

Metodología para la evaluación del estado de conservación de obras monumentales en piedra en relación a fenómenos de bioalteración



La piedra ha sido utilizada ampliamente como material básico en la construcción de obras monumentales por tener una durabilidad mayor que otros materiales. A pesar de ello, el estar continuamente sometida al ataque por parte de la naturaleza hace que sufra una serie de daños que se manifiestan a través de diferentes indicadores de alteración. Dentro del conjunto de factores de alteración deben tenerse en cuenta una serie de organismos vivos (1,2,3,4,5) como bacterias, actinomicetos, algas, líquenes, musgos, hongos, plantas superiores, animales y hombre; la capacidad bioalterante de los mismos ya ha sido demostrada bajo condiciones de laboratorio (6,7,8,9,10,11,12). En el estudio del estado de conservación de obras monumentales de piedra se incluye la comprobación de la presencia de los agentes bioalterantes, o de sus productos metabólicos, sobre las superficies alteradas. Para ello, y dependiendo del tipo de biodeteriígeno, será necesario llevar a cabo ensayos de laboratorio que permitan, de una forma directa o indirecta, establecer la naturaleza de tal biodeteriígeno, o simplemente bastará con un examen visual para su identificación. Además de esta tarea, se hace necesario realizar en el laboratorio ex-

periencias que permitan concluir de forma inequívoca que efectivamente la presencia de esos organismos está provocando un proceso de bioalteración. No obstante, antes de abordar la investigación a la que se acaba de hacer referencia es preciso llevar a cabo un estudio previo y completo del Monumento u Obra que se va a abordar. Estudio que permitirá evaluar de forma más correcta la acción de los biodeteriígenos y los posibles trabajos de conservación a efectuar.

INVESTIGACIÓN PRELIMINAR

Historia del Monumento

Previamente a cualquier otro tipo de investigación, se debe hacer una recopilación de todos los datos históricos existentes y que conciernen de forma característica al Monumento elegido. Esta información, lo más completa posible, debe referirse básicamente a:

Susana García
Antonio Martín
Departamento de
Química y Edafología
Facultad de Ciencias.
Universidad de Navarra

- Descripción del edificio o edificios.
- Historia constructiva del Monumento, reflejando si es posible el origen de los materiales y cualquier otro tipo de dato que se considere de interés.
- Obras de conservación que han sido acometidas sobre él.
- Acontecimientos catastróficos que hayan afectado de forma directa al Monumento (guerras, terremotos, explosiones, incendios...).

Caracterización de los Materiales de Construcción

Que el desarrollo de organismos sea más o menos intenso depende entre otros factores de la naturaleza del sustrato (13, 14); así, el tipo de minerales presentes, el pH o la presencia de sustancias orgánicas han sido apuntados como grandes condicionantes. Por otra parte, las diferentes características químicas, petrográficas o mecánicas de los sustratos hacen que sean más o menos sensibles al ataque por parte de los organismos.

Por ello, y siempre que sea posible tomar muestras significativas del material pétreo, deberá hacerse un análisis completo que incluye (15, 16, 17):

- Caracterización mineralógico-petrográfica
- Caracterización química
- Caracterización física
- Análisis porométrico
- Análisis mecánico

Caracterización del Ambiente

Al igual que la naturaleza del sustrato, las condiciones ambientales representan, indiscutiblemente, un factor determinante en el desarrollo de organismos, afectando su presencia tanto cuantitativa como cualitativamente (14, 18, 19). De ahí, la necesidad de realizar un estudio a este nivel. Dentro de la caracterización del ambiente cabe distinguir:

Localización geográfica

Debe reseñarse claramente la posición geográfica que ocupa el Monumento en estudio:

- Localidad, provincia, región, nación
- Coordenadas geográficas: latitud, longitud, altitud
- Tipo de zona: rural, industrial, urbana...

Características climatológicas de la zona

Deberá incluir aquellos parámetros físicos más significativos del ambiente exterior en el que se ubica la Obra:

- Temperatura
- Humedad relativa
- Radiación solar
- Intensidad y dirección del viento
- Precipitaciones

Grado de contaminación ambiental

El grado de contaminación atmosférica deberá ser evaluado en base a la concentración de contaminantes (SO₂, partículas en suspensión, acidez...) aportada por la fuente de datos más próxima al lugar:

Características ambientales locales

En este caso nos referimos a las circunstancias que, de forma general, pueden modificar localmente las condiciones ambientales propias de la zona. Son de interés aquellas que afectan a la humedad, insolación y contaminación, de especial significación en los procesos biológicos. Deberá por lo tanto hacerse referencia a:

- Presencia en las proximidades de ríos, fuentes, pozos...
- Presencia contigua de jardines, arboledas...
- Características arquitectónicas, tanto del propio Monumento como de las edificaciones contiguas.
- Presencia de fuentes de contaminación presentes en las inmediaciones (tráfico, calefacciones, actividad industrial, actividad agrícola o ganadera...).

Dada la importancia de los factores ambientales y puesto que localmente pueden existir diferencias significativas, resulta adecuado la determinación de parámetros (temperatura, humedad, contaminantes...) en la propia área de estudio.

TRABAJO DE CAMPO

Un paso importante a la hora de llevar a cabo un trabajo de investigación, en cuanto a fenómenos de bioalteración y en consecuencia en previsión de posibles tratamientos, es la observación in situ de las manifestaciones de vida macroscópica y los indicadores de alteración biológicos o con posible origen biológico.

En cuanto a las manifestaciones de vida macroscópica, el trabajo de campo permite reconocer a simple vista las especies más comunes de tanto plantas superiores, líquenes como musgos. No obstante, aquellas especies cuya identificación presenta mayores problemas requiere de una recolección y posterior clasificación en el laboratorio.

La observación detenida del monumento permitirá estimar la abundancia relativa de unos y otros organismos y su distribución en relación a las diferentes condiciones ambientales locales existentes en el Monumento (20, 21); pudiéndose establecer índices de abundancia-dominancia y sociabilidad (22).

En cuanto al establecimiento de los indicadores de bioalteración, o manifestaciones en la piedra de una acción alterante por parte de organismos vivos, deberán consultarse las clasificaciones propuestas (15, 23)

Toda la información a que se ha hecho referencia deberá ser sintetizada gráficamente mediante:

- Documentación fotográfica.
- Utilización de planos sobre los que reflejar, mediante símbolos adecuados, la distribución de los distintos indicadores.

INVESTIGACIÓN DE LA PRESENCIA DE ORGANISMOS SOBRE MATERIAL PÉTREO ALTERADO

Como ya ha sido comentado, dependiendo de cual sea la naturaleza de los organismos que se sospecha puedan ser responsables de un fenómeno de bioalteración, será necesario llevar a cabo una serie de análisis que permitan establecer si es así o no.

