

## BIOFILMS FOTÓTROFOS SOBRE MUROS DE LADRILLO. BIODETERIORO

Sandra Gómez de Saravia <sup>a,b</sup>, Patricia Battistoni<sup>c</sup>, Patricia Guiamet <sup>c,d</sup>

<sup>a</sup>Centro de Investigaciones y Desarrollo en Tecnología de Pinturas (CIDEPINT), CICPBA-CCT, La Plata, CONICET, 52 e/ 121 y 122 (1900), La Plata, Buenos Aires, Argentina.

<sup>b</sup>Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP. CICBA. [sandragomezdesaravia@yahoo.com.ar](mailto:sandragomezdesaravia@yahoo.com.ar)

<sup>c</sup>Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, CCT La Plata- CONICET. C.C. 16, Suc.4, (1900), La Plata, Buenos Aires, Argentina.

<sup>d</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. CONICET.  
[patbat@inifta.unlp.edu.ar](mailto:patbat@inifta.unlp.edu.ar); [pguiamet@nifta.unlp.edu.ar](mailto:pguiamet@nifta.unlp.edu.ar)

**Palabras clave:** Biodeterioro, Biofilms fotótrofos, Ladrillo.

### RESUMEN

Los microorganismos fotótrofos que forman biofilms sobre superficies de ladrillo, como las microalgas, pueden ocasionar ensuciamiento biológico y biodeterioro. Además del efecto antiestético que ocasiona el bioensuciamiento, evidente en muchos edificios y monumentos, debemos también considerar los mecanismos de disolución de materiales, tal es el caso de las cianobacterias epilíticas que puede jugar un papel importante en la disolución del carbonato a través de procesos biogeoquímicos. El bioensuciamiento y el biodeterioro toman dimensiones económicas y sociales importantes cuando los sustratos colonizados tienen importancia patrimonial. En las últimas décadas, los procesos de biodeterioro han aumentado significativamente, especialmente en las zonas urbanas debido al aumento de la contaminación del medio ambiente. Compuestos químicos en la atmósfera en forma de  $\text{SO}_4$ ,  $\text{NO}_3$  y  $\text{NH}_3$ , sirven de nutrientes para las algas. Los objetivos de este trabajo fueron: identificar los taxones de organismos fotótrofos que forman biofilms sobre las paredes de ladrillo de la Catedral de La Plata, Buenos Aires, Argentina con el fin de evaluar el biodeterioro. Fueron muestreadas tres zonas que presentaban biofilms con diferentes coloraciones. Las muestras fueron observadas con diferentes técnicas microscópicas. Se realizaron cultivos en medio BG11 que luego de un mes se inocularon en ladrillos estériles, bajo condiciones de luz, humedad y temperatura controladas para favorecer el desarrollo del biofilm y evaluar el biodeterioro. Los ladrillos se observaron en el microscopio óptico (Olympus BX51), microscopio estereoscópico (Nikon SMZ-10) y microscopio electrónico de barrido (Jeol 6360LV). La diversidad específica de los microorganismos fotótrofos presentes en los biofilms mostró variaciones relacionadas a los factores ambientales. Se observó biodeterioro del material estructural debido al desarrollo de biofilms

## INTRODUCCIÓN

Los monumentos expuestos al aire libre durante un largo período de tiempo se deterioran debido a diversas causas: sol, viento, lluvia, contaminación atmosférica, etc., factores que contribuyen al proceso de meteorización [1].

