Euk1Af (50 uM)	0.25
Gc-Euk516r ó Euk516r (50 uM)	0.25
BSA (10 mg/mL)	1.0
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2.5
Enzima HotStar Taq DNA polimerasa (5U/uL)	0.125
DNA	X

### Condiciones de PCR para 18S de algas y levadura para secuenciar;

Las condiciones de amplificación de PCR fueron:

1 ciclo de desnaturalización inicial de 2 min a 95°C.

30 ciclos de

95°C por 15 segundos

50°C por 15 segundos

72°C por 2 minutos

1 ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos.

<b>Componente</b>	<b>1 reacción de 25 uL</b>
H <sub>2</sub> O	20.375-X
Buffer HotStar Taq (10X)	2.5
dNTPs (10 mM)	0.5
EukA (50 uM)	0.25
EukB (50 uM)	0.25
BSA (10 mg/mL)	1.0
Enzima HotStar Taq DNA polimerasa (5U/uL)	0.125
DNA	X

**Las condiciones de amplificación de PCR para secuenciación de bacterias fueron;**

1 ciclo de desnaturalización inicial de 15 minutos a 95°C

25 ciclos de

- 94°C 1 minuto
- Alineación 56°C 30 segundos
- Extensión 72°C un minuto

Extensión final 72°C por 10 minutos.

Las condiciones de reacción de PCR fueron:

<b>Componente</b>	<b>1 reacción de 25 uL</b>
H <sub>2</sub> O	20.375-X
Buffer HotStar Taq (10X)	2.5
dNTPs (10 mM)	0.5
Bac8f (50 uM)	0.25
1492 (50 uM)	0.25
BSA (10 mg/mL)	1.0
Enzima HotStar Taq DNA polimerasa (5U/uL)	0.125
DNA	X

**Condiciones de amplificación para clonación e identificación de aislados.**

1 ciclo de desnaturalización a 94°C por 15 minutos

30 ciclos

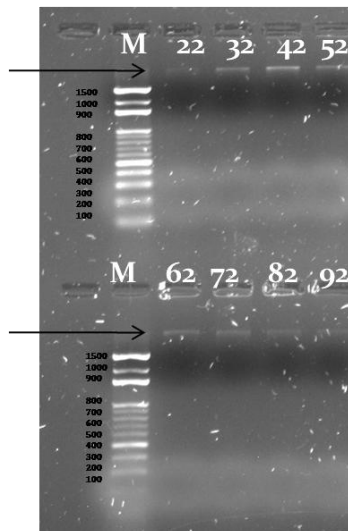
- 94°C por 1 min
- 55°C por 1 min
- 72°C por 2 min

Extensión final a 72°C por 10 minutos

Componente	1 reacción de 25 uL
H <sub>2</sub> O	18.5
Buffer 1x sin MgCl <sub>2</sub>	2.5
dNTPs (10 mM)	0.5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0.75
F24 (uM)	0.25
R22 (uM)	0.25
Taq DNA polimerasa (5U/uL)	0.25
Plásmido	2

## Anexo 5. Imágenes en gel de agarosa y concentración de metagenomas.

Gel de agarosa con muestras de DNA extraído de biopelículas del segundo muestreo, muestras 22, 32, 42, 52, 62 y 92 corresponden a cantera. Las muestras 72 y 82 corresponden a morteros.



Las concentraciones de los metagenomas obtenidos para el segundo muestreo se presentan en la siguiente tabla.

Sitio	ng/ $\mu$ L	260/280	260/230	Sitio	ng/ $\mu$ L	260/280	260/230
CAT22	0.4	1.15	0.07	CAT62	2.6	1.04	0.41
CAT32	6.1	1.09	0.45	CAT92	1.1	1.27	0.07
CAT42	1.2	1.13	0.04	CAT72	0.9	5.7	0.02
CAT52	1.1	1.2	0.03	CAT82	1.5	1.19	0.21

## Anexo 6. Electroforesis en geles de acrilamida con gradiente desnaturante (DGGE).

Para llevar a cabo el DGGE los geles paralelos contienen un gradiente de concentración de desnaturante del DNA (formamida+urea) el cual se incrementa linealmente de la parte alta a la parte baja del gel. En su parte alta, los geles contienen pozos para cargar las muestras a analizar. Para el análisis de comunidades microbianas, se utiliza primero un gradiente amplio de 30 a 60% de desnaturante. Posteriormente y dependiendo de la posición de las bandas en el gel, se puede utilizar un gradiente menos amplio para lograr una mejor separación.