Los métodos utilizados por los diferentes autores son variados y no existe un criterio o protocolo básico al que someterse. Cabe distinguir entre lo que podríamos llamar métodos directos de estimación de organismos y métodos indirectos, según se compruebe la presencia directa de los agentes bioalterantes o de sus productos metabólicos, actividad bioquímica..., respectivamente.

Toma de Muestras

La toma de muestras se lleva a cabo, generalmente, en aquellos lugares donde es evidente la alteración del sustrato (21, 24).

La cantidad de muestra a tomar dependerá del tipo de determinación que se desee efectuar. Se hará de una forma que se elimine una porción del sustrato tal que nos permita realizar el análisis, al mismo tiempo que resulte lo menos dañina para el Monumento (21), estableciendo un compromiso con la posibilidad de que algunas especies puedan pasar inadvertidas.

La forma de tomar la muestra dependerá del tipo de biodeteriogeno, alteración y estructura pétreo de que se trate (escultura, muro, relieve...)

En general, las muestras se toman rascando o haciendo palanca con la ayuda de un escalpelo o espátula, coleccionándose el material obtenido sobre placas de Petri o cualquier otro tipo de recipiente estéril, que se etiqueta debidamente y se lleva al laboratorio para su posterior análisis (25). En el caso de que el material sea pulverulento puede tomarse con la ayuda de un pincel.

Todas las operaciones de muestreo se realizarán, salvo que se trate de la recolección de plantas superiores u organismos de tamaño macroscópico para su clasificación, bajo condiciones lo más estériles posibles.

Métodos de Estimación Directa

Microscopía

La microscopía es una técnica empleada principalmente para evaluar la acción alterante de los organismos mediante el estudio, para ello, de la interfase sustrato-organismo. Por otra parte, permite establecer casi inmediatamente el tipo y morfología de los organismos presentes, salvando así la dificultad que otras técnicas, como la de cultivos, tan ampliamente utilizada en este campo, plantean en cuanto que pueden darse falsos negativos (26).

Utilizada también, aunque menos frecuentemente, para llevar a cabo estimaciones cuantitativas de la carga microbiana de un sustrato, utilizando cámaras de recuento (13, 18), presenta el inconveniente de que estos recuentos directos pueden incluir organismos no viables (27).

Las técnicas microscópicas incluyen microscopía óptica o de luz y microscopía electrónica. En el primer caso, las muestras pueden ser observadas directamente en fresco o pueden ser montadas, previa tinción o no, para su observación. La microscopía electrónica requiere de una serie de pasos más o menos complicados previos a la observación (28, 29, 30, 31, 32).

Cuando se pretende estudiar las características estructurales del sustrato, se requiere una consolidación previa del material que conserve dichas estructuras (33, 34).

Dentro de la microscopía óptica, se ha empleado microscopio óptico, microscopio mineralógico, microscopio de contraste de fases y microscopio de luz polarizada; y dentro de la microscopía electrónica, microscopio electrónico de barrido (SEM) y microscopio electrónico de transmisión (TEM).

En la bibliografía, se observa como la mayoría de los estudios de microscopía van acompañados de ensayos que establecen la composición química de la muestra, principalmente difracción de rayos X (XRD) (30, 34, 35, 36, 37, 38, 39) y microsonda electrónica (40, 41).

Métodos microbiológicos

• Recuento del número de unidades formadoras de colonias

El fin de esta técnica es la identificación y cuantificación de la microflora que se desarrolla sobre la piedra, siendo, al menos en un primer término, una determinación de "poblaciones" caracterizadas por sus funciones bioquímicas, en lugar de una caracterización de especies (42).

Puesto que los grupos funcionales que intervienen en los mecanismos de alteración de las piedras son principalmente las bacterias del ciclo del nitrógeno y del azufre, así como hongos, actinomicetos y algas, es decir, aquellos que se desarrollan sobre el suelo, se aplican las técnicas de microbiología del suelo (42).

El principio general de esta técnica consiste en tomar las muestras de la forma más estéril posible, pulverizarlas en un mortero, suspenderlas en solución fisiológica estéril (1:10), desadsorber las bacterias de la piedra, hacer series de diluciones (orden de dilución 10) y, a partir de tales diluciones, sembrar medios de cultivo específicos e incubarlos, bien a temperatura ambiente o controlada, durante períodos de tiempo variables, en función del tipo de medio y, en consecuencia, del tipo de organismos. Posteriormente, se observa que cultivos dieron resultado positivo y cuales negativo para determinar el número de unidades formadoras de colonias (u.f.c.) por gramo de muestra pulverizada, para lo cual se recurre al método estadístico de Mc Crady, si se trata de cultivos líquidos,

o al recuento en placa, si se trata de medios sólidos. Todas estas operaciones, indudablemente, deben ser realizadas en condiciones estériles (15, 43, 44, 45).

La desadsorción de las bacterias de la superficie de la piedra necesita técnicas que no sean perjudiciales para las células. Aunque la agitación magnética es la más utilizada, se han probado otras técnicas, como tratamientos físicos (sonicación, agitación), tratamientos químicos y surfactantes (25, 44, 46). Comparando su eficacia, se ha llegado a la conclusión de que la mayor eficacia se obtiene mediante un empleo combinado de agitación vigorosa y surfactantes (25).

Actualmente una nueva técnica automatizada, "spiral plating", viene a sustituir a estos laboriosos ensayos manuales, facilitando las investigaciones sin perder precisión (25, 46, 47).

Los medios de cultivo específicos que se emplean pueden ser elaborados en el laboratorio, según las recetas que ofrecen los distintos autores (15, 42, 45, 48, 49), o pueden adquirirse en el comercio bajo una determinada nominación (9, 29, 50, 51, 52).

Algunos autores consideran que esta técnica tiene ciertos inconvenientes. Las investigaciones dan poca información acerca de los microorganismos involucrados en el deterioro y la interpretación de los recuentos es a menudo difícil, debido a la variación entre muestras y a la diferente selectividad de los medios de cultivo (11), además, puede ocurrir que los medios utilizados no permitan establecer la presencia de un determinado organismo (53).

A pesar de estas limitaciones apuntadas, se trata de una técnica muy extendida en el campo de la bioalteración (24, 43, 50, 54, 55, 56, 57, 58, 59) y, frecuentemente, va acompañada de análisis químicos de algunos compuestos como sulfatos, carbonatos, nitratos, nitrógeno orgánico..., que permitan establecer una relación entre los microorganismos identificados y las modificaciones superficiales sufridas por el sustrato (60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70) y/o de técnicas de microscopía (28, 29, 51, 71, 72, 73, 74).

• Obtención de cultivos puros

Se puede proceder, si interesa, a la obtención posterior de cultivos puros, para lo cual se llevan a cabo varios pasos sobre medios de cultivo de enriquecimiento, utilizando como inóculo el tubo positivo de mayor dilución, y posterior siembra en medio con agar (57, 72, 74, 75, 76).