Los biofilms desarrollan en microambientes bajo condiciones de luz, humedad y temperatura determinantes de la colonización biológica de superficies de edificios [2, 3, 4]. El término 'biofilm sub-aéreo' (SAB) se refiere a las comunidades microbianas que desarrollan en superficies minerales sólidas expuestas a la atmósfera. SAB son ecosistemas microbianos autosuficientes, ubicuos que se encuentran en edificios, rocas, en todas las latitudes donde se produce el contacto directo con la atmósfera y la radiación solar. Dada su característica de crecimiento lento, SAB también pueden servir como bioindicadores de cambios atmosféricos y/o del clima. SAB en superficies terrestres expuestas se caracterizan por un crecimiento desigual que está dominado por las asociaciones de hongos, algas, cianobacterias y bacterias heterotróficas [5, 6, 7]. La textura, el color y la apariencia de un SAB varían con la composición microbiana que a su vez depende de las condiciones climáticas, la naturaleza del sustrato y la duración de la exposición. Los organismos fotótrofos, cianobacterias y microalgas, se han considerado los primeros colonizadores de superficies de edificios [4, 8] acondicionan las superficies inertes para el crecimiento de organismos heterotróficos, tales como hongos. Se encuentran comúnmente en lugares húmedos de los edificios, como cornisas, agujeros y grietas. Los biofilms fotótrofos varían en color, de acuerdo con las características de los taxones, de color amarillo verdoso a verde oscuro y negro, y de color rosa a gris y marrón. La morfología y el color de estas pátinas pueden cambiar, de acuerdo al estado fisiológico de las células y las condiciones ambientales. La aparición de microorganismos fotótrofos sobre superficies de piedra no implica una acción destructiva, pero teniendo en cuenta el biodeterioro como cualquier cambio indeseable en las propiedades de un material causado por las actividades vitales de los microorganismos [9] la presencia de algas en construcciones puede ser considerada como biodeterioro por el daño estético que causan.

Muchos autores han encontrado que las condiciones ambientales locales son más importantes que el tipo de sustrato, determinando el grado y tipo de suciedad y la formación de biofilms [8, 10, 11]. Así como la apariencia antiestética evidente en la mayoría de los informes sobre las algas en edificios históricos, hay referencias en la literatura que apuntan a mecanismos de desintegración directos. De hecho, se ha informado que las cianobacterias epilíticas puede jugar un papel importante en la superficie de rocas que se encuentran a la intemperie a través de diversos efectos sobre el sistema de disolución de carbonato [12]. En las últimas décadas, los procesos de biodeterioro se han incrementado de manera significativa, especialmente en las zonas urbanas debido al aumento de la contaminación del medio ambiente. Los compuestos químicos en la atmósfera en forma de  $\text{SO}_4$ ,  $\text{NO}_3$  y  $\text{NH}_3$ , sirven de nutrientes para las algas. De acuerdo a la información obtenida a partir de 6 estaciones meteorológicas diferentes Argentina, La Plata cuenta con uno de los ambientes más corrosivos en el país con altas concentraciones de deposición de  $\text{SO}_2$  (valores de 6,20 a 8,21  $\text{mg}/\text{m}^2/\text{d}$ .) debido a la proximidad de industrias petroquímicas [13]. La Catedral de La Plata es un templo neogótico, su construcción comenzó en el año 1884, cuando se colocó la piedra fundacional y finalizó en 1932 cuando fue inaugurada.

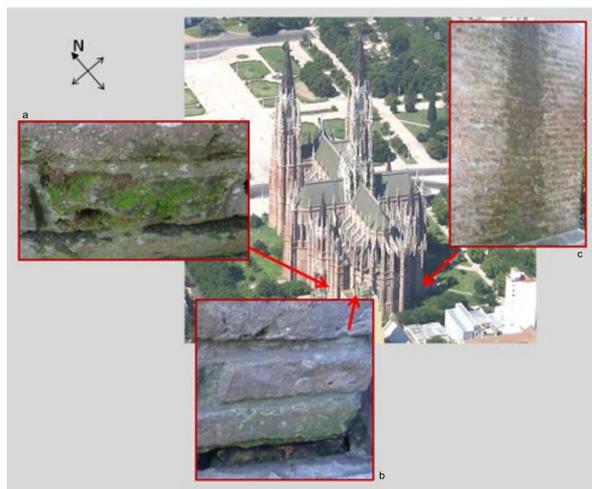
Los objetivos de este trabajo fueron: identificar los taxones de organismos fotótrofos que forman biofilms sobre las paredes de ladrillo de la Catedral de La Plata, Buenos Aires, Argentina con el fin de evaluar el biodeterioro.