El porcentaje de poliacrilamida en el gel depende del tamaño de los productos de PCR a separar, según la siguiente tabla:

Acrilamida	Rango de separación (pb)
6	300-1,000
8	200-400
10	100-300

Preparación de soluciones:

Después de haber definido el porcentaje de acrilamida y de agentes desnaturantes se preparan las soluciones desnaturantes alta y baja según las siguientes tablas:

Acrilamida	6%	8%	10%	12%
Acrilamida/bis acrilamida 40% (mL)	15	20	25	30
TAE 50X (mL)	2	2	2	2
Formamida (mL)	-	-	-	-
Urea (g)	-	-	-	-
Agua desionizada (mL)	c.s.p 100	c.s.p 100	c.s.p 100	c.s.p 100
Volumen total (mL)	mL	mL	mL	mL
	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL

Desnaturalizante	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Formamida (mL)	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
Urea (g)	0	4.2	8.84	12.6	16.8	21	25.2	29.4	33.6	37.8	42

Una vez preparadas las soluciones se filtran usando un filtro con diámetro de poro de 0.22 - 0.45  $\mu\text{m}$ , se desgasifican durante 10-15 minutos y se conservan a +4°C y fuera del contacto con la luz durante un mes aproximadamente.

Preparación de los geles:

- Limpiar los cristales, los espaciadores y el peine con detergente y enjuagar con agua destilada.
- Enjuagar los cristales con etanol y secarlos.
- Montar los cristales en el sistema de ensamblaje siguiendo el protocolo descrito en el manual de BIO-RAD.
- Verificar que el sistema de ensamble y los cristales se encuentre nivelado en la superficie con una burbuja niveladora.
- Verificar que exista espacio suficiente para introducir las soluciones de alta y baja y que el peine entre bien entre los cristales con la "tarjeta de alineamiento". Tener cuidado de no apretar demasiado los cristales pues de lo contrario no entrará el peine al momento de introducirlo.
- Enjuagar las jeringas, tuberías y aguja del sistema formador de gradiente con agua destilada.
- Ajustar el sistema formador de gradiente a la graduación 15 para jeringas de 30 ml.
- Montar el sistema formador de gradiente con sus jeringas y tuberías y probarlo con agua MilliQ.
- Preparar el persulfato de amonio (PSA) al 10% en el momento (0.1g PSA/mL agua MilliQ).
- Preparar las soluciones desnaturalizantes alta y baja en dos tubos falcon de 50 mL.
- Llenar las jeringas con las soluciones "Alta" y "Baja", eliminando todo el aire de las jeringas y ajustar a 17 ml de líquido.
- Poner las jeringas en posición en el sistema formador de gradiente: "Alta" en High density solution (top filling) y "Baja" en Low density solution (top filling).
- Girar la rueda del sistema formador de gradiente para sacar el aire de las tuberías y llenar la cavidad de los cristales.
- Colocar el peine.
- Dejar el gel para que polimerice por aproximadamente 90 minutos. En este tiempo, preparar el tanque de electroforesis y precalentar el buffer de corrida (TAE 1x).
- Vaciar el buffer de corrida en el tanque y dejar calentar unos 90 minutos a +60°C.
- Una vez polimerizados los geles, colocarlos sobre el marco sujetador y adentro del tanque.
- Seguir precalentando el buffer de corrida a +60°C.
- Precalentar el buffer de corrida a +65°C.
- Cargar las muestras con puntas ultra delgadas.
- Correr las muestras a temperatura voltaje y tiempo determinados, según se requiera.
- Colocar el gel en un refractario y teñirlo con nitrato de plata.
- Tomar la foto en un fotodocumentador.

### Recuperación del DNA contenido en bandas individuales

- Seleccionar y cortar las bandas más representativas con un bisturí.
- Colocar las bandas en tubos Eppendorf estériles de 0.5 ml.
- Agregar 50 – 100  $\mu$ l de agua MilliQ estéril.
- Incubar a 37 °C por 1 hora y posteriormente a 4 °C por 24 horas.
- Conservar a -20°C.
- Re-amplificar.

#### **Re-amplificación del DNA recuperado de cada una de las bandas individuales**

- Utilizar 10  $\mu$ L del DNA recuperado de cada banda en una reacción de PCR de 50  $\mu$ L.
- Re-amplificar por PCR utilizando los mismos primers que en la reacción de PCR original (sin grapa GC si es para clonar y con grapa GC si es para volver a someter a DGGE).

#### **Condiciones de separación de DGGE.**

Para Bacterias y cianobacterias fueron; gradiente desnaturizante 30 - 60%. 6% de acrilamida. Condiciones de corrida; 60°C por 15 horas y 75 volts. Para Eukaryas; gradiente desnaturizante 20 – 35 %. 8% de acrilamida. Condiciones de corrida; 60°C por 5 horas y 200 volts.