• Técnica de impresión

Para poner de manifiesto la distribución de los microorganismos en la superficie de la piedra, se ha utilizado una técnica de impresión de placa con agar. Básicamente, consiste en colocar directamente el agar sobre la superficie del sustrato e incubarlo para así observar como los distintos microorganismos se distribuyen sobre la piedra (77). Esta técnica no es, sin embargo, útil para obtener datos cuantitativos de poblaciones (78).

• Pruebas fisiológicas

Se han llevado a cabo otros ensayos microbiológicos para evidenciar las características fisiológicas y bioquímicas de los diferentes microorganismos que crecen sobre la piedra:

- Influencia de la temperatura en el crecimiento (60, 72, 79).
- Ensayos enzimáticos y tinciones específicas (oxidasa, catalasa...) (18, 79).
- Experiencias de crecimiento en condiciones oligotróficas y "copiotróficas", para evaluar la influencia de la composición de los distintos medios sobre el crecimiento microbiano (14, 53, 72, 79, 80).
- Evaluación de la posible interdependencia entre los distintos microorganismos, en su crecimiento y en su acción degradativa (53, 81).
- Capacidad de los microorganismos para producir ácidos u otras sustancias (77, 79, 82).

• Recuentos bacterianos en el aire

Puesto que gran parte de los microorganismos presentes en los sustratos pétreos provienen directamente del aire que les circunda, sobre todo aquellos con una alta producción y dispersión de esporas, en algunas ocasiones, fundamentalmente en sitios cerrados, como lugares arqueológicos (83, 84) o salas donde existen problemas de conservación (85), se llevan a cabo análisis de la carga microbiana del aire, con el fin de aclimatar las condiciones de tal forma que esos recuentos disminuyan, o de establecer la influencia de la apertura al público de lugares en cuanto a problemas de conservación.

El ensayo es simple y consiste en retener sobre placas las partículas suspendidas en el aire, que se hace circular a una determinada velocidad, posteriormente se incuban, expresando finalmente el resultado en u.f.c./m³ (86).

Métodos de Estimación Indirecta de Organismos

El examen microbiológico tan ampliamente utilizado, como ya se ha visto, requiere varios días para la obtención de resultados; por ello, en ocasiones, se recurre a otro tipo de ensayos (bioquímicos, histológicos, químicos y fisicoquímicos) que, aunque de manera indirecta, permiten estimar la acción bioalterante en un período relativamente corto.

Por otra parte, la determinación cuantitativa de microorganismos no parece ser la más adecuada para expresar la actividad litoclástica que está teniendo lugar, ya que existen microorganismos litopatógenos y no litopatógenos, al mismo tiempo que el hecho de que se produzca un crecimiento en los cultivos no significa necesariamente que esté actuando un proceso de alteración, sino que, dado el estado metabólico quiescente de algunos microorganismos, únicamente representa un potencial biodeteriorígeno, que se hará real cuando las condiciones sean favorables (87). Sólo utilizando métodos bioquímicos parece posible obtener información a cerca de dicha patogenicidad (88).

Métodos bioquímicos

Los análisis bioquímicos permiten determinar cuantitativamente los productos orgánicos del metabolismo de la lito-microflora y obtener algunos parámetros para evaluar la entidad del proceso de bioalteración que está teniendo lugar.

• *Determinación de ATP por bioluminiscencia*

El ATP es un compuesto que se encuentra en todas las células vivas y que puede ser fácilmente extraído de una muestra. Puesto que el número de microorganismos es proporcional a la cantidad de ATP hallada, se puede, a través de este ensayo, estimar en que grado la microflora se está desarrollando sobre la piedra.

El ensayo consiste en extraer el ATP, hacerlo reaccionar con el reactivo luminiscente (luciferin/luciferasa) y determinar la cantidad de ATP en la muestra mediante el empleo de un aparato de conteo por bioluminiscencia, y tomando como referencia un patrón interno (15, 52, 88).

Permite una cuantificación rápida de los microorganismos que crecen activamente sobre la superficie de los monumentos (89).

• *Determinación de la DBO₅*

Se trata de una modificación del método utilizado para determinar la demanda bioquímica de oxígeno a los cinco días en aguas residuales, y permite valorar la presencia de materia orgánica en los materiales pétreos. Es una medida de la cantidad de oxígeno consumido por los microorganismos al descomponer compuestos orgánicos (90).

El ensayo consiste en incubar en frascos, que contienen una solución determinada, una cantidad conocida de material pétreo pulverizado durante un período de cinco días, y calcular el oxígeno consumido mediante la determinación del oxígeno disuelto antes y después de la incubación (15, 90). Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH)

Con este ensayo se evalúa la entidad de algunos procesos metabólicos, que se pueden considerar como parámetros cuantitativos de la actividad alterante de los microorganismos (88).

Para llevar a cabo este ensayo, se realiza el Test-Fibel Boehringer Mannheim GmbH sobre una muestra previamente liofilizada y desecada al vacío (15, 52, 88, 91).

Métodos histoquímicos

La simplicidad y rapidez de estas técnicas son de gran interés para una primera evaluación de la agresión biológica de los monumentos (92).

• *Determinación de materia cromática con hematoxilina*

Puesto que todos los microorganismos están provistos de material cromático (RNA, DNA, histonas...), una tinción nuclear, como la hematoxilina, es una buena forma para confirmar la presencia de materia viva. La

observación microscópica ofrece, además, en algunas ocasiones, la posibilidad de llevar a cabo un diagnóstico y un reconocimiento de las especies presentes (91). El ensayo es simple y consiste en la tinción de la muestra pulverizada con hematoxilina Carazzi y posterior observación al microscopio (15, 52, 90).

• *Determinación de la actividad enzimática TTC*

Se trata de un ensayo incluso más sencillo que el anterior, en el que la reacción del TTC (sales de trifenil-tetrazolium) pone de manifiesto la actividad enzimática deshidrogenasa. Las reacciones positivas dan lugar a la formación de cristales rojos de formazano allí donde exista esa actividad, lo cual es fácilmente observable al microscopio (15, 90, 93). Determinación histoquímica de lípidos y polisacáridos

La determinación histoquímica de lípidos y mucopolisacáridos en superficies de piedra alteradas permite hacer una evaluación de la agresión biológica que está teniendo lugar:

El ensayo consiste en la utilización de tinciones específicas, tales como Sudan III para grasas neutras, que se tiñen de rojo-naranja; sulfato de Azul Nilo, que tiñe los ácidos grasos de azul y los lípidos neutros de rosa; Azul Alcian 8G, que tiñe los mucopolisacáridos de azul-verde. Después de la tinción las muestras se observan al microscopio óptico (15, 92).

Métodos químicos y fisicoquímicos

La presencia de materia viva sobre los sustratos alterados puede evidenciarse mediante el estudio de distintas especies químicas, resultado de la acción de determinados organismos o producto de su metabolismo.

• *Determinación e identificación de compuestos orgánicos por cromatografía*

Este tipo de ensayos consisten básicamente en la extracción de los compuestos orgánicos de la muestra con distintas mezclas de solventes, dependiendo de la naturaleza de dichos compuestos, y posterior concentración y desarrollo del cromatograma (52, 94).