## EXPERIMENTAL

Los muros de la catedral están realizados en ladrillo y mortero, hormigón y estructuras de hierro reforzado completan la lista de materiales de construcción [14].

La Plata tiene una temperatura media anual de 16.3 °C, la precipitación media anual es de 1.023 mm, y una humedad relativa promedio anual de 77%. La temperatura del aire durante el período de muestreo fue de aproximadamente 20 °C y la humedad relativa de 50-55%.

La inspección visual mostró una clara evidencia del desarrollo de biofilms fotótrofos. Se seleccionaron tres zonas de estudio con biofilms de diferentes aspectos y coloración en las paredes: sudoeste (calle 15) (Figura 1a y b) y sudeste (calle 53) (Figura 1c). La muestra a) era verde con una fisonomía musgosa, b) era negra y c) negro fangosa y recibía un conducto de drenaje.



**Figura 1.** Diferentes biofilms fotótrofos: a) Biofilm verde (izquierda), b) Biofilm negro (parte inferior), c) Biofilm fangoso negro (derecha).

Las muestras se tomaron con un bisturí estéril y se raspó una superficie de 1 cm<sup>2</sup>. Las muestras utilizadas para los estudios de laboratorio se colocaron en solución salina estéril y luego se inocularon en medio líquido BG11 para la multiplicación de la biomasa. [15, 16]. Otras muestras se conservaron en formaldehído al 4%, y fueron observadas con microscopio invertido Olympus BX51 [17] con el objetivo de realizar la identificación taxonómica.

Luego de 30 días, de crecimiento del cultivo se inocularon 5 ml en muestras de ladrillo de 2 cm<sup>2</sup>, previamente esterilizadas. Las muestras de ladrillo se incubaron en placas de Petri bajo condiciones de luz, humedad y temperatura controlada, 16/8 (luz/oscuridad), atmósfera

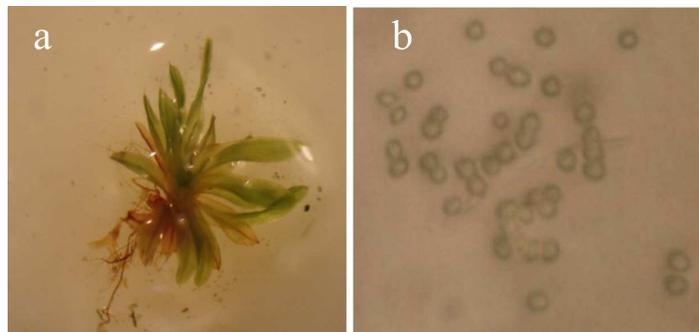
saturada de humedad y 28 °C, se roció con líquido BG11 para mantener la actividad metabólica de los organismos fotótrofos. El período de incubación fue de aproximadamente 2 meses [2].

Las muestras control de ladrillo y los ladrillos con los biofilms formados se observaron en el microscopio óptico (MO) Olympus BX51, en el microscopio estereoscópico Nikon SMZ-10, y en el microscopio electrónico de barrido (MEB) Jeol 6360LV; las muestras para MEB se metalizaron con Au/Pd.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

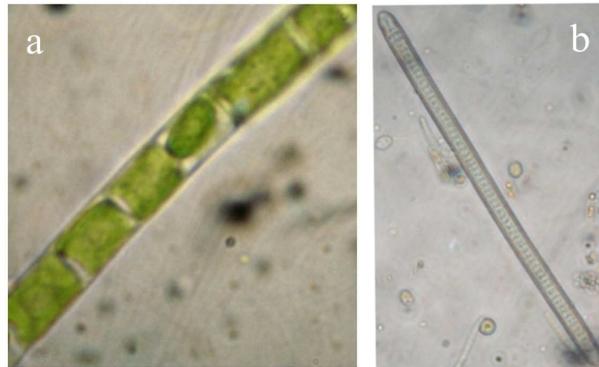
La distribución de los biofilms en las paredes de la catedral señala problemas de contaminación biológica en la fachada posterior sudoeste (calle15) y la pared sudeste (calle 53) del edificio, donde la intensidad de luz es baja y la humedad es alta. Estos dos factores hacen estas áreas propicias para el desarrollo de las comunidades epilíticas visibles a ojo desnudo (Figura 1).