La identificación de esos compuestos no se corresponde inequívocamente con una presencia microbiana activa sobre el sustrato, sino que el origen de tales sustancias puede ser debido también a restos de una colonización antigua, a la aplicación de algún tratamiento o simplemente a la deposición desde la atmósfera.

Para la extracción, normalmente utilizan mezclas de cloroformo-metanol-agua, hexano-éter etílico o éter de petróleo-éter etílico-ácido acético (15, 95), aunque también se han llevado a cabo extracciones con acetona (34) o dióxido de carbono líquido (96). Para la identificación de compuestos polares, primero se derivatizan (96), normalmente son metilados (60, 97).

Se ha utilizado cromatografía en capa fina (TLC), para la identificación de lípidos (52); cromatografía gaseosa (CG), para fraccionamiento de triglicéridos e identificación de los correspondientes ésteres metílicos (94,

95), y cromatografía gaseosa-espectrómetro de masas (GC-MS), para análisis directo de los extractos (96). También se ha utilizado HPLC para la determinación cualitativa y cuantitativa de los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos (80).

Este tipo de ensayos, que prácticamente no dañan al sustrato, se emplean especialmente sobre esculturas. En tal caso, en lugar de tomar una muestra del sustrato y pulverizarla, la muestra se suele tomar con un algodón hidrófilo impregnado en el solvente del que después, en el laboratorio, se extraen los lípidos y se cromatografían (95).

• **Identificación de pigmentos fotosintéticos por espectrofotometría visible**

La presencia de pigmentos sobre el sustrato está ligada inevitablemente a la existencia sobre el mismo de ciertos organismos autótrofos. La estimación cuantitativa de los primeros será proporcional al número de microorganismos (98).

Para esta identificación, se somete a las muestras a extracción de los pigmentos con acetona, manteniendo la mezcla en el refrigerador y en la obscuridad. Una vez que se han extraído, se eliminan los restos sólidos con centrifugación y se hace un barrido del espectro de absorción, comparando los espectros obtenidos con aquellos de patrones (15, 49, 75).

• **Determinación de ácidos nucleicos y proteínas**

Para ello es necesario, en primer lugar, obtener las células, eliminar los restos minerales, romper esas células y por centrifugación eliminar los restos celulares. Sobre una alícuota se digieren enzimáticamente las proteínas, y los ácidos nucleicos se determinan en función de la densidad óptica a una determinada longitud de onda. Sobre otra alícuota, se determinan las proteínas, también por densidad óptica, pero a distinta longitud de onda (93, 99).

La determinación de estos compuestos es una medida de la biomasa presente en el sustrato (27, 100, 101).

• **Determinación de la cantidad de materia orgánica**

Un método de determinación indirecta consiste en oxidar, en primer lugar, todo el carbono a CO_2 utilizando altas temperaturas y corriente de oxígeno. Ese CO_2 se absorbe por una solución de BaClO_4 , cuyo pH va disminuyendo según absorbe CO_2 . De esta forma se mide el TC (carbono total). Después se determina el TIC (carbono inorgánico total), añadiendo ácido fosfórico y burbujeando oxígeno; el ácido reacciona con los carbonatos para dar CO_2 que se detecta como antes. El TOC (carbono orgánico total) se determina por diferencia entre los anteriores (96).

Otros procedimientos utilizados para determinar la cantidad de materia orgánica presente en una muestra son la oxidación de la muestra con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y su valoración con sal de Mohr (48); la determinación de la variación de peso tras la combustión, pérdida por calcinación (77), y la determinación directamente del peso de las células, tras su separación por centrifugación de los restos minerales (99).

• **Determinación de compuestos inorgánicos**

La finalidad de estos análisis es mostrar la composición química de las muestras alteradas, lo que, junto con los ensayos de microscopía o microbiología, permiten establecer una correlación entre la presencia de organismos y fenómenos de alteración. De hecho, son muchos los autores, como ya se ha apuntado en los apartados microscopía y microbiología, que basan sus conclusiones en esta combinación de técnicas.

Normalmente, los compuestos que con mayor interés se determinan son sulfatos, carbonatos, nitratos, amoníaco y nitrógeno orgánico. Las técnicas empleadas incluyen métodos químicos (61, 102, 103) e instrumentales, entre estos últimos los más utilizados son difracción de rayos X y microsonda electrónica (30, 41, 62, 64, 104). Menos empleada es la espectrofotometría de absorción atómica (105), y de aplicación más reciente la espectroscopía Raman (106, 107, 108).

Métodos Específicos

En el estudio de microorganismos específicos algunos autores aplican metodologías concretas.

Determinación de sulfuro

Dada la movilidad de las bacterias oxidantes de sulfuros, la determinación de su crecimiento por recuento en placa no da resultados fiables; por ello se ha aplicado un nuevo método espectrofotométrico para la determinación de sulfuro de hidrógeno en medio líquido. El ensayo consiste en determinar por medidas de absorbancia como va desapareciendo el SH_2 del medio (99).

Determinación de etileno

La actividad de los microorganismos fijadores de nitrógeno puede ponerse en evidencia mediante la determinación, por cromatografía gaseosa, del etileno producido en la reducción del acetileno por las nitrogenasas (15, 49).

EXPERIENCIAS PARA LA ESTIMACIÓN DE LA CAPACIDAD BIOALTERANTE DE LOS ORGANISMOS

Mediante diversas experiencias de laboratorio, puede estudiarse la acción de los diferentes agentes biológicos sobre los materiales pétreos y establecer así los posibles mecanismos de la alteración.

Si bien la capacidad bioalterante de los distintos organismos puede establecerse indirectamente, a través del estudio de la posibilidad de los mismos para asimilar o generar determinadas especies químicas, mediante pruebas fisiológicas en medios de cultivo líquidos o sólidos o mediante ensayos bioquímicos, existen una serie de técnicas de laboratorio que evalúan dicha capacidad directamente sobre el sustrato.

Ensayos en Placa

Utiliza minerales finamente pulverizados suspendidos en agar sobre el que se incuban los organismos que interesan. El resultado se comprueba por la aclaración del agar derivada de la degradación del material incorporado al mismo por parte de dichos organismos (70).

La cuantificación con este método resulta imposible y, en ocasiones, hasta es difícil hacer una valoración cualitativa (11, 47).

Sistemas de Cultivo Estático

En este sistema, el material, bien intacto, en forma de discos o probetas (9) o bien pulverizado (109), se introduce en frascos con un medio de cultivo líquido inoculado con los organismos que se están estudiando. Se incuban y periódicamente se evalúa la agresión en función del porcentaje de pérdida en peso sufrida (97, 110), mediante el análisis de los productos que hayan pasado a la fase líquida y/o de medidas del cambio de pH del medio (18, 48, 111). También puede observarse la superficie mediante microscopía electrónica (32, 47).