El biofilm verde (Figuras 1a y 2) está constituido por un musgo del género *Hennediella* (Pottiaceae), donde aparecían entre sus talos bacterias, cianobacterias, algas y hongos. Se observó una gran cantidad y diversidad de diatomeas Pennales, y Chlorophyta de los géneros *Chlorella* y *Chlorococcum*, *Apatococcus* y cianobacterias Chroococales (*Synechocystis* sp.). Es interesante observar la presencia de hipnozigotos, que son formas de resistencia de algunas Chlorophyta (*Chlorococcum* sp) y el resultado de la reproducción sexual, que se producen durante los ciclos de estrés, por ejemplo la falta de agua, correspondiente a períodos de sequía. Esto demuestra la capacidad de estas algas para sobrevivir en períodos desfavorables de tiempo, reapareciendo cuando las condiciones ambientales mejoran.



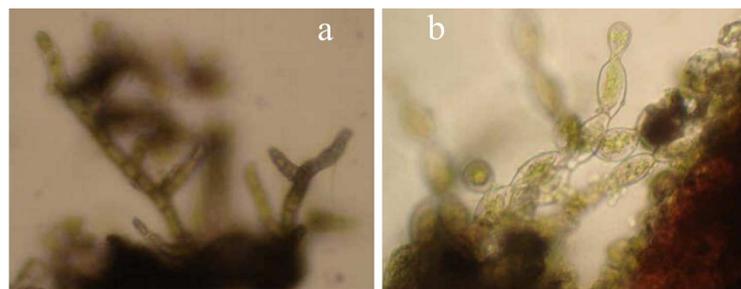
**Figura 2.** Imágenes de MO de organismos fototróficos del biofilm verde. a) *Hennediella* sp.; b) *Synechocystis* sp.

En el biofilm negro (Figura 1b y 3) los taxones presentes fueron *Klebsormidium* cf. *flaccidum* una Charophyta típica de este ambiente, junto con *Stichococcus bacillaris*, Chlorophyta filamentosa. También se determinaron cianobacterias filamentosas, como *Oscillatoria* sp. y *Pseudoanabaena* sp.



**Figura 3.** Imágenes de MO de algas presentes en el biofilm negro. a) *Klebsormidium* sp.; b) *Oscillatoria* sp.

El biofilm fangoso negro (Figuras 1c y 4), está caracterizado por la presencia de Chlorophyta del orden Trentepohliales, géneros *Trentepohlia* y *Printzina*. En este biofilm las cianobacterias estuvieron casi ausentes; sólo había unas pocas representantes del género *Cyanothece*.



**Figura 4.** Imágenes de MO de muestras del biofilm negro fangoso a) *Trentepohlia* sp.; b) *Printzina* sp.

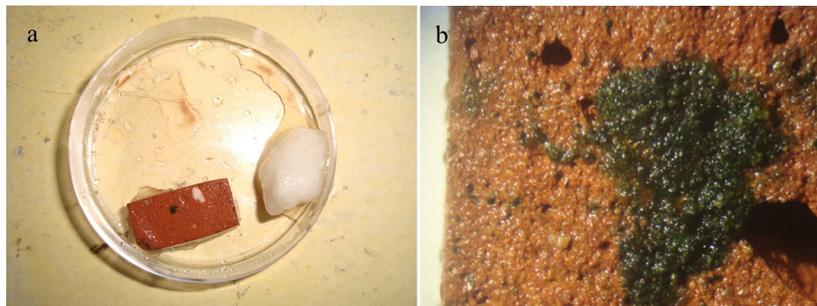
Las paredes orientadas al sudeste (calle 53) presentaron biofilms verdosos y fangoso negro que cubrían gran parte de las juntas entre ladrillos y la superficie de los mismos. Se observó también crecimiento de plantas vasculares. La presencia de plantas vasculares estaría relacionada a la menor incidencia de la luz solar directa, siendo esta la zona más afectada por los vientos y las lluvias durante el invierno.