Puede utilizarse también sistemas en los que se investiga la reacción únicamente de los metabolitos sobre los materiales, mezclando ambos (112, 113, 114), o utilizando membranas de diálisis para separar la piedra de los organismos (115).

Sistemas de Percolación

El fundamento básico es el mismo que para el cultivo estático, sólo que, en este caso, la solución de nutrientes es continuamente reciclada o introducida en el medio líquido (11).

Sistemas de Atmósfera Controlada

También cabe la posibilidad de realizar experiencias de simulación de la alteración organismo-sustrato, utilizando habitaciones con control ambiental (116).

La fijación de las intensidad, frecuencia y secuencia de las variables del medio ambiente permiten imitar, o por lo menos intentar reproducir, los valores del medio natural o intensificarlas para lograr una alteración acelerada que permita acortar la duración del ensayo (15).

El ataque de los organismos al sustrato se evalúa como en los casos anteriores (57).

Seguimiento de las Actividades Microbianas

Es posible seguir la colonización de piedras por los organismos, considerando como variables la naturaleza del sustrato y/o las condiciones ambientales. Para ello, se llevan a cabo experiencias de campo utilizando mu-

ros, esculturas o probetas (56). Periódicamente, y a través de alguna de las técnicas que hemos visto, se comprueba la presencia de diferentes organismos.

Dependiendo de la forma y características estructurales de la pieza colocada en el campo, se puede lograr que los procesos de bioalteración sean más o menos intensos y rápidos (117).

Referencias bibliográficas

1. STRZELCZYK, A.B.; ALICJA, B.: Stone. *Economic Microbiology*, Vol. 6, 61-80 (1981)
2. CANEVA, G.; SALVADORI, O.: Biodeterioration of stone. *The Deterioration and Conservation of Stone Restoration*, 182-234 (1988)
3. MAY, E.; LEWIS, F.J.; PEREIRA, S.; TAYLER, S.; SEAWARD, M.R.D.; ALLSOPP, D.: Microbial deterioration of building. *Biodeterioration abstracts*, Vol. 7 N°2, 109-123 (1993)
4. FEILDEN, B.M.: Botanical, biological and microbiological causes of decay. *Conservation of Historic Buildings, Part II*, 131-135 (1982)
5. GRIFFIN, P.S.; INDICTOR, N.; KOESTLER, R.J.: The biodeterioration of stone: a review of deterioration mechanisms, conservation case histories, and treatment. *International Biodeterioration* 28, 187-207 (1991)
6. TIANO, P.; VINDIGNI, A.: Calcite solubilizing microorganisms in marble. *Proceeding of the 4th International Congress on Deterioration and Preservation of Stone Objects, Louisville*, 344 (1982)
7. WILINZIG, M.; FAHRING, N.; BOCK, E.: Biologically influenced corrosion of stone by nitrifying bacteria. *7th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, 459-468 (1992)
8. JATON, C.: Biologie-ecologie. Traitement des matériaux pierreux. *2emes rencontres Internationales pour la protection du Patrimoine Culturel*, 201-214 (1986)
9. LEWIS, F.J.; MAY, E.; GREENWOOD, R.: A laboratory method for assessing the potential of bacteria to cause decay of building stone. *Proceeding of the 6th International Symposium on Deterioration and Conservation of Stone*, Vol. supplement, 48-58 (1988)
10. LEWIS, F.J.; MAY, E.; DALEY, B.; BRAVERY, A.F.: The role of heterotrophic bacteria in the decay of sandstone from ancient monuments. *The Biodeterioration of Constructional Materials*, n° 3, 45-53 (1987)
11. MAY, E.; LEWIS, F.J.: Strategies and techniques for the study of bacterial populations on decaying stonework. *Proceeding of the 6th International Symposium on Deterioration and Conservation of Stone*, Supplement vol., 59-70 (1988)
12. BASSI, M.; CHIATANTE, D.: The role of pigeon excrement in stone biodeterioration. *International Biodeterioration. Bulletin*, 12(3), 73-79 (1976)
13. AARON, A.; MILLS, C.; MAUBREY, R.: Effect of mineral composition on bacterial attachment to submerged rocks surfaces. *Microbial Ecology* 7, 315-322 (1981)
14. WARSCHIED, T.; OELTING, M.; KRUMBEIN, W.E.: Physico-chemical aspects of biodeterioration processes on rocks with special regard to organic pollutants. *International Biodeterioration* 28, 37-48 (1991)
15. MARTIN, A.: Bioalteración de la piedra. *Ensayos y experiencias de alteración en la conservación de obras de piedra de interés histórico artístico*, capítulo 10 (1990)

16. RACCOMANDAZIONI NORMAL 28/88: Composizione chimica dei materiali lapidei. *CNR-ICR*. (1988)
17. RACCOMANDAZIONI NORMAL 10/82: Descrizione petrografica dei materiali lapidei. *CNR-ICR*. (1982)
18. TAYLER, S.; MAY, E.: The seasonality of heterotrophic bacteria on sandstones of ancient monuments. *International Biodeterioration* 28, 49-64 (1991)
19. KRUMBEIN, W.E.: On the process of aging and its application to rock under special reference to the influence of microbial infections. *7th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, 437-442 (1992)
20. SAIZ-JIMENEZ, C.; SAMSON, R.A.: Microorganisms and environmental pollution as deteriorating agents of the frescoes of the Monastery of "Santa María de la Rábida", Huelva, Spain. *6th Triennial Meeting of ICOM Committee for Conservation*, 1-14 (1981)
21. GIACOBINI, C.; NUGARI, M.P.; MICHELI, M.P.; MAZZONE, B.; SEAWARD, M.R.D.: Lichenology and the conservation of ancient monuments: An interdisciplinary study. *Biodeterioration 6: papers presented the 6th International Biodeterioration Symposium*, 386-392 (1986)
22. DERUELLE, S.; LALLEMANT, R.; ROUX, C.: La végétation lichénique de la Basilique Notre-Dame de L'Epine. *Documents Phytosociologiques* 4, 217-234 (1979)
23. RACCOMANDAZIONI NORMAL 1/88: Alterazioni macroscopiche dei materiali lapidei: Lessico. *CNR-ICR*. (1988)
24. SORLINI, C.; ALLIEVI, L.; SACCHI, M.; FERRARI, A.: Microorganisms present in deteriorated materials of the "Palazzo della Regione" in Milan. *International Biodeterioration Bulletin* 18(4), 105-110 (1982).
25. LEWIS, F.; MAY, F.; BRAVERY, A.F.: Isolation and enumeration of autotrophic and heterotrophic bacteria from decayed stone. *Proceeding of the Vth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, Vol.2, 633-642 (1985)
26. BASSI, M.; GIACOBINI, C.: Scanning electron microscopy: A new technique in the study of the microbiology of work of art. *International Biodeterioration. Bulletin* 9, 57-68 (1973)
27. BOCK, E.; SAND, W.; MEINCKE, M.; WOLTERS, B.; AHLERS, B.; MEYER, C.; SAMELUCK, F.: Biologically induced corrosion of natural stones-strong contamination of monuments with nitrifying organisms. *Papers presented the 7th International Biodeterioration Symposium*, 436-440 (1988)
28. BASSI, M.; FERRARI, A.; REALINI, M.; SORLINI, C.: Red stains on the Certos of Pavia: A case of biodeterioration. *International Biodeterioration*, 22 Num.3, 201-205 (1986)
29. BASSI, M.; BARBIERI, N.; BONECCHI, R.: St. Christopher Church in Milan. Biological investigations. *Arte Lombarda* 68/69, 8-12 (1984)
30. SALVADORI, O.; ZITELLI, A.: Monohydrate and dihydrate calcium oxalate in living lichen incrustations biodeteriorating marble columns of the Basilica of Santa Maria Assunta on the Island of Torcello (Venice). *Proceeding of International Symposium The Conservation of Stone II, Bologna*, 379-390 (1981)
31. JONES, D.; WILSON, M.J.; MC HARDY, W.J.: Lichen weathering of rock-forming minerals: Application of scanning electron microscopy and microprobe analysis. *Journal of Microscopy*, 124(1), 95-104 (1981)
32. KOESTLER, R.J.; CHAROLA, A.E.; WIPYSKI, M.; LEE, J.J.: Microbiologically induced deterioration of dolomitic and calcitic stone as viewed by electron microscopy. *5th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone, Lausanne* 25, 617-626 (1985)
33. ORIAL, G.; BRUNET, A.: Les lichens: Impact sur les matériaux pierreux et recherche d'une thérapie. *Section Française de l'Institut International de Conservation*, 119-133 (1988)
34. JEANSON, C.Y.; CURRI, S.B.: Alteration de la base d'une fresque peinte sur un gres calcaire. Etude microscopique et lipochimique. *Actes du 13^e Congres Modial Société Internationale pour l'étude des corps gras. Section H, lipids et ouures d'art*, 69-75 (1976)
35. DANIN, A.; CANEVA, G.: Deterioration of limestone walls in Jerusalem and Marble Monuments in Rome caused by Cyanobacteria and Cyanophilous lichens. *International Biodeterioration* 26, 397-417 (1990)
36. LAZZARINI, L.; SALVADORI, O.: A reassessment of the formation of the patina called Scialbatura. *Studies in Conservation* 34(1), 20-26 (1989)
37. DEL MONTE, M.; SABBIONI, C.; ZAPPÀ, G.: The origin of calcium oxalates on historical buildings, monuments and natural outcrops. *The Science Total Environment* 67(1), 17-39 (1987)
38. GORGONI, C.; LAZZARINI, L.; SALVADORI, O.: Minerogeochemical transformations induced by lichens in the biocalcarene of the selenuntine monuments. *7th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, 531-539 (1992)
39. ASCASO, C.; GALVAN, J.; PASCUAL-RODRIGUEZ, C.: The weathering of calcareous rocks by lichens. *Pedobiologia* 24, 219-229 (1982)
40. JEANSON, C.: Alteration du marbre d'un chapiteau de la Basilica Saint Marc de Venice. Etude au microscope a balayage et a la microsonda. *Petrolio e ambiente*, 209-220 (1973)
41. DEL MONTE, M.; SABBIONI, C.: A study of the patina called Scialbatura on Imperial Roman Marbles. *Studies in Conservation*, 32 Num.3, 114-121 (1987)
42. POCHON, J.; JATON, C.: Facteurs biologiques de l'alteration des pierres. *Proceedings of the 1st International Biodeterioration Symposium*, 258-268 (1968)
43. BARCELLONA-VERO, L.; MONTE SILA, M.: Alterazione dei monumenti esposti all'aperto: incidenza dei solfobatteri in relazione alla natura del substrato e alle condizioni ambientali. *Conservazioni dei Monumenti, atti del XXIX Congresso Nazionale ATI, Firenze*, 125-128 (1974)
44. BRUNI, V.: Presenza di batteri solubilizzanti i carbonati su monumenti marmorei calcarei. *Atti del III Congresso Internazionale sul Deterioramento e Conservazione della Pietra, Venezia*, 301-304 (1979)
45. BARCELLONA-VERO, L.; BIANCHI, R.; MONTE SILA, M.; TIANO, P.: Proposal of a method of investigation for the study of the presence of bacteria in exposed works of art in stone. *The Conservation of Stone I, Bologna* 257-266 (1976)
46. Schostak, V.; Krumbein, W.E.: Occurrence of extremely halotolerant and moderate halophilic bacteria on salt impaired wallpaintings. *7th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, 551-560 (1992)
47. LEWIS, F.; MAY, F.; BRAVERY, A.F.: Metabolic activities of bacteria isolated from building stone and their relationship to stone decay. *Papers presented the 7th International Biodeterioration Symposium*, 107-112 (1987)
48. TIANO, P.; VINDIGNI, A.: Calcite solubilizing microorganisms in marble. *Proceeding of the 4th Int. Cong. Deterioration and Preservation of Stone Objects, Louisville*, 344 (1982)
49. TOMASELLI, L.; MARGHERI, M.C.; FLORENZANO, G.: Indagine sperimentale sul ruolo dei cianobatteri e delle microalghe nel deterioramento di monumenti ed affreschi. *Atti del III Congresso Internazionale sul Deterioramento e la Conservazione della Pietra*, 313-325 (1979)
50. AGAROSI, G.; FERRARI, R.; DEL MONTE, M.: La Basilica di St. Clemente: Studi sul biodeterioramento. *Scientific Methodologies Applied to Works of Art*, 52-56 (1984)