La presencia de comunidades microbianas complejas embebidas en sustancias poliméricas extracelulares (SPE) que constituyen biofilms y la contaminación atmosférica en las superficies de los materiales estructurales conducen al biodeterioro. Los efectos del biodeterioro incluyen (a) cambios cromáticos en el sustrato producido por pigmentos biogénicos que, dependiendo del tamaño del área que ocupan, pueden alterar el aspecto estético y por lo tanto la interpretación de la obra de arte; (b) las tensiones mecánicas sobre la estructura mineral causada por SPE, que aumentan con ciclos de hidratación y secado sucesivos; y (c) los contaminantes atmosféricos adsorbidos por el biofilm [18].

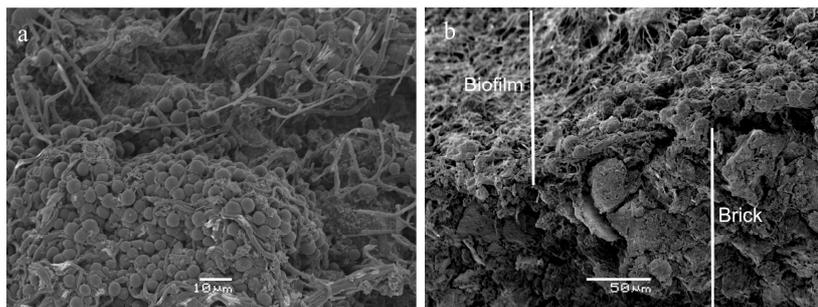
La presencia de organismos fotótrofos y su actividad metabólica contribuyen a acelerar y catalizar los efectos sobre la formación de costras y también producen coloración biogénica de los sustratos con la consiguiente pérdida de valor estético [19]. Los biofilms de color oscuro en superficies de edificios y monumentos aumentan la tensión física del material estructural por incremento en la absorción de calor específico, y capacidad de retención de humedad [20]. Cianobacterias cocoides como *Gloeocapsa* sp. pueden degradar la piedra caliza [21, 22, 23].

*Trentepohlia* sp., alga presente en las paredes de la catedral, ha sido asociada al biodeterioro en edificios y producción de coloración rosa/marrón [3, 19, 24], causada por pigmentos biogénicos [25]. También se ha asociado con la degradación mecánica de monumentos en España [26] y México [27]. La producción de pigmento es una adaptación que aumenta la resistencia contra el estrés ambiental.

En condiciones óptimas de laboratorio, se observó el crecimiento de organismos fotótrofos (Figura 5a), sustancias poliméricas extracelulares (SPE) y el desarrollo del biofilm (Figura 5b). El ladrillo mostró signos de degradación causado por organismos fotótrofos (Figura 6).



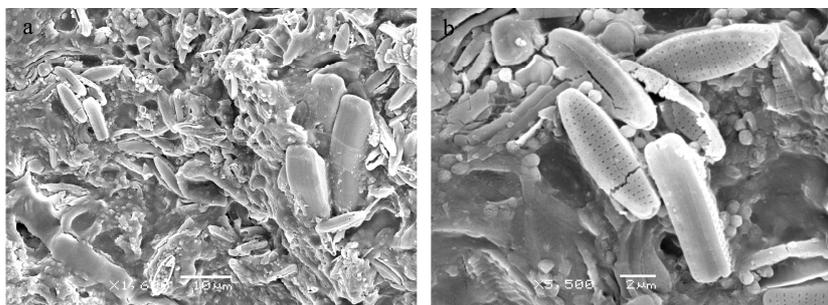
**Figura 5.** a) imagen de cultivos mixtos de algas fotótrofas inoculados en el ladrillo; b) Detalle del biofilm fotótrofo en ladrillo luego de dos meses.