51. REALINI, M.; SORLINI, C.; BASSI, M.: The Certosa of Pavia: A case of biodeterioration. *Proceedings of the Vth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, Vol. 2, 627-632 (1985)
52. CURRI, S.B.: Aspetti dell'aggressione biologica ai monumenti dell'acropoli di Atene. *III Congresso Internazionale sul Deterioramento e Conservazione della Pietra*, 261-280 (1979)
53. ECKHARDT, F.E.W.: Heterotrophic bacteria-potent allies of the filamentous fungi and yeasts on weathering building stone and monuments. *Science, Technology and European Cultural Heritage*, 515-519 (1991)
54. MONTE SILA, M.; SCAVIZZI, M.S.: Presence of sulphur bacteria inside the plasters of the mural paintings in the Scrovegni Chapel. *3rd International Congress on Deterioration and Preservation of Stone, Venice*, 705-708 (1979)
55. AGAROSI, G.; FERRARI, R.; DEL MONTE, M.: Microbial biodeterioration in the Hypogea: the subterranean neo-pythagorean Basilica of Porta Maggiore in Roma. *Vth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, Vol. 2, 597-605 (1985)
56. JATON, C.; ORIAL, G.: Colonisation des pierres (Saint-Vaast et Tuffeau) par des microorganismes dans les zones de remontée d'eau par capillarité. Methodes d'estimation de l'action de produits biocides. *Lithoclastia*, 13-18 (1976)
57. BARCELLONA-VERO, L.; MONTE SILA, M.: Mise en évidence de l'activité des thiobacillus dans les altérations des pierres a Rome: Identification de certaines souches. *Atti dell'UNESCO RI-LEM International Symposium Deterioration and Protection of Stone Monuments, Paris*, 1-13 (1978)
58. GUGLIANDOLO, C.; MAUGERI, T.L.: Biodeterioration of stone by sulphur bacteria. *Atti 1° Simposio Internazionale, Bari*, 221-224 (1989)
59. GUGLIANDOLO, C.; MAUGERI, T.L.: Isolation of Thiobacillus spp. from stone. *Vth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, 92-101 (1989)
60. BARCELLONA-VERO, L.; MONTE SILA, M.; SILVERI, A.: Influenza dell'azione dei solfobatteri nei processi di alterazione di materiali lapidei. *Problemi di Conservazione, Bologna*, 439-451 (1973)
61. KRUMBEIN, W.E.; POCHON, J.: Ecologie bacterienne des pierres altérées des monuments. *Annales de l'Institut Pasteur* 107, 724-732 (1964)
62. TIANO, P.; BIANCHI, R.: Studio dei solfo-batteri come causa della alterazione delle pietre di alcuni edifici storici di Firenze. *Atti del XXIX Congresso Nazionale sulla Conservazione dei Monumenti, Firenze*, 133-135 (1974)
63. JATON, C.; ORIAL, G.; BRUNET, A.: La conservation du Portail de L'Eglise Saint-Trophime a Arles. Etude microbiologique. *Biocorrosion*, 73-76 (1990)
64. TIANO, P.; BIANCHI, R.; VANNUCI, S.: Researches on the presence of sulphur cycle bacteria in the stone of some ancient buildings of Florence. *Plant and Soil*, Vol.43, 211-217 (1975)
65. JATON, C.: Altérations microbiologiques de l'Eglise Monolithe D'Aubeterre Sur Drôme. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol, Tomo IX*, 3, 471-477 (1972)
66. BEAUCOURT DE, F.; PAULY, J.P.; JATON, C.: L'Eglise Monolithe D'Aubeterre Sur Drôme. *La maladie de la Pierre*, 48-65 (1972)
67. POCHON, J.; JATON, C.: Aspects microbiologiques des altérations sur les calcaires. *La maladie de la Pierre*, 27-32 (1972)
68. JATON, C.: Aspects microbiologiques des altérations des pierres de monuments. *1er Colloque International sur la Deterioration des Pierres en Ouvre*, 149-154 (1972)
69. BARCELLONA-VERO, L.; BETTINI, C.; MONTE SILA, M.: Chemoautotrophic microorganisms in semi-insulated environment. *Proceedings of 2nd International Symposium on the Deterioration of Building Stones, Athens*, 61-65 (1976)
70. LANZA, S.; SERGI, S.; STAGNO, F.; TRISCARI, M.; GRASSO, S.; GUGLIANDOLO, C.; MAUGERI, T.; CILIBERTO, E.; FRAGALA, I.; TORRISI, A.: Microbial attack on basalts from the Etna Region: A SIMS and IR study. *7th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, 471-480 (1992)
71. CANEVA, G.; NUGARI, M.P.; RICCI, S.; SALVADORI, O.: Pitting of marble Roman Monuments and the related microflora. *7th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, 521-530 (1992)
72. MEINCKE, M.; AHLERS, B.; KRANSE-KUPSCH, T.; KRIEG, E.; MEYER, C.; SAMELICK, F.; SAND, W.; WOLTERS, B.; BOCK, E.: Isolation and characterization of endolithic nitrifiers. *Vth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, 15-23 (1988)
73. TABASSO LAURENZI, M.; BARCELLONA-VERO, L.: Prime indagini su campioni di pietra provenienti del Palazzo Ducale di Urbino. *La Conservazione delle sculture all'aperto, Atti del Convegno Internazionale di studi, Bologna, Num.12*, 111-116 (1971)
74. MEINCKE, M.; KRIEG, E.; BOCK, E.: Nitrosobrevibacter spp., the dominant ammonia-oxidizing bacteria in building sandstone. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(8), 2108-2110 (1989)
75. PIETRINI, A.M.; RICCI, S.; BARTOLINI, M.; GIULIANI, M.R.: A reddish color alteration caused by algae on stone works: Preliminary studies. *5th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, 653-662 (1985)
76. BARCELLONA-VERO, L.; MONTE SILA, M.: Isolation of various sulphur-oxidizing bacteria from stone monuments. *The Conservation of Stone I, Bologna* 233-234 (1976)
77. ECKHARDT, F.E.W.: Microorganisms and weathering of a sandstone monuments. *Environmental Biogeochemistry and Geomicrobiology*, 675-686 (1978)
78. LIM, G.; TAN, T.K.; TOH, A.: The fungal problem in buildings in the humid tropics. *International Biodeterioration* 25, 1-3, 27-37 (1989)
79. WARSCHIED, T.; PETERSEN, K.; KRUMBEIN, W.E.: Physiological characterization of chemoorganotrophic bacteria isolated from sandstone. *Vth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, 26-32 (1988)
80. ECKHARDT, F.E.W.: Influence of culture media employed in studying microbial weathering of building stones and monuments by heterotrophic bacteria and fungi. *Vth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, 71-81 (1989)
81. ANDREOLI, C.; RASCIO, N.; GARLET, L.; LEZNICKA, S.; STREZELCZYK, A.B.: Interrelationships between algae and fungi overgrowing stoneworks in natural habitats. *Vth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, 324-327 (1989)
82. PETERSEN, K.; KUROCZKIN, J.; STREZELCZYK, A.B.; KRUMBEIN, W.E.: Distribution and effects of fungi on and in sandstone. *Biodeterioration* 7, 123-128 (1988)
83. ARAI, H.: Biological investigations. *Wall paintings of the tomb of Nefertari, First Progress Report*, 54-57 (1987)
84. ARAI, H.: The environmental analysis of archeological sites. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 9, N° 7, 213-216 (1990)
85. ZANOTTI CENSONI, A.L.; MANDRIOLI, P.: Aerobiological investigation in Scrovegni Chapel (Padua, Italy). *3rd International Congress on Deterioration and Preservation of Stone, Venezia*, 699-703 (1979)