**Figura 6.** Imágenes de MEB de a) biofilm formado sobre ladrillo (1600X); b) detalle se pueden observar diatomeas y signos de degradación en el ladrillo causados por fotótrofos (5500X).

Las diatomeas encontradas pertenecen al orden Pennales con rafe; esta estructura está asociada con la biosíntesis de mucopolisacáridos, para la fijación y movimiento. Los mucopolisacáridos contribuyen a la bioadherencia para atrapar materiales en suspensión y en

consecuencia deteriorar el sustrato. Podemos observar biodeterioro (Figura 7) causado por el ataque de algas endolíticas sobre el sustrato (ladrillo) conocido como “micropitting” [28].



**Figura 7.** Imágen de MEB a) biofilm fotótrofo bajo condiciones de laboratorio luego de 2 meses (1000 X); b) vista lateral del biofilm fotótrofo formado sobre ladrillo (400X).

## CONCLUSIONES

La diversidad específica de los organismos fotótrofos mostró variaciones que se relacionaron con la pared en la que se desarrollaron los biofilms.

Se pudo observar “biopitting” ataque sobre el sustrato de ladrillo asociado a los biofilms fotótrofos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de La Plata (UNLP, proyectos 11N 713 y 11X 632), CONICET PIP 0200 y CICBA 833/14 los subsidios recibidos para financiar este trabajo. Se agradece al Lic. Juan Martín Fontana el sostén técnico y al servicio SEM de la FCNyM, UNLP.

## REFERENCIAS

- [1] Warscheid T.; Krumbein W. (1996) “General Aspects and selected Cases”. En: Microbially induced corrosion of materials, Heitz, Sand, Flemming (Eds.), Springer-Verlang, 273-295.
- [2] Nowicka-Krawczyk P.; Olszyński R.; Koziróg A.; Otiewska A.; Piotrowska M.; Rajkowska K.; Gutarowska B.; Brycki B. (2014), The influence of active chemical on the growth of phototrophic biofilms coating brick substrates. In IBBS (Eds.) XVI 16 Int Biodet Biodegrad Simposium Abstract Book, Lodz, Poland p. 170.
- [3] Gaylarde P.; Englert G.; Ortega-Morales O.; Gaylarde C. (2006), Lichen-like colonies of pure *Trentepohlia* on limestone monuments Original Research Article Int. Biodeter. Biodegr., 58, 119-123.
- [4] Barberousse H.; Lombardo R.; Tell G.; Couté A. (2006), Factors involved in the colonisation of building façades by algae and cyanobacteria in France. *Biofouling* 22, 69-77.
- [5] Gorbushina A. (2007), Life on the rocks. *Environm. Microbiol.*, 9, 1613–1631.
- [6] Gómez de Saravia S.; Fontana M.; Guiamet P. (2010), Estudio de biofilms fototróficos mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido. *Rev. Argent. Microbiol.*, 42, 315.
- [7] Guiamet P.; Rosato V.; Gómez de Saravia S.; García A.; Moreno D. (2012), Biofouling of crypts of historical and architectural interest at La Plata Cemetery (Argentina). *J. Cult. Herit.*, 13, 339-344.

- [8] Gaylarde P.; Gaylarde C. (2005), A comparative study on de major microbial biomass of biofilm on exterior of building in Europa and Latin America. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 55, 131-139.
- [9] Hueck E. (1965), The biodeterioration of materials as a part of hylobiology *Mater Organismen*, 1, 5-34.
- [10] Gladis F.; Schumann R. (2011), Influence of material properties and photocatalysis on phototrophic growth in multi-year roof weathering. *Int. Biodeter. Biodegr.* 65, 36-44.
- [11] Shirakawa M., Gaylarde C., Gaylarde P., John V., Gambale W. (2002), Fungal colonization and succession on newly painted buildings and the effect of biocide. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 39, 165-173.
- [12] Viles H. (1987), Blue-green algae and terrestrial limestone weathering on Aldabra Atoll: an SEM and light microscope study. *Earth Surf. Processes Landform*, 12, 319-330.
- [13] Mariaca L.; Morcillo M. (1998), In *Corrosión y protección de metales en las atmósferas de Iberoamérica. Parte I. Mapas de Iberoamérica de Corrosividad Atmosférica*, M. Morcillo, E. Almeida, B. Rosales, J. Uruchurtu, M. Marrocos (Eds.), CYTED, Madrid España, pp. 283-307.
- [14] Videla, H. (2002), Mecanismos de biodeterioro, biocorrosión y corrosión atmosférica. Similitudes y diferencias. In: *Prevención y Protección del Patrimonio Cultural Iberoamericano de los Efectos del Biodeterioro Ambiental*, L.K. Herrera, H.A. Videla (Eds.), Medellín, Colombia. pp. 39-60.
- [15] Rippka R.; Deruelles J.; Waterbury J.; Herdman M.; Stanier R. (1979), Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, 1-61.
- [16] Noack-Schönmann S.; Spagina O.; Gründer K.; Breithaupt M.; Günter A.; Muschik B.; Gorbushina A. (2014), Sub-aerial biofilms as blockers of solar radiation: spectral properties as tools to characterise material-relevant microbial growth. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 86, 286-293.
- [17] Prescott G. (1964) *How to know the freshwater algae*. W.C. Brown Company (Ed.), Dubuque, Iowa.
- [18] Warscheid T; Braams J. (2000), Biodeterioration of stone: a review. *Int Biodeter Biodeg*, 46, 343-368.
- [19] 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. *Coll. Surf. B*, 101, 337-342.
- [20] Warscheid T.; Oelting M.; Krumbein W. (1991), Physico-chemical aspects of biodeterioration processes on rocks with special regard to organic pollutants. *Int Biodeter.*, 28, 37-48.
- [21] Hoffman L. (1989), Algae of terrestrial habitats, *Bot. Rev.* 55, 77-105
- [22] Ortega-Morales B.; Lopez-Cortes A.; Hernandez-Duque G.; Crassous P.; Guezennec J. (2001), Microbial Growth. In *Biofilms Part A: Developmental and Molecular Biological Aspects, Methods in Enzymology*. R.J. Doyle (Ed.), vol. 336. Academic Press, San Diego, pp. 331-339.
- [23] Gaylarde C.; Englert G. (2006), In *Structural Analysis of Historical Constructions*, P.B. Lourenço, P. Roca, C. Modena, S. Agrawal Eds. Maximilian India Ltd. pp. 1708-1715.
- [24] Wee Y.; Lee K. (1980), Proliferation of algae of sufaces of buildings in Singapore. *Int. Biodeterior. Bull.*, 16, 113-117.
- [25] Gaylarde C.; Ortega-Morales B.; Bartolo-Pérez P. (2007), Biogenic Black crust on buildings in unpolluted environments. *Curr. Microbiol.*, 54, 162-166.
- [26] Nogueroles-Seoane A.; Rifon-Lastra A. (1997), Epilithic phycoflora on monuments. A survey on San Esteban de Ribas de Sil monastery (Ourense, NW Spain). *Cryptogamie Algol.*, 18, 351-361.
- [27] Gaylarde P.; Gaylarde C.; Guiamet P.; Gómez de Saravia S.; Videla H.(2001), Biodeterioration of Mayan buildings at Uxmal and Tulum, Mexico. *Biofouling*, 17, 41-45.
- [28] Gorbushina A.; Kempe A.; Rodenacker K.; Jutting U.; Altermann W.; Stark R.; Heckl W.; Krumbein W. (2011), Quantitative 3-dimensional image analysis of mineral surface modifications - chemical, mechanical and biological. *Geomicrobiol. J.*, 28, 172-184.