86. ECKHARDT, F.E.W.: Mechanisms of the microbial degradation of minerals in sandstone monuments, medieval frescoes and plaster. *Actes Cong. Int. Altération Conservation Pierre, 5th., Lausanne 25, 643-652* (1985)
87. MONTE SILA, M.; TARANTINO, G.: The metabolic state of microorganisms of the genus *thiobacillus* on stone monuments. *Proceeding of International Symposium The Conservation of Stone II, Bologna, 117-138* (1981)
88. CURRI, S.B.: Biocide testing and enzymological studies on damaged stone and frescos surfaces: Preparation of antibiograms. *Acta Deterioration and Protection of Stone Monuments, Paris, Vol.I, 1-13* (1978)
89. TIANO, P.; TOMASSELLI, L.; ORLANDO, C.: The ATP-bioluminescence method for a rapid evaluation of the microbial activity in the stone materials of monuments. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* 3(4), 213-216 (1989)
90. CURRI, S.B.; PALENI, A.: Some aspects of the growth of chemolithotrophic microorganisms on the Karnak Temples. *The Conservation of Stone I, 267-278* (1976)
91. CURRI, S.B.; CURRI, C.B.: Aspetti microbiologici ed enzimatici della degradazione degli affreschi negli Ipogei di Tarquinia. *Determinazione dell'antibiogramma. Studi Etruschi, XLVI (Serie III), 269-283* (1979)
92. CURRI, S.B.; PALENI, A.: Histochemical procedures for the evaluation of organic components in deteriorated stone material. *The Conservation of Stone II, 445-454* (1981)
93. GOMEZ-ALARCÓN, G.; MUÑOZ, M.; ARIÑO, X.; ORTEGA-CALVO, J.J.: Microbial communities in weathered sandstones: the case of Carrascosa del Campo church, Spain. *The Science of the Total Environment* 167, 249-254 (1995)
94. CURRI, S.B.; FORNI, G.; FEDELI, E.; CURRI, C.: Lipids in ancient pottery. *Proceeding of Section Lipids and Works of Art, Marseille, 33-42* (1976)
95. PALENI, A.; CURRI, S.B.: Biological contamination of the surface of art objects. *Proceeding of 1st International Symposium on the Conservation of Stone. I, 281-293* (1975)
96. OELTING, M.; BUTTE, W.; KRUMBEIN, W.E.: Extraction and identification of organic compounds from the surface of weathering stones. *Vth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone, 13-20* (1989)
97. URZI, C.E.; KRUMBEIN, W.E.; PERNICE, A.: Microbiological investigations on the deterioration and decomposition of marbles. *7th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone, 429-435* (1992)
98. ORTEGA-CALVO, J.J.; ARIÑO, X.; HERNANDEZ-MARINE, M.; SÁIZ-JIMENEZ, C.: Factors affecting the weathering and colonization of monuments by phototrophic microorganisms. *The Science of the Total Environment* 167, 329-341 (1995)
99. LEPIDI, A.A.; SCHIPPA, G.: Growth of a sulphide oxidizing bacterium estimated by various methods and a new method of sulphide determination. *1er Colloque Internationale sur la Deterioration des Pierres en Oeuvre, 139-141* (1972)
100. WOLTERS, B.; SAND, W.; AHLERS, F.; SAMELUCK, A.; MEINCKE, M.; MEYER, C.; KRAUSE-KUPSCH, T.; BOCK, E.: Nitritification the main source for nitrate deposition in building stones. *Vth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone, 25-31* (1988)
101. BRADFORD, M.M.: Rapid and sensitive method for de quantitation of microgram quantities of protein, utilizing the princip of protein dye-binding. *Annals of Biochemistry* 72, 248-254 (1976)
102. BARCELLONA, S.; BARCELLONA-VERO, L.; GUIDOBALDI, F.: The front of S. Giacomo degli Incurabili church in Rome: Biological and chemical surface analysis. *ICOM. Madrid, Report 2/1* (1972)
103. BARCELLONA-VERO, L.; TABASSO LAURENZI, M.: La fontana del Tritone di L. Bernini a Roma: Un esempio di alterazione legato a fattori chimici, biologici e ambientali. *Deterioration and Preservation of Stone, Proceeding of the 3rd International Congress, 511-516* (1982)
104. DEL MONTE, M.; SABBIONI, C.: Weddellite on limestone in the Venice environment. *Environmental Science & Technology, 17, 518-522* (1983)
105. SEAWARD, M.R.D.; GIACOBINI, C.: Oxalate encrustation by the lichen *Dirina massiliensis* forma *sorediata* and its role in the deterioration of works of art. *La pellicole ad ossalati: origine e significato nella conservazione delle opere d'arte, 215-220* (1989)
106. EDWARDS, H.G.M.; FARWELL, D.W.; SEAWARD, M.R.D.: Preliminary Raman Microscopic analyses of a lichen encrustation involved in the biodeterioration of renaissance frescoes in Central Italy. *International Biodeterioration* 27, 1-9 (1991)
107. EDWARDS, H.G.M.; FARWELL, D.W.; SEAWARD, M.R.D.: Raman spectra of oxalates in lichen encrustations on renaissance frescoes. *Spectrochimica Acta, Vol. 47A, N° 11, 1531-1539* (1991)
108. EDWARDS, H.G.M.; FARWELL, D.W.; JENKINS, R.; SEAWARD, M.R.D.: Vibrational Raman Spectroscopic studies of calcium oxalate monohydrate and dihydrate in lichen encrustations on renaissance frescoes. *Journal of Raman Spectroscopy, Vol 23, 185-189* (1992)
109. ECKHARDT, F.E.W.: Solubilization, transport, and deposition of mineral cations by microorganisms-efficient rock weathering agents. *Chemistry of Weathering* 149, 161-173 (1985)
110. NUGARI, M.P.; PRIORI, G.F.: Resistance of acrylic polymers (Paraloid B72, Primal AC33) to microorganisms - First part. *Vth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone, Vol. 2, 685-693* (1985)
111. ECKHARDT, F.E.W.: Mechanisms of the microbial degradation of minerals in sandstone monuments, medieval frescoes and plaster. *Vth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone., Lausanne 25, 643-652* (1985)
112. GEHRMANN, C.K.; PETERSEN, K.; KRUMBEIN, W.E.: Silicole and calcicole lichens on Jewish tombstones: Interactions with the environment and biocorrosion. *Vth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone, 33-38* (1989)
113. JONES, D.; WILSON, M.J.: Chemical activity of lichens on mineral surfaces - A review. *International Biodeterioration, 21(2), 95-104* (1985)
114. ASCASO, C.; GALVAN, J.: Studies on the pedogenetic action of lichen acids. *Pedobiologia, 16, 5, 321-331* (1976)
115. BERTHELIN, J.: Microbial weathering process. *Microbial Geochemistry, 223-262* (1983)
116. BOCK, E.; SAND, W.: Applied electron microscopy on the biogenic destruction of concrete and blocks - use of the transmission electron microscope for identification of mineral acid producing bacteria. *Proceeding of the 8th International Conference on Cement Microscopy, 285-302* (1986)
117. JATON, C.; ORIAL, G.; BRUNET, A.: Actions des vegetaux sur les matériaux pierreux. *Vème. Congres International sur l'altération e la conservation de la Pierre, Vol.2, 577-586* (1985)